วิทยานิพนธ์

การตรวจสอบเชื้อรา *USTILAGO SCITAMINEA* SYDOW ในเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ต่างๆ

THE EVALUATION OF *USTILAGO SCITAMINEA* SYDOW IN THE TISSUES OF VARIOUS SUGARCANE CULTIVARS

นางสาววัลวิษา ปิติมาตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร)

ปริญญา

วิจัยและพัฒนาการเกษตร | โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ต่างๆ

The Evaluation of *Ustilago scitaminea* Sydow in the Tissues of Various Sugarcane Cultivars

นามผู้วิจัย นางสาววัลวิษา ปีติมาตร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์เรวัต เลิศฤทัยโยธิน, D.Agr.)

ประธานสาขาวิชา .....

(รองศาสตราจารย์วรวิทย์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 29 **เดือน** พ.ค. **พ.ศ.** 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ต่างๆ

The Evaluation of *Ustilago scitaminea* Sydow in the Tissues of Various Sugarcane Cultivars

โดย

นางสาววัลวิษา ปิติมาตร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร)
พ.ศ. 2551

วัลวิษา ปิติมาตร์ 2551: การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ต่างๆ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร) สาขาวิชาวิจัยและพัฒนาการเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์, วท.ด. 62 หน้า

ศึกษาการตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อย โดยทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ ในกล้าอ้อย 4 พันธุ์ ได้แก่ K84-200 อู่ทอง1 กำแพงแสน94-13 และ H59-3775 ในสภาพโรงเรือนทดลอง โดยเปรียบเทียบระดับความต้านทานต่อโรคแส้ดำ จากการแสดงอาการของโรค และการแพร่กระจายของเชื้อในเนื้อเยื่อพืช ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaetion (PCR) และกล้องจุลทรรศน์ การตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ใช้ไพรเมอร์ *b*E4 (5'-CGCTCTGGTTCATCAAACG-3') และ *b*E8 (5'-TGCTGTCGATGGAAGGTGT-3') ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อยีน *b*East mating type ของเชื้อ *U. scitaminea* ใช้วิธีการปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์ และการฉีดเชื้อสาเหตุ จากการทดลองพบว่า วิธีการปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์ด้วย teliospore ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ และการเจริญของเส้นใยของเชื้อที่ระยะเวลา 1 2 และ 3 เดือน หลังปลูกเชื้อ ส่วนในการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia สามารถตรวจพบเชื้อได้ในอ้อยทั้ง 4 พันธุ์ ด้วยเทคนิค PCR แต่จำนวนการตรวจพบเชื้อจะผันแปรไปตามพันธุ์อ้อย

การตรวจสอบเชื้อในอ้อยที่มีอายุและขนาดแตกต่างกัน ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 โดยทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia พบว่า มีการตรวจพบเชื้อได้สูงสุดในอ้อยที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร และทำการตรวจสอบในอ้อยที่มีความแตกต่างของระดับความต้านทานโรคแส้ดำ ในอ้อยพันธุ์K84-200 และกำแพงแสน94-13 โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia และ teliospore พบว่า การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้ดีกว่าการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อ 100 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ในอ้อยพันธุ์ K84-200 และกำแพงแสน94-13 ตามลำดับ และในการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถตรวจพบเส้นใยของเชื้อ เท่ากับ 62.5 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ระยะเวลา 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อรา *U. scitaminea* เจริญได้ในอ้อยทุกพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง และระดับความต้านทานของพืชไม่สัมพันธ์กับการตรวจพบเชื้อ

วัลวิษา ปิติมาตร์ 20 / พ.ค. / 2551

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Wanwisa Pitimat 2008: The Evaluation of *Ustilago scitaminea* Sydow in the Tissues of Various Sugarcane Cultivars. Master of Science (Agricultural Research and Development) Major Field: Agricultural Research and Development, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Chalida Leksomboon, Ph.D. 62 pages.

Evaluation of *Uslilago scitaminea* Sydow in sugarcane tissue for the study of the presence of this pathogen in inoculated different sugarcane cultivars were performed in the greenhouse condition. Four sugarcane cultivars, K24-200 UT1 Kps94-13 and H59-3775 were compared for resistance to smut as measured by disease symptom and pathogen distribution in the plant tissues. Polymerase chain reaction (PCR) and microscopy were used to investigate the distribution in sugarcane tissue. Primer *b*E4 (5'-CGCTCTGGTTCATCAAACG-3') and *b*E8 (5'-TGCTGTCGATGGAAGGTGT-3') which amplifies the *b*East mating-type gene of *U. scitaminea* were used in PCR study. Different inoculation method, immersion and injection method, were assayed to determine by PCR or microscopy. No amplification product was observed in all cultivars at 1 2 and 3 months and fungal growth was also not observed in the inoculation with teliospore by immersion method. By using injection with sporidia suspension, all four cultivars yielded positive PCR products but the number of positive plants varied for each cultivar.

The effect of age and size of sugarcane seedling on the detection was performed in cultivars Kps94-13 by sporidia injection. The highest positive detection by PCR and microscopy occurred in three weeks old seedlings with 6-8 mm in diameter of stem. The different sugarcane cultivars differed in resistance to smut, K84-200 and Kps94-13, were used for investigation of the presence of the pathogen. By using injection method with sporidia and teliospore, the PCR assay was the better method for smut detection than microscopy. At 28 days post-inoculation, the PCR assay yielded a positive response at a frequency of 100 and 75% in cultivar K84-200 and Kps94-13, respectively. Whereas visual detection of the hyphae through microscopy was 62.5 and 75%, respectively. Results from this study indicated that none of the cultivars included in the study was immune to *U. scitaminea* and there was no relationship between the presence of the pathogen and plant resistance.

Wanwisa Pitimat — Student's signature

Chalida Leksomboon — Thesis Advisor's signature

20 / May / 2008

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ชลิดา เล็กสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์เรวัต เลิศฤทัยโยธิน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้สั่งสอนให้ความรู้ ความช่วยเหลือ และคำแนะนำต่าง ๆ ตลอดการตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์คณะเกษตรและอาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรม สั่งสอนประสิทธิประสาทวิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในการสนับสนุนทุนวิจัย และสถานที่ทดลองในโรงเรือน ขอขอบคุณศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี และศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคกลาง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรีที่สนับสนุนท่อนพันธุ์อ้อยในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อน พี่และน้องทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดช่วงระยะการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้องที่ให้กำลังใจเสมอมา ประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขอมอบแด่คุณพ่อบุญส่ง ปิติมาตร์ คุณแม่อารมณ์ ลาภานิกรณ์ ครูอาจารย์ พี่และน้อง

วัลวิษา ปิติมาตร์

เมษายน 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลอง	26
วิจารณ์การทดลอง	50
สรุป	56
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแสดงออกของโรคแส้ดำ ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ ที่ระยะเวลา 4 เดือน หลังปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด teliospore suspension	27
2	การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ด้วยเทคนิค PCR ในอ้อยพันธุ์ K84-200 กำแพงแสน94-13 และอู่ทอง 1 โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในอ้อยอายุ 2 สัปดาห์	29
3	การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR ในอ้อยอายุ 4 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ ด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในต้นอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 K84-200 อู่ทอง1 และ H59-3775 ที่อายุ 2 สัปดาห์	33
4	การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในอ้อยพันธุ์ในอ้อยพันธุ์ K84-200 อู่ทอง1 กำแพงแสน94-13 และ H59-3775 ที่มีลักษณะการแตกหน่อต่างกัน ที่อายุ 8 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ ด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในอ้อยอายุ 2 สัปดาห์	38
5	การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในต้นอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 ที่มีอายุและขนาดแตกต่างกัน	41
6	การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ด้วยเทคนิค PCR โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในต้นอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 ที่มีอายุและขนาดแตกต่างกัน	42
7	การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์ K84-200 และกำแพงแสน94-13 ที่ปลูกเชื้อโดยการฉีด teliospore suspension	46
8	การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์ K84-200 และกำแพงแสน94-13 ที่ปลูกเชื้อโดยการฉีด sporidia suspension	47

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพแสดงตำแหน่งการปลูกเชื้อ และตำแหน่งที่นำมาตรวจสอบ โดยระยะระหว่างตำแหน่งที่นำมาตรวจมีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร	18
2	ลักษณะอ้อยที่อายุและขนาดต้นในกลุ่มต่างๆ	22
3	ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 450 bp จากการตรวจเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow จากดีเอ็นเอของ sporidia mycelium และการตรวจภายในเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ต่างๆ ที่ระยะเวลา 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ด้วยไพรเมอร์ *b*E4 และ *b*E8 เมื่อ lane M: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia; lane 2: mycelium; lane 3: อ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13; lane 4: อ้อยพันธุ์K84-200 และ lane 5: อ้อยพันธุ์อู่ทอง 1	30
4	ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์K84-200 (1) กำแพงแสน94-13 (2) และอู่ทอง1 (3) ที่ระยะเวลา 0 วัน (ก) 1 วัน (ข) และ 28 วัน (ง) เมื่อ lane M: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3 4 : ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 5 6 7 : ต้นที่ 2; lane 8 9 10 : ต้นที่ 3 และ lane 11 12 13: ต้นที่ 4	31
5	ลักษณะของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ที่ตรวจพบในต้นอ้อยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ระยะเวลา 28 วัน หลังปลูกเชื้อ	34
6	ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์K84-200 (1) อู่ทอง1(2) กำแพงแสน94-13 (3) และH59-3775 (4) ที่อายุ 4 สัปดาห์หลังปลูกเชื้อ เมื่อ lane M: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3 4: ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 5 6 7: ต้นที่ 2; lane 8 9 10: ต้นที่ 3 และ lane 11 12 13: ต้นที่ 4	35
7	ลักษณะของต้นอ้อยที่มีการแตกหน่อใหม่	37

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์K84-200 (1) และH59-3775 (4) ที่อายุ 8 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ เมื่อ lane M : Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3 4: ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง ในต้นที่ไม่แตกหน่อ คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูก เชื้อ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 5 6 7: ต้นที่ 2; lane 8: ต้นที่ 3 และ lane 9: ต้นที่ 4 ส่วนในอ้อยพันธุ์อู่ทอง1 (2) และกำแพงแสน94-13 (3); lane 2: ต้นที่ 1; lane 3: ต้นที่ 2; lane 4: ต้นที่ 3 และ lane 5: ต้นที่ 4	39
9	ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 ที่มีอายุและขนาดลำต้นแตกต่างกันทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1(1) กลุ่มที่ 2 (2) กลุ่มที่ 3 (3) และกลุ่มที่ 4 (4) ช่วง 1 7 14 21 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อ (ก ข ค ง จ ตามลำดับ) เมื่อ lane M: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3 4: ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 5 6 7: ต้นที่ 2; lane 8 9 10: ต้นที่ 3 และ lane 11 12 13: ต้นที่ 4	43
10	ลักษณะของเชื้อที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ระยะเวลา 1 วัน หลังการปลูกเชื้อ ในอ้อยพันธุ์K84-200 และกำแพงแสน94-13	48
11	ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์K84-200 (ก) และกำแพงแสน94-13 (ข) ที่ปลูกเชื้อด้วยการฉีด teliospore suspension (1) และ sporidia suspension (2) เมื่อ lane: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3: ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ตรวจ 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และเหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 4 5: ต้นที่ 2; lane 6 7: ต้นที่ 3 และ lane 8 9: ต้นที่ 4	49
12	ลักษณะของต้นอ้อยอายุ 2 เดือน ที่ปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์	52

การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ต่างๆ

The Evaluation of *Ustilago scitaminea* Sydow in the Tissues of Various Sugarcane Cultivars

คำนำ

อ้อยเป็นพืชที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลที่สำคัญที่สุดในปัจจุบันและยังเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของไทย น้ำตาลเป็นสารอาหารคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานในชีวิตประจำวันของมนุษย์ โดยใช้บริโภคเป็นส่วนประกอบในอาหารโดยตรง และเป็นวัตถุดิบสำคัญในการทำอุตสาหกรรมต่างๆ หลายชนิด นอกจากนี้อ้อยยังให้ผลพลอยได้อื่นๆ จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายอีกด้วย เช่น กากอ้อยใช้ทำเชื้อเพลิง เยื่อกระดาษ วัสดุกันความร้อน กากตะกอนใช้ทำปุ๋ย กากน้ำตาลใช้ผลิตแอลกอฮอล์ (เกษม และคณะ, 2520; เกษม, 2527) ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 6.266 ล้านไร่ ได้ผลผลิตอ้อยเฉลี่ย 11.4 ตันต่อไร่ และเมื่อคิดเป็นผลผลิตอ้อยรวมทั้งประเทศมี 74.1 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) จากข้อมูลการผลิตอ้อยตั้งแต่ปี 2544 มีพื้นที่ปลูกอ้อยประมาณ 6 ล้านไร่ ได้ผลผลิตอ้อยเฉลี่ย 8.9 ตันต่อไร่ และเมื่อคิดเป็นผลผลิตอ้อยรวมทั้งประเทศมีเพียง 48.6 ล้านตัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2544) จนถึงปัจจุบันพบว่า มีการผลิตอ้อยเพิ่มขึ้นทุกปี อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจและทำรายได้ให้แก่ประเทศเป็นจำนวนมาก จึงควรมีการเพิ่มผลผลิตอ้อยให้มีคุณภาพและปริมาณมากขึ้น โดยการจัดการที่เหมาะสม ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อผลผลิตอ้อยที่สำคัญนั้นมีหลายประการ ได้แก่ พันธุ์ สภาพแวดล้อม ความอุดมสมบูรณ์ของดิน โรคและแมลง เป็นต้น

โรคแส้ดำอ้อยเป็นโรคหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตอ้อยลดลง โดยมีเชื้อสาเหตุมาจากเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow มีรายงานว่า อ้อยที่อ่อนแอและอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการพัฒนาของเชื้อจะทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตมากกว่า 50% และทำให้เกิดความเสียหายกับอ้อยตอมากกว่าอ้อยปลูก โดยความเสียหายที่เกิดในอ้อยตอจะมากถึง 70% (Antoine, 1961; Ferreira and Comstock, 1989) อ้อยที่เป็นโรคจะมีน้ำหนักสดลดลง ตลอดจนปริมาณสารละลายทั้งหมดในอ้อย (Brix) และ ซีซีเอส (Commercial Cane Sugar : CCS) ลดลงด้วย (Jandhu *et al*., 1969; เลิศวิทย์, 2534) จากการปรับปรุงพันธุ์อ้อยเพื่อให้ได้พันธุ์อ้อยที่มีคุณภาพทั้งด้านความหวานและน้ำหนักที่

เหมาะสมต่อการปลูกแต่ละพื้นที่ ทำให้ปัจจุบันมีอ้อยพันธุ์ใหม่ๆ เพิ่มขึ้นจำนวนมาก แต่ยังไม่สามารถบอกได้ชัดว่าพันธุ์ใดมีความต้านทานต่อโรคแส้ดำ และต้านทานระดับใด เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลต่อการเกิดโรคด้วย การทดลองนี้จึงทำการศึกษาการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคแส้ดำในเนื้อเยื่ออ้อย ของพันธุ์ที่แสดงความรุนแรงของโรคในระดับที่ต่างกัน โดยใช้วิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) และการตรวจเชื้อในระดับเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อนำไปใช้พัฒนาวิธีการทดสอบพันธุ์ต้านทานโรค

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแสดงอาการโรคแส้ดำ ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ

2. เพื่อศึกษาวิธีการปลูกเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow สาเหตุโรคแส้ดำ

3. เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow สาเหตุโรคแส้ดำในอ้อย

4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของความต้านทานโรค ของพันธุ์อ้อยกับการปรากฏเชื้อในลำต้นอ้อย

การตรวจเอกสาร

อ้อยเป็นพืชพวกหญ้าเช่นเดียวกับข้าวและข้าวโพด (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่ม5, 2550) แต่อ้อยปลูกเพื่อเก็บเกี่ยวเอาส่วนของลำต้นซึ่งมีน้ำตาลอยู่แทนที่จะเก็บเกี่ยวเอาเมล็ด แหล่งปลูกอ้อยของโลกอยู่ในประเทศแถบร้อนและชุ่มชื้น เช่น ประเทศบราซิล คิวบา ออสเตรเลีย อินเดีย ฟิลิปปินส์ และไทย เป็นต้น สำหรับประเทศไทย ชาวไร่ส่วนใหญ่ปลูกอ้อยสำหรับทำน้ำตาล มีส่วนน้อยที่ปลูกอ้อยเคี้ยว ได้แก่ อ้อยสิงคโปร์ และอ้อยมอริเชียส เป็นต้น อ้อยประเภทนี้ใช้บริโภคโดยตรง มีเปลือกและเนื้อนิ่มกว่าอ้อยที่ปลูกเพื่อทำน้ำตาล อ้อยมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum* L.จัดอยู่ในลำดับดังนี้

ชั้น	(Class)	:	Monocotyledones
อันดับ	(Order)	:	Glumaceae
วงศ์	(Family)	:	Gramineae
กลุ่ม	(Group)	:	Andropogoneae
Genus		:	Saccharum

อ้อยมีถิ่นกำเนิดอยู่ที่เกาะนิวกินีในมหาสมุทรแปซิฟิก ประเสริฐ และคณะ (2544) และปรีดา และปรีชา (2523) รายงานถึงการแพร่กระจายของอ้อยจากเกาะนิวกินีเป็น 3 ทาง คือ 1) แพร่กระจายสู่เกาะโซโลมอน เกาะนิวเฮบริดิส และเกาะนิวคาลีโดเนีย 2) แพร่กระจายไปทางทิศตะวันตกสู่อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไทย และตอนเหนือของอินเดีย และ 3) แพร่กระจายไปทางทิศตะวันออกของหมู่เกาะไซโลมอน ได้แก่ เกาะฟิจิ ตองกา ซามัว คุก มาร์คีซาส์ โซไซตี อีสเตอร์ ฮาวาย และเกาะต่างๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก สำหรับการแพร่กระจายอ้อยไปทางทิศตะวันตกนั้นมีความสำคัญมาก เพราะทำให้เกิดการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำตาลที่เจริญต่อมาจนถึงปัจจุบัน

อ้อยเป็นพืชที่ชอบแดดจัด อากาศร้อน (30-35 องศาเซลเซียส) สามารถเจริญเติบโตได้ในดินแทบทุกประเภท แต่ดินที่เหมาะสมที่สุด คือ ดินร่วนปนทราย ระบายน้ำได้ดี พื้นที่ปลูกควรเป็นที่ดอนไม่มีน้ำท่วมขัง ในช่วงการเจริญเติบโตตั้งแต่ปลูกจนถึงอายุประมาณ 7-8 เดือน พืชต้องการอุณหภูมิสูง ต้องการน้ำและธาตุอาหารอย่างเพียงพอ (กรมวิชาการเกษตร, 2545) สำหรับช่วงสะสมน้ำตาลก่อนเก็บเกี่ยว อ้อยต้องการอากาศเย็น ดินมีน้ำน้อย ซึ่งจะช่วยให้อ้อยมีความหวาน และมีการ

เจริญเติบโตเพิ่มขึ้น (เกษม, 2540) สำหรับการเจริญเติบโตของอ้อยนั้น แบ่งระยะการเจริญเติบโตของอ้อยตั้งแต่ปลูกจนถึงเก็บเกี่ยวออกเป็น 4 ระยะ (ประเสริฐ, 2542) คือ

ระยะงอก (germination phase) เริ่มต้นตั้งแต่ปลูกจนถึงหน่อโผล่พ้นผิวดิน ใช้เวลา 2-3 สัปดาห์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ สภาพของท่อนพันธุ์ และสภาพแวดล้อม ปัจจัยภายนอกที่เหมาะสมต่อการงอก เช่น มีแสงแดดพอประมาณควรได้รับน้ำน้อยแต่บ่อยครั้ง

ระยะแตกกอ (tillering phase) เป็นลักษณะพิเศษของอ้อย เริ่มตั้งแต่อายุ 2-4 เดือน การแตกกอเกิดจากตาอ้อยที่อยู่บริเวณลำต้นใต้ดิน ทำให้ลำต้นหรือหน่อที่เกิดขึ้นภายหลังอยู่ใกล้ผิวดินหรือลอยขึ้น ดังนั้นลักษณะตอลอยจะปรากฏเด่นชัดขึ้นในอ้อยตอหลังๆ การเจริญเติบโตในระยะนี้ต้องการแสงแดดจัด อุณหภูมิสูงและต้องการน้ำมากกว่าระยะงอก ในระยะนี้อ้อยต้องการปุ๋ยมากขึ้น

ระยะย่างปล้อง (elongation phase) เป็นระยะที่ต่อเนื่องจากระยะแตกกอ เริ่มตั้งแต่อายุ 3-4 เดือนเป็นต้นไป อ้อยเจริญเติบโตได้เร็วที่สุดเมื่ออายุ 6-7 เดือน ต้องการแสงแดดจัดเพื่อการสังเคราะห์แสงให้ได้มากขึ้น อุณหภูมิสูง มีความต้องการน้ำมากกว่าระยะอื่นๆ และต้องการปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมมากที่สุด

ระยะแก่และสุก (maturity and ripening phase) ระยะแก่ คือ ระยะที่อ้อยมีการเจริญเติบโตช้ามาก สังเกตได้จากใบที่ส่วนยอดจะอยู่ชิดกันมากขึ้น จนกระทั่งดูคล้ายเจริญออกมาจากจุดเดียวกัน ปล้องที่อยู่ส่วนยอดของลำต้นที่สั้นลง ใบมีสีเหลืองอมเขียว ปริมาณน้ำตาลที่สังเคราะห์แสงได้จะสะสมไว้ในลำต้นมากขึ้น จนกระทั่งเข้าสู่ระยะสุกแก่ เป็นระยะที่อ้อยมีการสะสมน้ำตาลสูงสุด ระยะนี้ต้องการแสงแดดจัดเพื่อใช้ในการสังเคราะห์แสงหรือสร้างน้ำตาลสะสมในลำต้น และต้องการอุณหภูมิต่ำหรืออากาศหนาวเย็น ซึ่งช่วยส่งเสริมการสร้างน้ำตาลและเคลื่อนย้ายน้ำตาลจากใบไปยังลำต้น

โรคที่สำคัญและสามารถพบการระบาดทำความเสียหายแก่ไร่อ้อยของเกษตรกร ได้แก่ โรคเหี่ยวเน่าแดง โรคใบขาว โรคกอตะไคร้ โรคใบขีดแดงและยอดเน่า โรคเน่าคออ้อย โรครากโคนเน่าจากเห็ด โรคกลิ่นสับปะรด โรคลำต้นเน่า โรครากเน่า โรคใบจุดเหลือง โรคราสนิม และโรคที่สำคัญของอ้อยอีกโรคหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตลดลงเกินกว่า 10 % ค่าซีซีเอสลดลง และไว้ตอได้น้อยลง คือ โรคแส้ดำ (กรมวิชาการเกษตร, 2549)

โรคแส้ดำของอ้อยเป็นโรคที่พบเห็นอยู่ทั่วไปในพื้นที่ที่ปลูกอ้อย จัดเป็นโรคที่มีความสำคัญโรคหนึ่งของประเทศผู้ผลิตอ้อย Martin (1964) ได้รายงานว่า พบโรคนี้ครั้งแรกบริเวณ Natal ประเทศแอฟริกาใต้ในปี ค.ศ. 1877 ใน Kenya พบโรคนี้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1958 (Bock, 1964) สำหรับประเทศไทยมีการสำรวจโรคอ้อยครั้งแรกในปี พ.ศ. 2506-2507 โรคแส้ดำของอ้อย บางทีเรียกว่า โรคเขม่าดำ โรคดอกธูป โรคกะหรี่ โรคราดำ โรคยอดดำ โรคดอกธูปลาย และอ้อยตัวผู้ โรคนี้มีความสำคัญมาก โรคหนึ่งเพราะระบาดทำความเสียหายแก่อ้อยแทบทุกพันธุ์ในแหล่งปลูกอ้อยทั่วประเทศ (ธนาคร และคณะ, 2526) ในช่วงปลายทศวรรษ 1930 โรคนี้จัดเป็นปัญหาสำคัญของประเทศอินเดีย และประเทศอื่นๆ ในทวีปเอเชีย มีรายงานการพบโรคนี้ในซีกโลกตะวันตก เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1940 ที่ประเทศอาเจนตินา (Ferreira and Comstock, 1989)

เชื้อสาเหตุ

Phylum Basidiomycota

Class Basidiomycetes

Subclass Phragmobasidiomycetes

Order Ustilaginales

Family Ustilaginaceae

Genus *Ustilago*

Species *scitaminea*

ได้มีการจำแนกเชื้อสาเหตุของโรคนี้ครั้งแรกว่าเกิดจากเชื้อรา *Ustilago sacchari* Rabenh ในปี ค.ศ. 1924 Sydow ได้ทำการจำแนกเชื้อใหม่ และเปลี่ยนชื่อเป็น *Ustilago scitaminea* Sydow (Ferreira and Comstock, 1989) ยงยุทธ และคณะ (2519) ได้ศึกษาเชื้อสาเหตุของโรคแส้ดำของอ้อยในประเทศไทยพบว่า สปอร์มีลักษณะกลม สีน้ำตาลอ่อน ขอบสีน้ำตาล ผิวมีหนามเล็กๆ อยู่โดยรอบ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.2-8.3 ไมครอน เมื่อรวมกันจะเห็นเป็นสีดำ สปอร์งอกได้หลายแบบ sporidia เกิดขึ้นที่ปลายหรือด้านข้างเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม sporidia เซลล์เดียว ไม่มีสี (hyaline) มีลักษณะเป็นแท่งปลายมนถึงรูปไข่ ขนาด 1.7-2.9 x 8.3-15 ไมโครเมตร เพิ่มปริมาณโดยการแตกตา (budding) ภายในเซลล์ Grisham (1986) รายงานว่า sporidia ที่ยังคงมีชีวิตจะมีการ budding เพิ่มจำนวน สร้างโคโลนีสีครีม ไม่มีการสร้างเส้นใย เมื่อนำ sporidia มาผสมกัน พบว่าเกิด compatible ของ sporidia ขึ้นอยู่กับระบบ plus-minus bipolar system ซึ่งอัตราส่วนของ compatible : incompatible เป็น 1:1 Goldman (1986) พบว่า sporidia ของเชื้อ 2 isolate ซึ่งมาจากต่างแหล่งกันมี

ลักษณะของโคโลนีและสัณฐานของเซลล์ต่างกัน และเมื่อนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20°C และ 30°C พบว่า สัณฐานของ sporidia ไม่เปลี่ยนแปลง sporidia จาก mating type ต่างกันเมื่อนำมาผสมกันจะสร้างเส้นใยสีขาว Trione (1990) พบว่าเส้นใยของเชื้อ *U. scitaminea* ในอ้อยมี 2 ลักษณะ คือเป็น dikaryotic vegetative hypha ในส่วนของลำต้นอ้อย และ monokaryotic sporogeneous hypha อยู่ในส่วนเนื้อเยื่อของแส้และส่วนของ sorus-bearing structure บนลำต้นอ้อย เชื้อที่แยกจากชิ้นส่วนของพืชในระยะแรกที่เจริญจากเนื้อเยื่อพืชจะทำให้เกิดโคโลนีสีน้ำตาล หลังจากนั้น 1-2 สัปดาห์ จะสร้างเส้นใยสีขาวเจริญขึ้นมาจากโคโลนีสีน้ำตาล ในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำอ้อยสกัด เชื้อจะพัฒนาเป็นโคโลนีสีดำ และสร้าง teliospore และในสภาพที่เหมาะสมเชื้อราจะเจริญต่อไปเป็นเส้นใยสีขาวได้ Fereol (1984) ทำการปลูกเชื้อบริสุทธิ์ของโรคแส้ดำลงบนต้นอ้อยที่เลี้ยงอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเชื้อสามารถเจริญเข้าเนื้อเยื่อของอ้อยได้ และทำให้อ้อยแสดงอาการของโรคโดยการสร้างแส้ และ teliospore ที่สร้างยังคงมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคได้ โดยวงจรชีวิตของเชื้อจะประกอบด้วยเซลล์ 3 แบบ (Shenck, 1999) คือ

1. teliospore (n+n, 2n) เป็นระยะของเชื้อที่สามารถอยู่ข้ามฤดูได้ เมื่อแก่เต็มที่จะรวมกับนิวเคลียสอยู่ในสภาพ diploid (2n) งอก germ tube หรือ hypobasidia แบ่งเซลล์แบบ meiosis ได้ haploid cells จำนวน 4 เซลล์และสร้าง probasidium บน haploid cells (n) แต่ละเซลล์ จากนั้นจึงพัฒนาเป็น 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 ออกมาซึ่งยังไม่สามารถเข้าทำลายพืชได้ จากนั้น germ tube จากต่าง mating type เกิดการเชื่อมเซลล์กันได้เป็น dikaryotic cell แล้วเจริญเป็นเส้นใยที่มี 2 นิวเคลียสในหนึ่งเซลล์ที่สามารถเข้าทำลายพืชได้

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

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

Singh *et al*. (1966) ได้ศึกษาถึงการมีชีวิตอยู่ของสปอร์ โดยใช้สปอร์ของโรคแส้ดำ 71 ตัวอย่าง จากอ้อย 49 สายพันธุ์ พบว่า สปอร์จะมีชีวิตอยู่ได้นาน 2-4 เดือน ขึ้นอยู่กับการเก็บรักษา แหล่งที่ปลูกเชื้อ และพันธุ์อ้อยที่ทำการเก็บสปอร์

Alexander (1981) ได้ทำการรวบรวม teliospore จาก 46 แหล่งปลูกอ้อยในประเทศอินเดีย ทำการปลูกเชื้อทดสอบบนอ้อย 9 พันธุ์ ซึ่งทำปฏิกิริยาต่อ *U. scitaminea* พบว่า มีเชื้ออยู่ 2 สายพันธุ์ และอีกหลาย biotype ในฮาวายมีรายงานว่ามีเชื้อ 2 race คือ A และ B (Comstock and Heinz, 1977)

Juangbanich and Wangwon (1983) รายงานว่า chlamydospore จะงอกได้ดีที่สุดในสารละลาย sucrose และศึกษาการงอกของ chlamydospore บนอาหารชนิดต่างๆ พบว่า สปอร์งอกได้ดีที่สุดในอาหารที่ผสมด้วยสารสกัดจากตาอ้อย

Padmanaban *et al*. (1988 a) รายงานการทดสอบความงอกของสปอร์ของเชื้อโรคแส้ดำ พบว่า สารละลายที่สกัดจากตาอ้อย (bud extract) กระตุ้นการงอกของสปอร์มากกว่าสารสกัดจากใบและราก และยังพบว่า bud extract จากอ้อยพันธุ์ต้านทานกระตุ้นการงอกของสปอร์น้อยกว่าพันธุ์อ่อนแอ โดยมีเปอร์เซ็นต์การงอก 38.10-61.00% ในสารสกัดจากอ้อยพันธุ์ต้านทาน และ 80-82% ในอ้อยพันธุ์อ่อนแอ ซึ่งแสดงว่ามีสารยับยั้งการงอกบางอย่างอยู่ในอ้อยพันธุ์ต้านทาน

Xu *et al*. (2004) ศึกษาความหลากหลาย ทางพันธุกรรมของเชื้อรา *U. scitaminea* จำนวน 18 ไอโซเลท ที่เก็บได้จาก 6 แหล่งทั่วประเทศจีน แยกความแตกต่างโดยเทคนิค RAPD ด้วย ไพรเมอร์ 13 ชนิด แบ่งเชื้อได้ทั้งสิ้น 6 กลุ่ม

Singh *et al*. (2005) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่รวบรวมได้จาก South Africa, Reunion Island, Hawaii, Guadeloupe โดยเทคนิค RAPD และสรีรวิทยาของเชื้อ ไม่พบความ แตกต่างกันของทั้งลักษณะสรีรวิทยาของเชื้อและเทคนิค RAPD เมื่อใช้ไพรเมอร์ UBC 220, UBC 222, UBC 230, T7 และK5

อนุสรณ์ และคณะ (2525) ได้ศึกษา physiological races ของเชื้อโดยรวบรวมเชื้อจาก 8 แหล่งทั่วประเทศ มาปลูกเชื้อลงบนอ้อยพันธุ์ต่างๆ 11 พันธุ์ เมื่อทำการปลูกเชื้อโดยใช้เชื้อแส้ดำจาก จังหวัดชัยนาท อำเภอสามชุกและอำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี พบว่า อ้อยพันธุ์ F 160 Ragnar และ NCo376 มีความต้านทานโรคสูง และพันธุ์ Q83 อ่อนแอต่อโรคแส้ดำ การศึกษาขั้นต้นนี้ชี้ชัดว่า สปอร์ของเชื้อราแส้ดำซึ่งรวบรวมจากแต่ละท้องถิ่นมีความรุนแรงต่างกัน แต่ยังไม่สามารถจำแนก สายพันธุ์ได้

ศิริลักษณ์ (2547) ทำการเก็บรวบรวมเชื้อราจากแหล่งปลูกอ้อย 7 แหล่ง ในจังหวัดชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ ขอนแก่น กาฬสินธุ์ อุดรธานี และชลบุรี ศึกษาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง teliospore ของเชื้อในแต่ละแหล่ง พบว่า ไม่แตกต่างกัน และเมื่อศึกษาการเจริญเติบโตและรูปร่าง โคโลนีในแต่ละไอโซเลทบนอาหาร V8 juice agar (VA) พบว่าเมื่อเชื้อมีอายุ 15 วัน สามารถจัดกลุ่ม ได้ 5 กลุ่ม ตามขนาดและแบ่งกลุ่มตามลักษณะโคโลนีได้ 5 กลุ่ม สำหรับการศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค 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 สามารถจัด กลุ่มตามแหล่งที่มาได้อย่างชัดเจน ชี้ให้เห็นว่าเชื้อราทั้ง 5 จังหวัดมีความผันแปรกันน้อย ส่วนเชื้อรา จากจังหวัดขอนแก่นและชลบุรี ไม่สามารถจัดกลุ่มได้อย่างชัดเจน แสดงว่าเชื้อราจากทั้งสองจังหวัด มีความผันแปรสูง สรุปได้ว่าการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 ชนิด โดยวิธีRAPD สามารถแยกกลุ่มบางไอโซเล ทตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง และความผันแปรทางพันธุกรรมมีความสัมพันธ์น้อยมากกับลักษณะ ทาง phenotype ที่ประกอบด้วยการเจริญเติบโต ลักษณะโคโลนี และความสามารถในการทำให้เกิด โรค

วรัญญา (2550) ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา *U. scitaminea* โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งปลูกอ้อยภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือรวมทั้งสิ้น 43 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง teliospore ขนาดและลักษณะโคโลนีของเชื้อ และศึกษาลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RAPD โดยใช้ไพรเมอร์ VNTR และ ITS พบว่า การจัดกลุ่มตามลักษณะที่ศึกษาไม่มีความสัมพันธ์กับแหล่งของเชื้อ

ลักษณะอาการของโรค

อ้อยที่เป็นโรคมีอาการแคระแกร็น แตกกอคล้ายตะไคร้ ใบแคบและเล็ก ใบตั้ง ลำต้นผอมเรียว ข้อสั้นต้นเตี้ย ในที่สุดยอดจะมีลักษณะ เป็นแส้ดำโตขนาดดินสอหรือโตกว่า ความยาวไม่แน่นอนคือยาวตั้งแต่ 2-3 นิ้ว จนถึงหลายๆ ฟุต แส้สีดำถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อบางสีขาวภายในมีสปอร์ของเชื้ออยู่มากมาย (ธนาคร และคณะ, 2526) แส้ที่เกิดขึ้นเกิดได้ทั้งบริเวณยอดและตาข้าง โดยแส้ที่เกิดจากยอดจะมีขนาดยาวกว่าที่เกิดจากตาข้าง อ้อยที่เกิดโรคเป็นปีแรกเมื่อเกิดโรคอีกในปีถัดไปแส้จะมีขนาดเล็กลง สปอร์ของเชื้อที่อยู่ในแส้จะแพร่กระจายโดยลม ซึ่งกินเวลา 3-4 เดือน จึงหมด (Lee-Lovic, 1978)

การเข้าทำลายและการแพร่ระบาด

การเข้าทำลายอ้อยของเชื้อราพบว่า เชื้ออาศัยอยู่ในยอดอ้อยและตาข้าง แล้วเข้าสู่เนื้อเยื่อเจริญ สร้างเส้นใยอยู่ระหว่างเซลล์พืช จากนั้นสร้าง haustoria เข้าไปในเซลล์พืชเพื่อดูดกินน้ำเลี้ยง เมื่อเชื้อราเจริญเต็มที่ก็สร้างสปอร์ที่มีผนังหนา (chlamydospore) ซึ่งมีชีวิตอยู่ได้นาน 3-4 เดือน ในดินที่แห้ง หากความชื้นสูงสปอร์นี้จะงอกเป็น promycelium เมื่อ sporidia งอกเป็นเส้นใย (hypha) จนผสมกันระหว่าง mating type ที่แตกต่างกันเป็น secondary hypha ที่มีสภาวะของนิวเคลียสเป็น n+n เข้าทำลายพืชต่อไป (Martin, 1964)

ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีเชื้อโรคแส้ดำอยู่ เมื่อนำไปปลูกจะทำให้เกิดโรคในแปลง แล้วเกิดการแพร่กระจายโดยลมเป็นตัวพาสปอร์ให้แพร่กระจายไปติดต้นอื่นที่อยู่ข้างเคียง และยังพบว่าการแพร่กระจายของสปอร์โดยลมจะกระจายจากต้นที่เป็นโรคต้นเดิมไปได้ในรัศมี 14 เมตร อ้อยที่อยู่นอกรัศมี 14 เมตร จะไม่พบการเกิดโรค (Kalaimani *et al*., 1989)

ความเสียหาย

อ้อยที่เป็นโรคจะทำให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตได้หลากหลาย ขึ้นอยู่กับระดับความต้านทานของอ้อยแต่ละพันธุ์ โดยจะมีความเสียหายทั้งทางด้านผลผลิตและน้ำหนัก ซึ่งพบว่า เมื่ออ้อยที่เกิดโรคมากกว่า 30% ในอ้อยพันธุ์ที่อ่อนแอมากต่อโรคจะสูญเสียผลผลิต 24.64 % (Rajesh *et al*., 2003) และมีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของโรคแส้ดำทุก ๆ 1 % ในแปลงปลูก ผลผลิตจะลดลง 1.68 ตัน/เฮกตาร์ (Natarajan and Kalaimani, 1996) และเกิดโรครุนแรงมากในอ้อยตอ ในการเกิดโรคระยะแรกจะมีเพียงเล็กน้อยคือ จำนวนแส้น้อยกว่า 100 แส้/เฮกตาร์ ในปีแรก แต่จะเพิ่มขึ้นมากกว่า 5,000 แส้/เฮกตาร์ ในอีก 2 ปีต่อมา (Akalach and Touil, 1996)

การป้องกันและควบคุมโรค

เนื่องจากโรคแส้ดำของอ้อยเป็นโรคที่ติดต่อได้ทางท่อนพันธุ์ ดังนั้น ในการป้องกันจึงจำเป็นต้องกำจัดเชื้อที่ติดมากับท่อนพันธุ์ วิธีการส่วนใหญ่ที่ใช้คือ การแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 18 นาที นอกจากทำลายเชื้อโรคแส้ดำแล้วยังมีผลช่วยทำลายเชื้อไวรัส และมายโคพลาสมาได้อีกด้วย หรือใช้ท่อนพันธุ์แช่ลงในสารละลาย triadimefon เข้มข้น 500 ppm นาน 30 นาที หรือใช้สารเคมีร่วมกับน้ำร้อนซึ่งให้ผลดียิ่งขึ้น และควรปลูกพืชหมุนเวียนและไถพลิกหน้าดินขึ้นตากแดดเพื่อทำลายสปอร์ของเชื้อที่อยู่ในดิน อย่างไรก็ตาม วิธีการที่ดีที่สุดและประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายคือ การใช้พันธุ์อ้อยที่ต้านทานต่อโรคแส้ดำ (ธนาคร และคณะ, 2526)

การต้านทานโรค

Comstock and Heinz (1977) จัดแบ่งกลุ่มอ้อยตามปฏิกิริยาของอ้อยต่อโรคตามวิธีการ ดังนี้ 1) พันธุ์ต้านทาน (resistance) พบอ้อยเกิดโรค 0-3 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยปลูกและ 3-6 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยตอ 2) พันธุ์ค่อนข้างต้านทาน (moderately resistance) พบอ้อยเกิดโรค 4-12 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยปลูกและ 7-20 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยตอ 3) พันธุ์ต้านทานปานกลาง (moderately) พบอ้อยเกิดโรค 15-23 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยปลูกและ 21-30 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยตอ 4) พันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ (moderately susceptible) พบอ้อยเกิดโรค 25-50 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยปลูกและ 31-60 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยตอ 5) พันธุ์อ่อนแอ (susceptible) พบอ้อยเกิดโรค 51-100 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยปลูกและ

61-100 เปอร์เซ็นต์ในอ้อยตอ

Matsuoka *et al.* (1986) กล่าวถึงการเกิดโรคแส้ดำว่าขึ้นอยู่กับกลไกความต้านทานโรค 2 ลักษณะ คือ ความต้านทานการเข้าติดเชื้อของตาอ้อย เป็นกลไกความต้านทานแบบที่มีอยู่แล้วก่อนการเข้าทำลายของเชื้อ (pre-infection) ซึ่งอาจเป็นกลไกความต้านทานแบบ mechanical หรือ chemical ก็ได้ และกลไกความต้านทานแบบที่เกิดขึ้นภายหลังการเข้าทำลายของเชื้อ (post-infection) เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อราแบบ systemic เป็นกลไกความต้านทานเนื่องจากสภาพทางสรีรวิทยาของพืช

Grisham (1988) ทำการปลูกเชื้อโดยใช้ teliospore sporidia mating type + และ – ร่วมกันและแยกกัน และ mycelium โดยวิธีการป้ายตาต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปรากฏว่าการใช้ mycelium หรือ compatible sporidia ปลูกเชื้อทำให้เกิดโรคเร็วกว่าการใช้ teliospore และการใช้ teliospore, sporidia mating type + หรือ - เพียงชนิดเดียวไม่ทำให้อ้อยเกิดโรค

Padmanaban *et al.* (1988 b) รายงานลักษณะความต้านทานของโรคแส้ดำของอ้อย มี 2 ลักษณะ คือ การมีเปลือกหุ้มตาที่หนาแน่นเป็นกลไกการป้องกันภายนอก และอาจมีสารพวก phenolic glycoside บางชนิดในการกระตุ้นให้เกิดความต้านทานโรคภายในพืช

วิธีการปลูกเชื้อ

การศึกษาวิธีการปลูกเชื้อด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อทดสอบปฏิกิริยาของอ้อยที่แสดงต่อเชื้อเพื่อให้อ้อยเกิดอาการของโรคได้อย่างรวดเร็ว และทดสอบปฏิกิริยาต้านทานของอ้อยต่อเชื้อ *U. scitaminea* นั้นมีวิธีการศึกษาหลายวิธีเช่น Bock (1964) ทดสอบการปลูกเชื้อบนท่อนพันธุ์โดยใช้ท่อนพันธุ์อ้อยแช่ในสารละลาย teliospore 10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสปอร์ประมาณ 10^6-10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร Juangbhanich and Wangwon (1983) ทดลองวิธีปลูกเชื้อแบบต่างๆ ด้วย teliospore และ sporidia เข้มข้น 10^6-10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า วิธีฉีดสารละลาย teliospore เข้าไปในบริเวณส่วนเจริญจะให้ผลดีที่สุดคือเกิดโรค 100% ในปี คศ. 1986 Matsuoka *et al.* ทำการคัดเลือกพันธุ์อ้อยต้านทานต่อโรคแส้ดำ โดยใช้เข็มแทงตาอ้อยให้ลึกประมาณ 2 มิลลิเมตร ก่อนที่จะป้ายสปอร์ของเชื้อราบริเวณแผล โดยแทงตาอ้อยบนท่อนพันธุ์ขนาด 1 ตา วิธีนี้เป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็วและดีที่สุด การทดลองของ Mohanraj *et al.* (1987) พบว่า การฉีด teliospore

ของเชื้อความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เข้าสู่บริเวณตรงกลางของตาอ้อย จะแสดงอาการของโรคได้รวดเร็วที่สุด แต่การทดสอบโดยการทำแผลท่อนพันธุ์และแช่ท่อนพันธุ์ใน spore suspension ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จะทำให้อ้อยแสดงอาการของโรค โดยความสูงของต้นอ้อยจะลดลงและการเกิดแส้จะใช้เวลานาน วันชัย (2522) ปลูกเชื้อโดยใช้สารละลายสปอร์ 100 กรัม/น้ำ 5 ลิตร พบว่า วิธีแช่ท่อนพันธุ์ด้วยเชื้อก่อนปลูกทำให้อ้อยเป็นโรคสูงสุด คือ 75% และการฉีดตายอดให้ผลรองลงมา สุวนิตย์ (2524) พบว่า การฉีด chlamydospore suspension และ 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 พบว่า การฉีด chlamydospore suspension ในอ้อยเกิดโรครุนแรงมากกว่า การปลูกเชื้อด้วย sporidia suspension โดยอ้อยเริ่มแสดงอาการของโรคหลังจากปลูกเชื้อ 2 เดือน อนุสรณ์ และคณะ (2529) ทำการปลูกเชื้อลงบนท่อนพันธุ์อ้อยที่ศึกษาปฏิกิริยาการเกิดโรคแส้ดำ โดยแช่ท่อนพันธุ์อ้อยขนาด 2 ตา ลงในน้ำผสมสปอร์เข้มข้น 1×10^8 สปอร์/มิลลิลิตร 30 นาที

การตรวจสอบโรคแส้ดำอ้อยด้วยกล้องจุลทรรศน์และเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่จากดีเอ็นเอต้นแบบ จากลักษณะการเจริญของเชื้อรา *U. scitaminea* อ้อยที่ได้รับการปลูกเชื้อหรือถูกเชื้อเข้าทำลาย เชื้อจะมีการเจริญและพัฒนาภายใน ต้นอ้อยที่ได้รับเชื้อจะแสดงอาการของโรคคือการสร้างแส้นั้นจะใช้เวลานานมากกว่า 2 เดือนขึ้นไปหลังจากทำการปลูกเชื้อ หรืออาจพบเห็นโรคเมื่ออ้อยมีการเจริญในระยะอ้อยตอ การศึกษาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อในอ้อยก่อนการสร้างแส้จึงเป็นวิธีการหนึ่งในการตรวจสอบปฏิกิริยาของอ้อยต่อเชื้อ และลดระยะเวลาในการทดสอบพันธุ์เพื่อการคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน จึงมีการศึกษาถึงวิธีการในการตรวจเชื้อก่อนที่ต้นอ้อยจะแสดงอาการ ซึ่งมีการศึกษาไว้หลากหลายวิธี ได้แก่ พัฒนาเทคนิคการตรวจโดยใช้ trypan blue ย้อมสีเชื้อบริเวณ nodal bud พบว่าสามารถย้อมสีเส้นใยของเชื้อได้ภายใน 4 ชั่วโมงหลังทำการปลูกเชื้อและตรวจพบเชื้อเฉพาะในต้นอ้อยที่เป็นโรคแต่ไม่พบในอ้อยปกติ (Sinha *et al.,* 1982)

นอกจากนี้ ยังมีการนำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้โดยการพัฒนาไพรเมอร์ *b*E4 และ *b*E8 ในการเพิ่มปริมาณยีน *b*E ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของเส้นใยในระยะ dikaryon ที่สามารถเข้าทำลายอ้อยได้ (Albert and Schenck, 1996)

Schenk (1998) ศึกษาการตรวจสอบการเกิดแส้ดำอ้อยด้วยเทคนิค PCR พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อรา *U. scitaminea* ได้ในต้นอ้อยที่ปลูกเชื้อและการวิเคราะห์ผล PCR สอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การสร้างแส้ในต้นอ้อยที่ปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงทดลอง การตรวจสอบด้วย PCR มีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการตรวจสอบเส้นใยของเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตรวจสอบการเกิดโรคด้วยเทคนิค PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *U. scitaminea* ในขณะที่ต้นอ้อยไม่แสดงอาการของโรค Singh *et al.* (2004) ศึกษาการตรวจสอบการเกิดโรคแส้ดำด้วยเทคนิค PCR พบว่า สามารถตอบสนองได้เป็นอย่างดีต่อเชื้อสาเหตุ การวิเคราะห์ PCR ยังสามารถตรวจสอบ sporidia ที่เป็น single mating-type การตรวจสอบโรคด้วยวิธีดังกล่าวมีประสิทธิภาพดีกว่าการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

วรัญญา (2550) ได้ศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *U. scitaminea* ภายในต้นกล้าอ้อยหลังทำการปลูกเชื้อ ก่อนการแสดงอาการของโรค โดยวิธีการย้อมสีเนื้อเยื่ออ้อยด้วยสีย้อม trypan blue แล้วนำไปตรวจหาเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR การตรวจเชื้อด้วยสีย้อม trypan blue สามารถตรวจพบเชื้อ 1 วัน หลังทำการปลูกเชื้อ และตรวจพบเชื้อในทุกระยะและทุกพันธุ์ที่ทำการทดสอบ ขณะที่การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อหลังทำการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และตรวจพบเฉพาะในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 และพันธุ์อู่ทอง 1 ได้ขนาดแถบดีเอ็นเอ 450 bp ซึ่งตรวจไม่พบในอ้อยพันธุ์ K84-200 และ H59-3775

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเลี้ยงเชื้อและการเพิ่มปริมาณเชื้อบริสุทธิ์

1.1 การเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุของโรค

การเก็บรวบรวม teliospore ของเชื้อรา *U. scitaminea* จากอ้อยที่แสดงอาการของโรคแส้ดำ โดยตัดส่วนที่เป็นแส้ นำมาผึ่งให้แห้งเป็นเวลา 3 วัน เคาะ teliospore ออก จากนั้นร่อนด้วยตะแกรงขนาด 60 mesh นำ teliospore ที่ได้เก็บใส่ขวดฝาเกลียว นำไปดูดความชื้นในโถดูดความชื้นนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นานประมาณ 3-4 เดือน

1.2 การเตรียมเส้นใย

นำ teliospore ของเชื้อรา *U. scitaminea* มาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ ในอัตราส่วน 1 : 10 ในไมโครทิวป์ (microtube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรด์ออก ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จึงนำไปทำ dilution plate บนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ผสม streptomycin ความเข้มข้น 100 ppm เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้น 3 วัน ย้ายโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อไปบนอาหาร PDA อันใหม่ ให้เชื้อเจริญเป็นเส้นใย

1.3 การเตรียม sporidia

โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ตัดเส้นใยของเชื้อที่เจริญบนอาหารPDA อายุ 2 สัปดาห์ ย้ายไปเลี้ยงในอาหารเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) ใน flask ขนาด 100 มิลลิลิตร นำไปวางไว้บนเครื่องเขย่านาน 3 วัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 3 นาที ได้ sporidia นำไปใช้ต่อไป

2. การปลูกเชื้อสาเหตุของโรค

2.1 การเตรียมอ้อยทดสอบ

ในการทดลองใช้อ้อยทั้งหมด 4 พันธุ์ คือ พันธุ์กำแพงแสน 94-13 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม, พันธุ์อู่ทอง1 จากศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี, และพันธุ์ K84-200 และ H59-3775 จากศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายภาคกลาง อำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี นำพันธุ์อ้อยที่ได้มาปลูก โดยนำท่อนพันธุ์มาตัดเป็นท่อน 1 ท่อนต่อ 1 ตา ปลูกลงกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 นิ้ว ในสภาพโรงเรือนทดลอง

2.2 วิธีการปลูกเชื้อสาเหตุ

ในการปลูกเชื้อ ใช้สปอร์ในการทดลอง 2 แบบ คือ teliospore (chlamydospore) และ sporidia (basidiospore) เตรียม spore suspension โดยนำ teliospore หรือ sporidia ผสมในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้ haemacytometer ในการตรวจนับสปอร์ จากนั้นทำการปลูกเชื้อ 2 วิธีการ ดังนี้

2.2.1 ปลูกเชื้อด้วยการฉีด spore suspension ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาในต้นอ้อย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บริเวณโคนต้นเหนือดินประมาณ 1 เซนติเมตร

2.2.2 ปลูกเชื้อบนท่อนพันธุ์โดยใช้ท่อนพันธุ์อ้อย 1 ท่อนต่อ 1 ตา แช่ในสปอร์แขวนลอย teliospore 10 กรัม/น้ำ 1 ลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นของสปอร์ประมาณ 10^6-10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทิ้งไว้ 1 คืน ก่อนปลูก

3. วิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อย

3.1 การตรวจเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ด้วยกล้องจุลทรรศน์

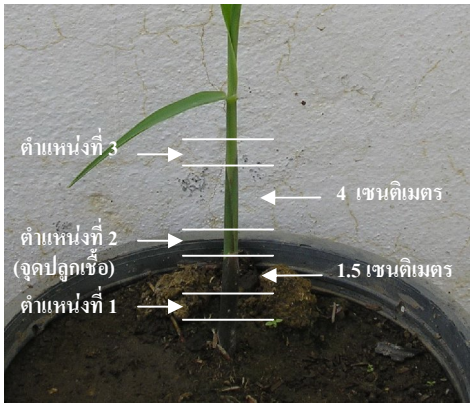
ตรวจเชื้อรา *U. scitaminea* ในเนื้อเยื่ออ้อยโดยนำต้นอ้อยที่ทำการปลูกเชื้อแล้วมาตรวจด้วยการทำ free hand section โดยการ cross-section บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ 4 เซนติเมตร บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ 1.5 เซนติเมตร แต่ละตำแหน่งที่นำมาทดสอบให้มีความยาว 1 เซนติเมตร จากนั้นย้อมสีด้วย trypan blue โดยเตรียม 0.1% trypan blue ผสมกับ 6% sodium hydroxide อัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยปริมาตร นำเนื้อเยื่อที่ทำการตัดในตำแหน่งต่างๆ ใส่ลงในสีย้อมในหลอด microtube ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เติม 80 % ethanol นาน 2 นาที เพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ เติม lactophenol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 2 นาที จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อลงบนแผ่นสไลด์แก้วที่มี lactophenol ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400 X

3.2 การตรวจเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow โดยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

3.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ วรัญญา (2550) โดยนำตัวอย่างพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อโดยตัด section บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ 4 เซนติเมตร บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ 1.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ จำนวน 0.5 กรัม บดในโกร่ง โดยเติมไนโตรเจนเหลว ให้ชิ้นส่วนพืชแข็งตัว เพื่อง่ายต่อการบด ย้ายชิ้นส่วนลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม extraction buffer (2% CTAB, 1.4 mM NaCl, 0.2 M EDTA, 100 mM Tris HCl pH 7.5) ปริมาตร 396 ไมโครลิตร และ β-mercaptoethanol ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สกัดโปรตีนออกจากดีเอ็นเอด้วยการเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที แล้วดูดสารละลายใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย

isopropanol (เย็น) 0.6 เท่าของสารละลาย เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เก็บตะกอนโดยการเทสารละลายใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 99.9% ethanol (เย็น) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที เทส่วนของ 99.9% ethanol ออก ละลายตะกอนใน buffer TE [1 ลิตร: 1 M Tris-HCl (pH8.0) 10 ลิตร, 0.5 EDTA(pH8.0) 2 มิลลิลิตร] ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 1 ภาพแสดงตำแหน่งการปลูกเชื้อ และตำแหน่งที่นำมาตรวจสอบ โดยระยะระหว่างตำแหน่งที่นำมาตรวจมีขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร
ตำแหน่งที่ 1 = ใต้บริเวณตำแหน่งที่ปลูกเชื้อ 1.5 เซนติเมตร
ตำแหน่งที่ 2 = บริเวณตำแหน่งที่ปลูกเชื้อ
ตำแหน่งที่ 3 = เหนือบริเวณตำแหน่งที่ปลูกเชื้อ 4 เซนติเมตร

3.2.2 การทำ polymerase chain reaction (PCR)

นำ DNA พืชที่สกัดมาทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ *b*E4 (5'-CGCTCTGGTT CATCAAACG-3') และไพรเมอร์ *b*E8 (5'-TGCTGTCGATGGAAGGTGT-3') (Albert and Schenck, 1996) โดยทำปฏิกิริยาปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย DNA 5 ไมโครลิตร dNTPs 2 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase enzyme (5 unit) 0.15 ไมโครลิตร $MgCl_2$ 2.5 มิลลิโมลาร์ 2 ไมโครลิตร ไพเมอร์ (*b*E4 และ *b*E8) 1 ไมโครโมลาร์ 10X PCR buffer 2.5 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ PCR program เริ่มต้นด้วย denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที annealing ที่ 52 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และ extention ที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ ผลผลิตที่ได้เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค electrophoresis

3.2.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีการ electrophoresis

ใช้อะกาโรส 1% ใน buffer TBE (5X: Tris base 54 g, Boric acid (H_3BO_3) 27.5 g, 0.5 M EDTA (pH8) 20 ml) ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ เป็นเวลา 30-45 นาที ตรวจดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

4. การทดสอบการแสดงออกของอ้อยในพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองต่อโรคแส้ดำ

ทำการทดสอบโดยการปลูกเชื้อในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 K84-200 อู่ทอง1 และ H59-3775 ด้วยการฉีด teliospore เข้มข้น 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาในต้นอ้อย อายุ 2 สัปดาห์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บริเวณโคนต้นเหนือดินประมาณ 1 เซนติเมตร (วรัญญา, 2550) ทำการทดลองทั้งหมด 10 ต้นต่อหนึ่งพันธุ์ บันทึกผลการเกิดโรคทุกๆ 1 เดือน เป็นเวลา 4 เดือน

5. ศึกษาการตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อย

5.1 การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในลำต้นอ้อย โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension

โดยใช้ท่อนพันธุ์ 1 ท่อนต่อ 1 ตา ปลูกลงกระถางๆ ละ 1 ท่อน เมื่ออายุครบ 2 สัปดาห์ จึงทำการปลูกเชื้อ โดยเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุและเพิ่มปริมาณเชื้อตามวิธีในข้อ 1.1 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ จากนั้นทำการปลูกเชื้อสาเหตุด้วยการฉีด sporidia ตามวิธีในข้อ 2.2.1 นำมาตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ โดยในการตรวจแต่ละครั้งจะทำทั้งหมด 4 ซ้ำ (ต้น) โดยนำต้นอ้อยที่ทำการปลูกเชื้อแล้วครบตามระยะเวลาต่างๆ มาทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีในข้อ 3.1 และด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีในข้อ 3.2 โดยทำการทดลอง 2 การทดลอง ดังนี้

5.1.1 การทดลองที่ 1 ทำการศึกษาในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 K84-200 และอู่ทอง1_หลังการปลูกเชื้อ 0 1 และ 28 วัน นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยในการตรวจสอบแต่ละระยะเวลา จะทำการสุ่มตัวอย่างมา 4 ต้น จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อ 16 ต้นต่อพันธุ์ และทำการสุ่มมา 4 ต้น จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อโดยไม่ใส่เชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) 16 ต้นต่อพันธุ์ นำต้นอ้อยมาทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีในข้อ 3.2

5.1.2 การทดลองที่ 2 แตกต่างจากการทดลองที่ 1 โดยการเพิ่มพันธุ์ที่ใช้อีก 1 พันธุ์ โดยใช้วิธีการตรวจเชื้อ 2 วิธี และที่ระยะเวลาตรวจต่างกัน ในการทดลองนี้ใช้อ้อยพันธุ์กำแพงแสน 94-13 K84-200 อู่ทอง1 และ H59-3775 ทำการตรวจเชื้อที่ 4 และ 8 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ นำมาตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตรวจเมื่ออ้อยระยะเวลามากขึ้น คือ 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ หลังการปลูกเชื้อ นำมาตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR โดยแต่ละระยะเวลาการตรวจจะทำการสุ่มตัวอย่างมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อ 16 ต้นต่อพันธุ์ และทำการสุ่มมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อโดยไม่ใส่เชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) 16 ต้นต่อพันธุ์ นำต้นอ้อยมาทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ในตำแหน่งต่างๆ ตามวิธีในข้อ 3.1 และเทคนิค PCR ตามวิธีในข้อ 3.2

5.2 ศึกษาปัจจัยของอายุและขนาดลำต้นอ้อยต่อการตรวจพบเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อย โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension

โดยทำการทดสอบกับอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 ที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 อายุ 2 สัปดาห์ โดยอ้อยกลุ่มนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 5.5 มิลลิเมตร และน้อยกว่า 6.5 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 2 อายุ 2 สัปดาห์ อ้อยกลุ่มนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 6.5 มิลลิเมตร และน้อยกว่า 8 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 3 อายุ 3 สัปดาห์ อ้อยกลุ่มนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 6 มิลลิเมตร และน้อยกว่า 8 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ 4 อายุ 3 สัปดาห์ อ้อยกลุ่มนี้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 8 มิลลิเมตร และน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2) โดยใช้ท่อนพันธุ์ 1 ท่อนต่อ 1 ตา ปลูกลงกระถางๆ ละ 1 ท่อน เมื่ออายุครบ 2 สัปดาห์ จึงทำการปลูกเชื้อโดยเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุและเพิ่มปริมาณเชื้อตามวิธีในข้อ 1.1 1.2 และ 1.3 ตามลำดับ จากนั้นทำการปลูกเชื้อสาเหตุด้วยการฉีด sporidia ตามวิธีในข้อ 2.2.1 ที่ระยะเวลา 1 7 14 21 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ โดยแต่ละระยะเวลาการตรวจจะทำการสุ่มตัวอย่างมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อ 40 ต้นต่อกลุ่ม และทำการสุ่มมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อโดยไม่ใส่เชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) 40 ต้น นำต้นอ้อยมาตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ในตำแหน่งต่างๆ ตามวิธีในข้อ 3.1 และเทคนิค PCR ตามวิธีในข้อ 3.2

ก ข ค ง

ภาพที่ 2 ลักษณะอ้อยที่อายุและขนาดต้นในกลุ่มต่างๆ

ก. กลุ่มที่ 1 อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5-6.5 มิลลิเมตร

ข. กลุ่มที่ 2 อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5-8 มิลลิเมตร

ค. กลุ่มที่ 3 อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร

ง. กลุ่มที่ 4 อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8-10 มิลลิเมตร

5.3 การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในลำต้นอ้อย โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension

โดยทำการทดลอง 2 การทดลอง ดังนี้

5.3.1 ศึกษาในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 โดยตัดท่อนพันธุ์ 1 ท่อนต่อ 1 ตา ใช้ท่อนพันธุ์ 40 ท่อนต่อพันธุ์ โดยเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุตามวิธีในข้อ 1.1 จากนั้นทำการปลูกเชื้อสาเหตุโดยการแช่ท่อนพันธุ์ด้วย teliospore ตามวิธีในข้อ 2.2.2 หลังจากปลูกเชื้อ 4 6 8 สัปดาห์ และ 3 เดือน หลังปลูกเชื้อ โดยแต่ละระยะเวลาการตรวจจะทำการสุ่มตัวอย่างมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อ 40 ต้น และทำการสุ่มมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อโดยไม่ใส่เชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) 40 ต้น นำต้นอ้อยมาทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ในตำแหน่งต่างๆ ตามวิธีในข้อ 3.1 และเทคนิค PCR ตามวิธีในข้อ 3.2

5.3.2 ศึกษาในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 K84-200 อู่ทอง1 และ H59-3775 โดยทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 5.3.1 จากนั้นนำมาตรวจเชื้อในอายุ 1 2 และ 3 เดือน โดยแต่ละระยะเวลาการตรวจจะทำการสุ่มตัวอย่างมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อ 32 ต้นต่อพันธุ์ และทำการสุ่มมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อโดยไม่ใส่เชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) 32 ต้นต่อพันธุ์ นำต้นอ้อยมาทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ในตำแหน่งต่างๆ ตามวิธีในข้อ 3.1 และเทคนิค PCR ตามวิธีในข้อ 3.2

6. การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในลำต้นที่มีความแตกต่างของระดับความต้านทานโรคแส้ดำ

ในการทดลองนี้จะทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด spore suspension โดยใช้สปอร์ 2 แบบ คือ sporidia และ teliospore ในกล้าอ้อย อายุ 2 สัปดาห์ ทำการศึกษาในอ้อย 2 พันธุ์ ที่แสดงอาการของโรคแส้ดำแตกต่างกันในสภาพแปลง คือ พันธุ์K84-200 ซึ่งเป็นพันธุ์ต้านทานโรคในสภาพแปลง และพันธุ์กำแพงแสน94-13 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่พบการแสดงอาการโรคในสภาพแปลง โดยเก็บรวบรวมเชื้อสาเหตุและเพิ่มปริมาณเชื้อตามวิธีในข้อ 1.1 1.2 และ 1.3 หลังปลูกเชื้อ 1 7 14 21 และ 28 วัน โดยแต่ละระยะเวลาการตรวจจะทำการสุ่มตัวอย่างมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อวิธีละ 40 ต้นต่อพันธุ์ และทำการสุ่มมา 4 ต้นต่อวิธีการตรวจ จากต้นที่ทำการปลูกเชื้อโดยไม่ใส่เชื้อ

(กรรมวิธีควบคุม) 40 ต้นต่อพันธุ์ นำต้นอ้อยมาทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ในตำแหน่งต่างๆ ตามวิธีในข้อ 3.1 และเทคนิค PCR ตามวิธีในข้อ 3.2

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ A411 เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเกษตร กำแพงแสน อาคารเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

โรงเรือนทดลอง ศูนย์วิจัยและพัฒนาอ้อยและน้ำตาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือน มิถุนายน 2549 – เมษายน 2551

ผลการทดลอง

1. การทดสอบการแสดงออกของโรคแส้ดำ ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง

จากการทดลองปลูกเชื้อโดยวิธีการฉีด teliospore suspension ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ในต้นกล้าอ้อยอายุ 2 สัปดาห์ ในอ้อย 4 พันธุ์ คือ พันธุ์กำแพงแสน94-13 K84-200 อู่ทอง1 และ H59-3775 โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ (ต้น) หลังปลูกเชื้อ 4 เดือน พบว่า อ้อยพันธุ์H59-3775 มีการสร้างแส้มากที่สุด โดยมีการสร้างแส้จำนวน 5 ต้น รองลงมาได้แก่ พันธุ์กำแพงแสน94-13 มีการสร้างแส้ 4 ต้น ส่วนพันธ์อู่ทอง 1 และพันธุ์K84-200 มีการสร้างแส้ 3 ต้น ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าอ้อยมีการแสดงอาการผิดปกตินอกเหนือจากการสร้างแส้ คือ มีการแตกกอตะไคร้ จำนวน 3 1 3 และ 2 ต้น ตามลำดับ เมื่อทำการจัดระดับความต้านทานโรค โดยใช้ระดับความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคตามวิธีของ Comstock and Heinz (1977) พบว่า อ้อยพันธุ์K84-200 อู่ทอง 1 แสดงระดับความต้านทานโรคแบบต้านทานปานกลาง (M) ส่วนในพันธุ์กำแพงแสน94-13 และ H59-3775 แสดงระดับความต้านทานโรคแบบค่อนข้างอ่อนแอ (MS) (ตารางที่ 1) โดยในอ้อยที่ทำการปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแทนการใช้สปอร์ (กรรมวิธีควบคุม) พบว่า ไม่มีการแสดงอาการของโรค

ตารางที่ 1 การแสดงออกของโรคแส้ดำ ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ ที่ระยะเวลา 4 เดือน หลังปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด teliospore suspension

พันธุ์	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค	ความต้านทานโรค [1/]
K84-200	30	M
อู่ทอง1	30	M
กำแพงแสน94-13	40	MS
H59-3775	50	MS

หมายเหตุ [1/] ความต้านทานโรค จัดแบ่งตามเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ดังนี้ พันธุ์ต้านทาน (R) = 3-6 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ค่อนข้างต้านทาน (MR) = 7-20 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ต้านทานปานกลาง (M) = 21-30 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์ค่อนข้างอ่อนแอ (MS) = 31-60 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์อ่อนแอ (S) = 61-100 เปอร์เซ็นต์

2. การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อย โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension

2.1 การทดลองที่ 1

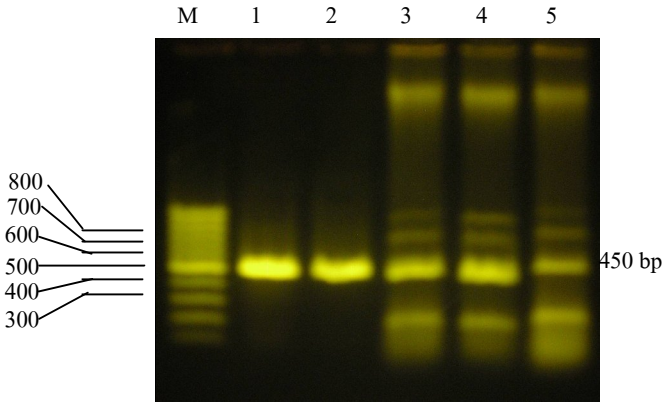
จากการปลูกเชื้อในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 K84-200 และอู่ทอง1 (ในอ้อยพันธุ์ H59-3775 ไม่ทำการทดลอง เนื่องจากไม่มีท่อนพันธุ์ในช่วงระยะเวลาที่ทำการทดลอง) ด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในต้นอ้อยที่มีอายุ 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นอ้อยที่ปลูกเชื้อแล้วมาตรวจหาเชื้อสาเหตุของโรคแส้ดำด้วยเทคนิค PCR โดยทำการตรวจที่ระยะเวลา 0 1 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุในอ้อยทั้ง 3 พันธุ์ ได้ตั้งแต่ระยะแรกของการตรวจ ได้แถบดีเอ็นเอของเชื้อ *U. scitaminea* มีขนาด 450 bp (ภาพที่ 3) ในอ้อยพันธุ์K84-200 อู่ทอง 1 และกำแพงแสน 94-13 เมื่อทำการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR ในตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ ใต้จุดปลูกเชื้อ และเหนือจุดปลูกเชื้อ ที่ระยะเวลา 0 1 และ 28 วัน พบว่า มีการตรวจพบเชื้อหลังปลูกเชื้อที่ 0 วัน ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 มากที่สุด เท่ากับ 83.3 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาได้แก่ พันธุ์อู่ทอง1 และ K84-200 โดยมีการตรวจพบ 66.7 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังปลูกเชื้อ 1 วัน ตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1 มากที่สุด เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาได้แก่ พันธุ์กำแพงแสน 94-13 และ K84-200 โดยมีการตรวจพบ 83.3 และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะเวลา28 วัน หลังปลูกเชื้อ มีการตรวจพบเชื้อมากที่สุดในอ้อยพันธุ์ K84-200 เท่ากับ 91.7 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาได้แก่ พันธุ์อู่ทอง 1 และกำแพงแสน94-13 โดยมีการตรวจพบ 83.3 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการตรวจในต้นอ้อยทุกพันธุ์ที่ทำการปลูกเชื้อโดยไม่ใส่เชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) พบว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อในทุกตำแหน่งและทุกระยะที่ทำการตรวจ (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 4)

ตารางที่ 2 การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ด้วยเทคนิค PCR ในอ้อยพันธุ์K84-200 กำแพงแสน94-13 และอู่ทอง 1 โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในอ้อยอายุ 2 สัปดาห์

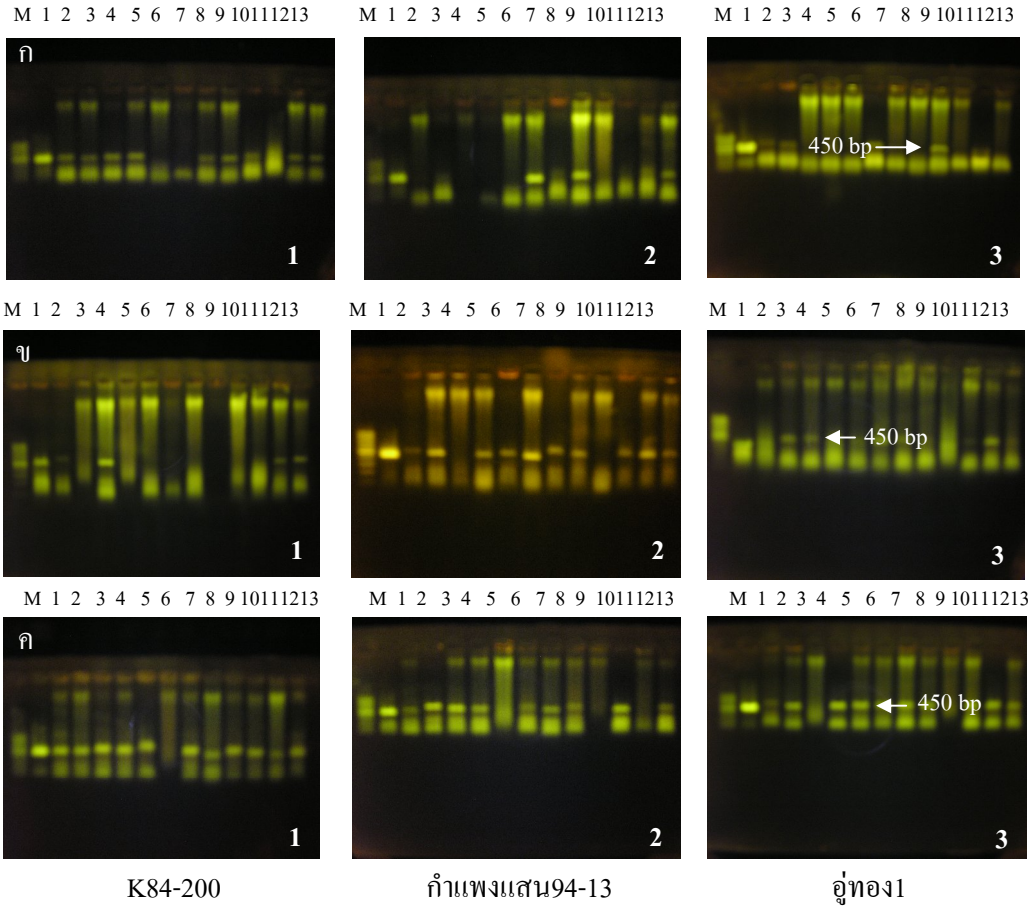
พันธุ์	ตำแหน่ง [1/] ตรวจเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ [2/]		
		0 วัน	1 วัน	28 วัน
K84-200	P_1	100	25	100
	P_2	50	25	100
	P_3	50	50	75
	$\overline{P}$	66.7	33.3	91.7
กำแพงแสน 94-13	P_1	100	100	100
	P_2	75	100	50
	P_3	75	50	75
	$\overline{P}$	83.3	83.3	75
อู่ทอง1	P_1	50	100	100
	P_2	75	100	100
	P_3	25	100	50
	$\overline{P}$	50	100	83.3

หมายเหตุ [1/] ตำแหน่งตรวจเชื้อ P_1 = ใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_2 = บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_3 = เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และ $\overline{P}$ = ค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งที่ตรวจเชื้อ ($P_1 + P_2 + P_3$)

[2/] เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ โดยคำนวณจากจำนวนต้นที่ทดสอบ 4 ต้น



ภาพที่ 3 ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 450 bp จากการตรวจเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow จากดีเอ็นเอของ sporidia mycelium และการตรวจภายในเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ต่างๆ ที่ระยะเวลา 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ด้วยไพรเมอร์ *b*E4 และ *b*E8 เมื่อ lane M: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia; lane 2 : mycelium; lane 3: อ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13; lane 4: อ้อยพันธุ์K84-200 และ lane 5: อ้อยพันธุ์อู่ทอง 1



ภาพที่ 4 ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์ K84-200 (1) กำแพงแสน94-13 (2) และอู่ทอง1 (3) ที่ระยะเวลา 0 วัน (ก) 1 วัน (ข) และ 28 วัน (ง) เมื่อ lane M: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3 4: ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 5 6 7: ต้นที่ 2; lane 8 9 10: ต้นที่ 3 และ lane 11 12 13: ต้นที่ 4

2.2 การทดลองที่ 2

ทำการตรวจหาเชื้อสาเหตุที่ระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ โดยใช้พันธุ์อ้อยทดสอบทั้งหมด 4 พันธุ์ คือ พันธุ์กำแพงแสน94-13 K84-200 อู่ทอง1 และ H59-3775 ทำการปลูกเชื้อด้วยการฉีด sporidia suspension เมื่ออ้อยอายุ 2 สัปดาห์ จากนั้นนำต้นอ้อยที่ได้ปลูกเชื้อมาตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังนี้

เมื่อนำต้นอ้อยที่ปลูกเชื้อแล้วมาตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่า ที่ 4 สัปดาห์ มีการตรวจพบเส้นใยของเชื้อสาเหตุ โดยพันธุ์ที่มีการตรวจพบเชื้อมากที่สุด คือ พันธุ์ K84-200 โดยตรวจพบเชื้อ 58.3 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาได้แก่ พันธุ์อู่ทอง 1 และ H59-3775 โดยมีการตรวจพบ 41.7 และ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 ตรวจไม่พบเชื้อในทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 5)

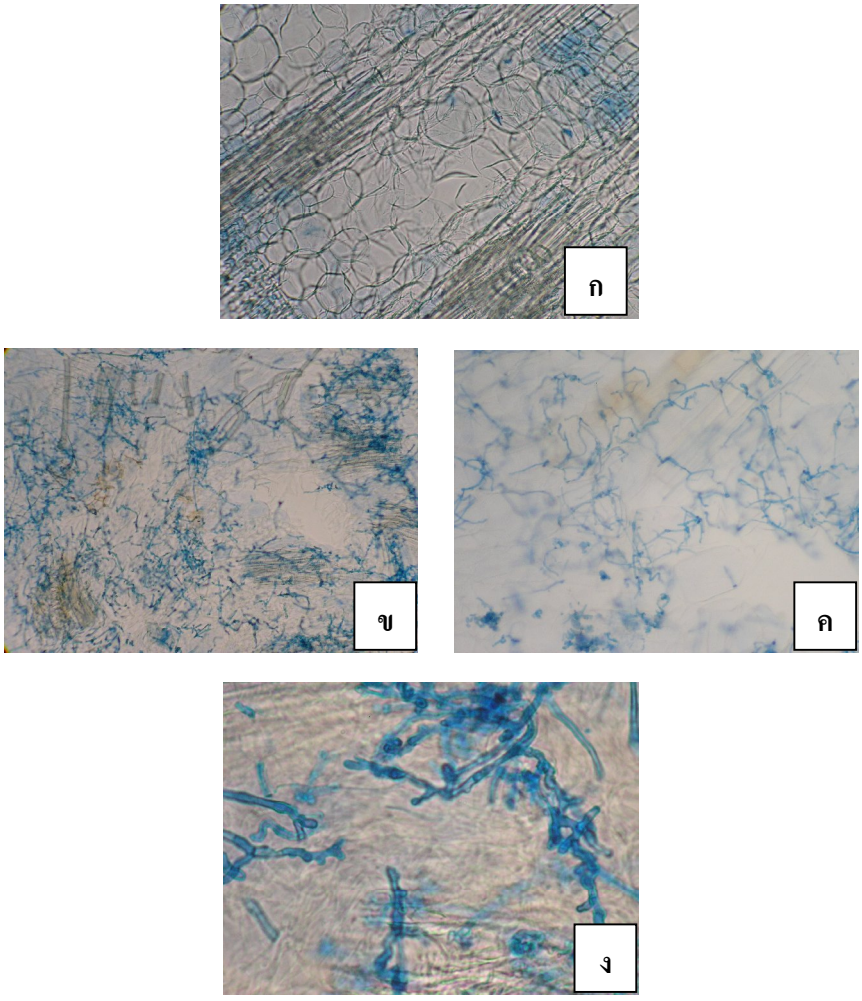
เมื่อทำการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบว่า ที่ 4 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ มีการตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์K84-200 และอู่ทอง 1 เท่ากัน โดยตรวจพบเชื้อ 66.7 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 และ H59-3775 ในทุกตัวอย่างและทุกตำแหน่งที่ทำการตรวจเชื้อ (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 6)

ตารางที่ 3 การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR ในอ้อยอายุ 4 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ ด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในต้นอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13, K84-200 อู่ทอง1 และ H59-3775 ที่อายุ 2 สัปดาห์

พันธุ์	ตำแหน่ง [1/] ตรวจเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ [2/]	
		กล้องจุลทรรศน์	PCR
K84-200	P_1	25	50
	P_2	75	50
	P_3	75	100
	$\overline{P}$	58.3	66.7
อู่ทอง1	P_1	50	75
	P_2	50	50
	P_3	25	75
	$\overline{P}$	41.7	66.7
กำแพงแสน	P_1	0	0
94-13	P_2	0	0
	P_3	0	0
	$\overline{P}$	0	0
H59-3775	P_1	50	0
	P_2	0	0
	P_3	0	0
	$\overline{P}$	16.7	0

หมายเหตุ [1/] ตำแหน่งตรวจเชื้อ P_1 = ใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_2 = บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_3 = เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และ $\overline{P}$ = ค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งที่ตรวจเชื้อ ($P_1 + P_2 + P_3$)

[2/] เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ โดยคำนวณจากจำนวนต้นที่ทดสอบ 4 ต้น

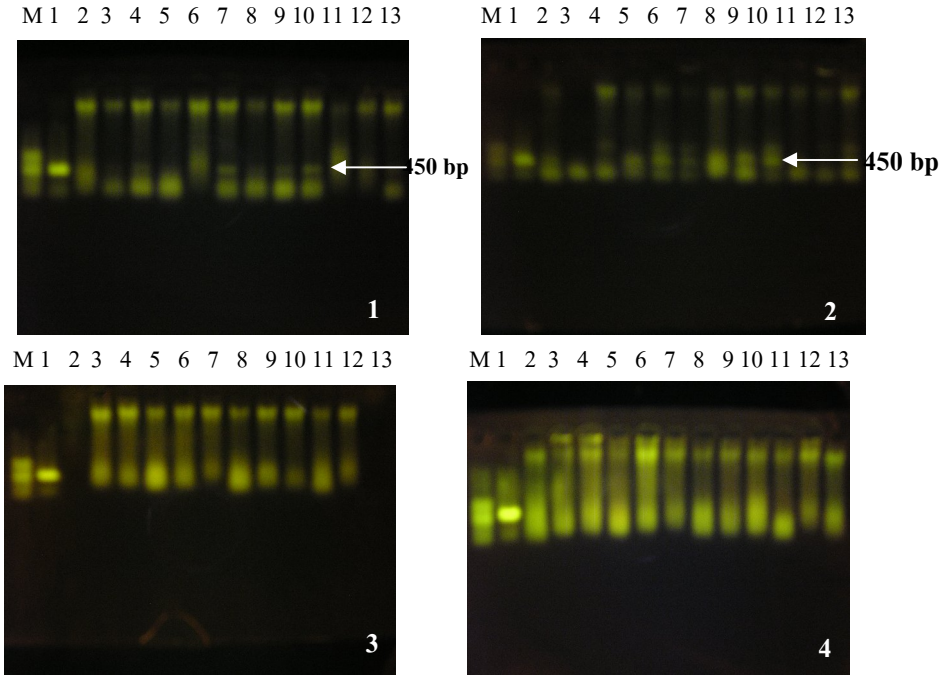


ภาพที่ 5 ลักษณะของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ที่ตรวจพบในต้นอ้อยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ระยะเวลา 28 วัน หลังปลูกเชื้อ

ก. เนื้อเยื่ออ้อยปกติที่ไม่มีเชื้อสาเหตุของโรค

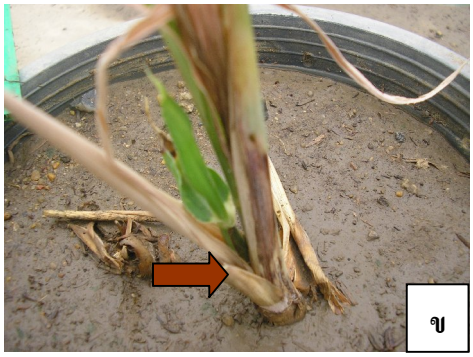
ข-ค. เนื้อเยื่ออ้อยที่มีการตรวจพบเส้นใยของเชื้อรา *U. scitaminea* ที่กำลังขยาย 100X

ง. เนื้อเยื่ออ้อยที่มีการตรวจพบเส้นใยของเชื้อรา *U. scitaminea* ที่กำลังขยาย 400X



ภาพที่ 6 ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์ K84-200 (1) อู่ทอง1(2) กำแพงแสน94-13 (3) และH59-3775 (4) ที่อายุ 4 สัปดาห์หลังปลูกเชื้อ เมื่อ lane M: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3 4: ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 5 6 7: ต้นที่ 2; lane 8 9 10: ต้นที่ 3 และ lane 1 12 13: ต้นที่ 4

หลังปลูกเชื้อ 4 สัปดาห์ พบว่า ต้นอ้อยเริ่มมีอาการตายยืนต้น และมีการแตกหน่อใหม่ 2 ลักษณะ คือ แตกหน่อใหม่บริเวณด้างข้าง กับแตกหน่อใหม่บริเวณกลางต้นที่ตาย (ภาพที่ 7) หลังปลูกเชื้อ 8 สัปดาห์ จึงทำการตรวจเชื้อจากหน่อที่แตกใหม่ โดยไม่มีการแยกตำแหน่งการตรวจ เนื่องจากต้นอ้อยที่งอกขึ้นใหม่มีขนาดเล็ก ซึ่งผลการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ พบว่า สามารถตรวจพบเส้นใยของเชื้อในอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1 กำแพงแสน94-13 และ H59-3775 โดยตรวจไม่พบเชื้อในอ้อยพันธุ์ K84-200 และเมื่อทำการตรวจเชื้อโดยเทคนิค PCR พบว่า มีการตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์อู่ทอง 1 และกำแพงแสน94-13 แต่ไม่พบเชื้อในอ้อยพันธุ์K84-200 และ H59-3775 และพบว่า การตรวจเชื้อที่ 8 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ จะตรวจพบเฉพาะในอ้อยที่มีการแตกหน่อจากบริเวณกลางยอดเดิมเท่านั้น (ตารางที่ 4 และ ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 ลักษณะของต้นอ้อยที่มีการแตกหน่อใหม่

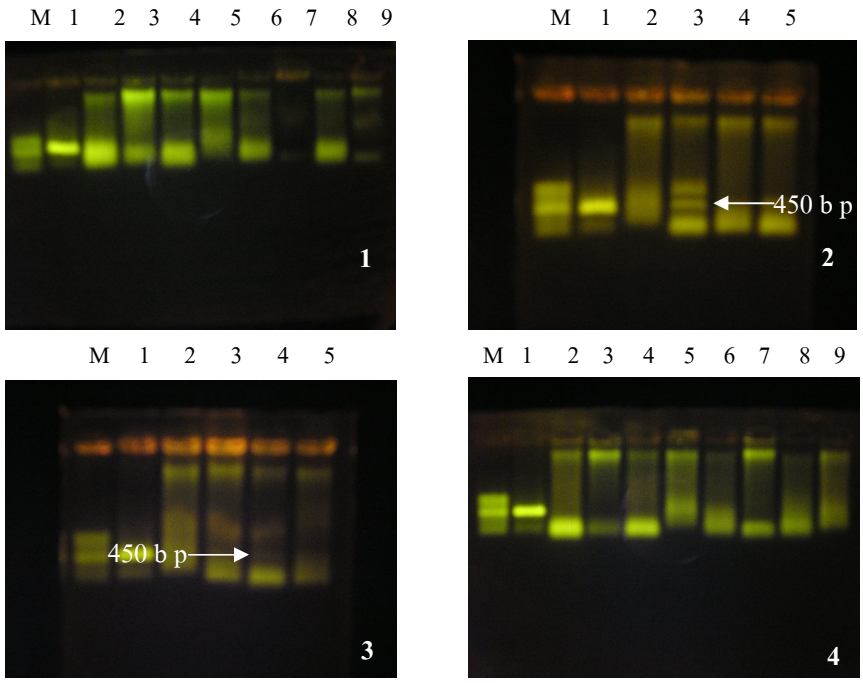
ก. แตกหน่อใหม่บริเวณด้างข้าง

ข. แตกหน่อใหม่บริเวณกลางต้นที่ตาย

ตารางที่ 4 การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR ในอ้อยพันธุ์K84-200 อู่ทอง1 กำแพงแสน94-13 และ H59-3775 ที่มีลักษณะการแตกหน่อต่างกัน ที่อายุ 8 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ ด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในอ้อยอายุ 2 สัปดาห์

พันธุ์		การตรวจพบเชื้อ							
		กล้องจุลทรรศน์				PCR			
		ลักษณะการแตกหน่อ [1/]				ลักษณะการแตกหน่อ [1/]			
		S	C	N	รวม	S	C	N	รวม
K84-200	จำนวนต้นแสดงการแตกหน่อ	2	-	2	4	3	-	1	4
	จำนวนต้นที่พบเชื้อ	0	-	0	0	0	-	0	0
อู่ทอง 1	จำนวนต้นแสดงการแตกหน่อ	2	1	1	4	2	2	-	4
	จำนวนต้นที่พบเชื้อ	0	1	-	1	0	2	-	2
กำแพงแสน	จำนวนต้นแสดงการแตกหน่อ	2	2	-	4	2	2	-	4
94-13	จำนวนต้นที่พบเชื้อ	0	2	-	2	0	2	-	2
H59-3775	จำนวนต้นแสดงการแตกหน่อ	2	1	1	4	3	-	1	4
	จำนวนต้นที่พบเชื้อ	0	1	0	1	0	-	0	0

หมายเหตุ [1/] ลักษณะการแตกหน่อ S = แตกหน่อด้านข้าง C = แตกหน่อตรงกลาง และ N = ไม่แตกหน่อ



ภาพที่ 8 ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์ K84-200 (1) และH59-3775 (4) ที่อายุ 8 สัปดาห์ หลังปลูกเชื้อ เมื่อ lane M : Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3 4: ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง ในต้นที่ไม่แตกหน่อ คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 5, 6, 7: ต้นที่ 2; lane 8: ต้นที่ 3 และ lane 9: ต้นที่ 4 ส่วนในอ้อยพันธุ์อู่ทอง1 (2) และกำแพงแสน94-13 (3); lane 2: ต้นที่ 1; lane 3: ต้นที่ 2; lane 4: ต้นที่ 3 และ lane 5: ต้นที่ 4

3. ศึกษาปัจจัยของอายุและขนาดลำต้นอ้อยต่อการตรวจพบเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อย โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension

นำอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 มาทำการทดสอบ โดยการปลูกเชื้อสาเหตุด้วยการฉีด sporidia suspension ในลำต้นอ้อยที่มีการแยกเป็นกลุ่มๆ ตามอายุและขนาด คือ กลุ่มที่ 1 อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5-6.5 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 2 อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5-8 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 3 อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ 4 อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 มิลลิเมตร จากนั้นจึงนำมาตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุด้วยกล้องจุลทรรศน์และเทคนิค PCR ที่อายุ 1 7 14 21 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ พบว่า เมื่อทำการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่ระยะเวลา 1 และ 7 วัน หลังปลูกเชื้อ ไม่สามารถตรวจพบเส้นใยของเชื้อราในอ้อยที่มีขนาดและอายุต่างกันในทุกกลุ่ม เมื่อทำการตรวจเชื้อที่ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ พบว่า มีการตรวจพบเชื้อในอ้อยกลุ่มที่ 4 มากที่สุด คือ 58.3 เปอร์เซ็นต์ และรองลงไปได้แก่อ้อยกลุ่มที่ 3 ซึ่งมีการตรวจพบเชื้อ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอ้อยกลุ่มที่ 1 และ 2 มีการตรวจพบเชื้อ 8.3 และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า มีการตรวจพบเชื้อมากเท่ากับ 58.3 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน ในอ้อยกลุ่มที่ 3 ที่ 14 และ 21 วัน และอ้อยกลุ่มที่ 2 ที่ 21 วัน หลังปลูกเชื้อ (ตารางที่ 5)

เมื่อทำการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบว่า หลังการปลูกเชื้อ 28 วัน อ้อยกลุ่มที่ 3 อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร มีการตรวจพบเชื้อทุกตัวอย่างและทุกตำแหน่งที่ทำการตรวจ (100%) และกลุ่มที่ 2 มีการตรวจพบเชื้อ 16.7 เปอร์เซ็นต์ โดยที่ระยะเวลา 1 วัน หลังปลูกเชื้อ มีการตรวจพบเชื้อในอ้อยกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 โดยมีการตรวจพบเชื้อ 58.3 และ 50 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะเวลา 14 และ 21 วัน หลังปลูกเชื้อสามารถตรวจพบเชื้อ ในอ้อยกลุ่มที่ 1 โดยมีการตรวจพบเชื้อ 16.7 และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 9)

ตารางที่ 5 การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในต้นอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 ที่มีอายุและขนาดแตกต่างกัน

กลุ่มอายุและขนาดอ้อย [1/]	ตำแหน่งตรวจเชื้อ [2/]	เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อในอ้อยที่อายุและขนาดต่างกัน [3/]				
		1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน
กลุ่มที่ 1	P_1	0	0	25	25	0
	P_2	0	0	25	25	0
	P_3	0	0	25	25	25
	$\overline{P}$	0	0	25	25	8.3
กลุ่มที่ 2	P_1	0	0	0	75	0
	P_2	0	0	25	50	75
	P_3	0	0	25	50	25
	$\overline{P}$	0	0	16.7	58.3	33.3
กลุ่มที่ 3	P_1	0	0	75	50	75
	P_2	0	0	50	50	50
	P_3	0	0	50	75	25
	$\overline{P}$	0	0	58.3	58.3	50
กลุ่มที่ 4	P_1	0	0	25	25	25
	P_2	0	0	25	50	75
	P_3	0	0	25	50	75
	$\overline{P}$	0	0	25	41.7	58.3

หมายเหตุ [1/] กลุ่มที่ 1 = อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5-6.5 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 2 = อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5-8 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 3 = อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร และ กลุ่มที่ 4 = อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 มิลลิเมตร

[2/] P_1 = ใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_2 = บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_3 = เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และ $\overline{P}$ = ค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งที่ตรวจเชื้อ ($P_1 + P_2 + P_3$)

[3/] เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ โดยคำนวณจากจำนวนต้นที่ทดสอบ 4 ต้น

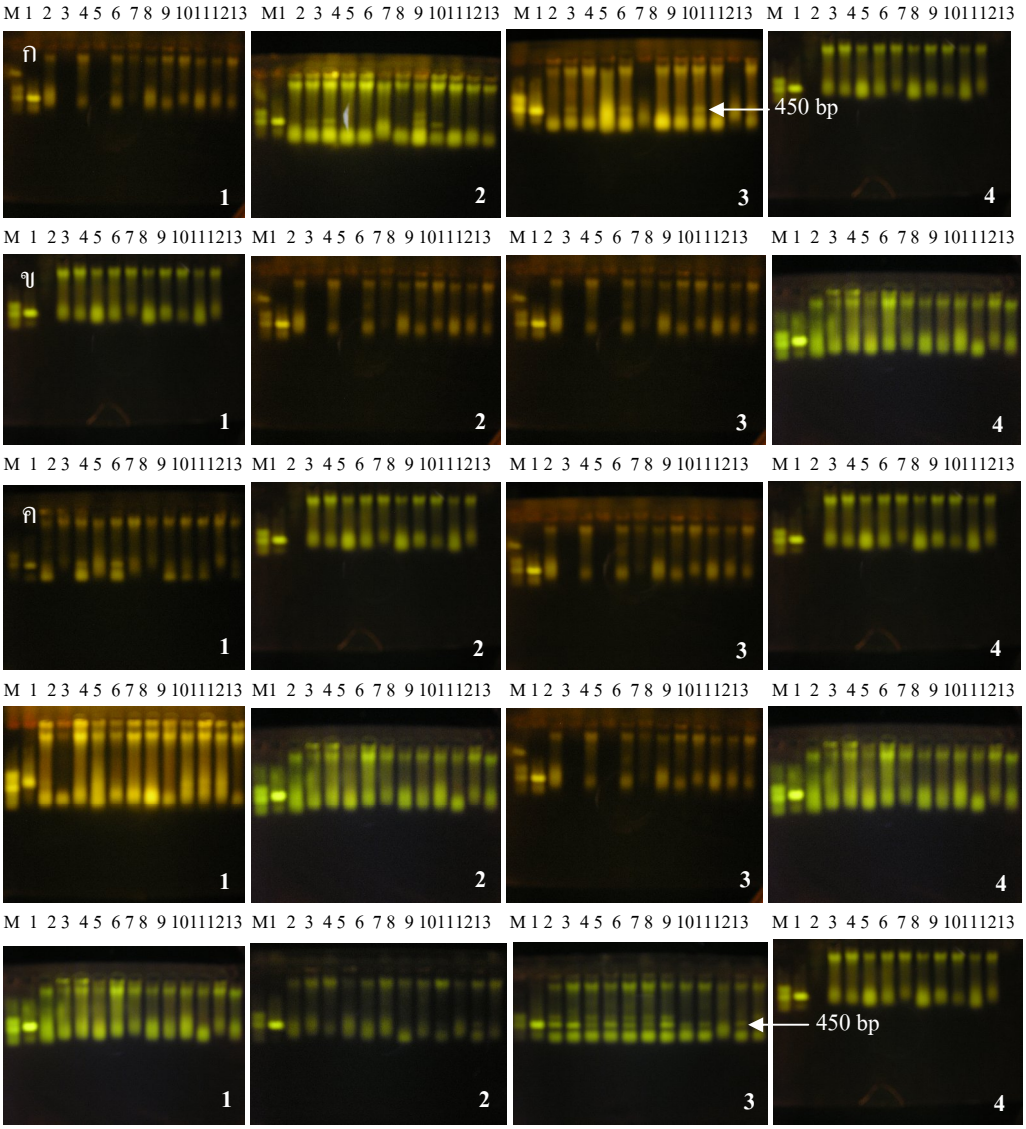
ตารางที่ 6 การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ด้วยเทคนิค PCR โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ในต้นอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 ที่มีอายุและขนาดแตกต่างกัน

กลุ่มอายุและขนาดอ้อย [1/]	ตำแหน่งตรวจเชื้อ [2/]	เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อในอ้อยที่อายุและขนาดต่างกัน [3/]				
		1 วัน	7 วัน	14 วัน	21 วัน	28 วัน
กลุ่มที่ 1	P_1	0	0	0	50	0
	P_2	0	0	25	25	0
	P_3	0	0	25	25	0
	$\overline{P}$	0	0	16.7	33.3	0
กลุ่มที่ 2	P_1	0	0	0	0	0
	P_2	100	0	0	0	25
	P_3	75	0	0	0	25
	$\overline{P}$	58.3	0	0	0	16.7
กลุ่มที่ 3	P_1	0	0	0	0	100
	P_2	75	0	0	0	100
	P_3	75	0	0	0	100
	$\overline{P}$	50	0	0	0	100
กลุ่มที่ 4	P_1	0	0	0	0	0
	P_2	0	0	0	0	0
	P_3	0	0	0	0	0
	$\overline{P}$	0	0	0	0	0

หมายเหตุ [1/] กลุ่มที่ 1 = อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5-6.5 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 2 = อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.5-8 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 3 = อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร และ กลุ่มที่ 4 = อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 มิลลิเมตร

[2/] P_1 = ใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_2 = บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_3 = เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และ $\overline{P}$ = ค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งที่ตรวจเชื้อ $(P_1+P_2+P_3)$

[3/] เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ โดยคำนวณจากจำนวนต้นที่ทดสอบ 4 ต้น



ภาพที่ 9 ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 ที่มีอายุและขนาดลำต้นแตกต่างกันทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (1) กลุ่มที่ 2 (2) กลุ่มที่ 3 (3) และกลุ่มที่ 4 (4) ช่วง 1 7 14 21 และ 28 วันหลังปลูกเชื้อ (ก ข ค ง และ จ ตามลำดับ) เมื่อ lane M: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3 4: ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ทำการปลูกเชื้อ 3 ตำแหน่ง คือ เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และใต้บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 5 6 7: ต้นที่ 2; lane 8 9 10: ต้นที่ 3 และ lane 11 12 13: ต้นที่ 4

4. การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อย โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension

การตรวจการแพร่กระจายของเชื้อในลำต้นอ้อย โดยใช้วิธีการปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension ตามวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ในการทดสอบพันธุ์อ้อยต่อโรคแส้ดำ แล้วนำต้นอ้อยมาตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR หลังปลูกเชื้อ 4 6 8 สัปดาห์ และ 3 เดือน โดยทดสอบกับอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 พบว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อในช่วงเวลาในการตรวจทั้ง 2 วิธี

เมื่อทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง โดยการใช้อ้อย 4 พันธุ์ คือ พันธุ์กำแพงแสน94-13 K84-200 อู่ทอง1 และ H59-3775 ทำการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR หลังปลูกเชื้อ 1 2 และ 3 เดือน พบว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อทุกระยะเวลาในการตรวจทั้ง 2 วิธี เมื่อทำการตรวจในต้นอ้อยที่ทำการปลูกเชื้อโดยไม่ใส่เชื้อ (กรรมวิธีควบคุม) พบว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อในทุกตำแหน่งและทุกระยะที่ทำการตรวจ

5. การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในเนื้อเยื่ออ้อยที่มีความแตกต่างของระดับความต้านทานโรคแส้ดำ

จากการทดลองนี้เป็นการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR โดยมีการปลูกเชื้อด้วยการฉีด teliospore และ sporidia suspension ในต้นอ้อยพันธุ์K84-200 และกำแพงแสน94-13 นำมาตรวจหาเชื้อสาเหตุที่ระยะเวลา 1 7 14 21 และ 28 วัน หลังปลูกเชื้อ ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการตรวจเพียง 2 ตำแหน่ง คือ จุดที่ทำการปลูกเชื้อและเหนือจุดปลูกเชื้อ ซึ่งได้ผลการทดลองดังนี้

เมื่อทำการตรวจเชื้อในอ้อยพันธุ์K84-200 และกำแพงแสน94-13 ที่ระยะเวลา 28 วัน หลังปลูกเชื้อด้วย teliospore suspension โดยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์ K84-200 มากกว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 โดยสามารถตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์ K84-200 เท่ากับ 62.5 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 เท่ากับ 37.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่า ที่ระยะเวลา 1 วัน หลังปลูกเชื้อ มีการตรวจพบ teliospore ของเชื้อ ในอ้อยที่ปลูกเชื้อด้วยการฉีด teliospore suspension เท่านั้น โดยมีการตรวจพบเชื้อในทุกตัวอย่างและทุกตำแหน่งที่ทำการ

ตรวจ (ภาพที่10) ส่วนในการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์ K84-200 มากกว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 เช่นกัน โดยสามารถตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์ K84-200 ทุกตัวอย่างและทุกตำแหน่งที่ทำการตรวจ (100%) ส่วนในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 สามารถตรวจพบเชื้อเท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 11)

เมื่อทำการตรวจเชื้อในอ้อยพันธุ์K84-200 และกำแพงแสน94-13 ที่ระยะเวลา 28 วัน หลังปลูกเชื้อด้วย sporidia suspension โดยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์ทั้ง 2 พันธุ์ ในเปอร์เซ็นต์ที่เท่ากัน คือ 37.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR พบว่า สามารถตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์K84-200 มากกว่าอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 โดยสามารถตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์ K84-200 ทุกตัวอย่างและทุกตำแหน่งที่ทำการตรวจ (100%) ส่วนในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 สามารถตรวจพบเชื้อเท่ากับ 87.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8 และภาพที่ 11)

ตารางที่ 7 การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์ K84-200 และกำแพงแสน 94-13 ที่ปลูกเชื้อโดยการฉีด teliospore suspension

ระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ	ตำแหน่ง[1/] ตรวจเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ[2/]			
		K84-200		กำแพงแสน94-13	
		กล้องจุลทรรศน์	PCR	กล้องจุลทรรศน์	PCR
1 วัน	P_1	0	75	0	75
	P_2	0	50	0	50
	$\overline{P}$	0	62.5	0	62.5
7 วัน	P_1	25	100	100	50
	P_2	25	100	100	100
	$\overline{P}$	25	100	100	75
14 วัน	P_1	75	100	25	100
	P_2	50	100	0	75
	$\overline{P}$	62.5	100	12.5	87.5
21 วัน	P_1	50	75	25	50
	P_2	25	100	50	0
	$\overline{P}$	37.5	87.5	37.5	25
28 วัน	P_1	75	100	0	50
	P_2	50	100	75	100
	$\overline{P}$	62.5	100	37.5	75

หมายเหตุ [1/] P_1 = บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_2 = เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และ $\overline{P}$ = ค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งที่ตรวจเชื้อ ($P_1 + P_2 + P_3$)

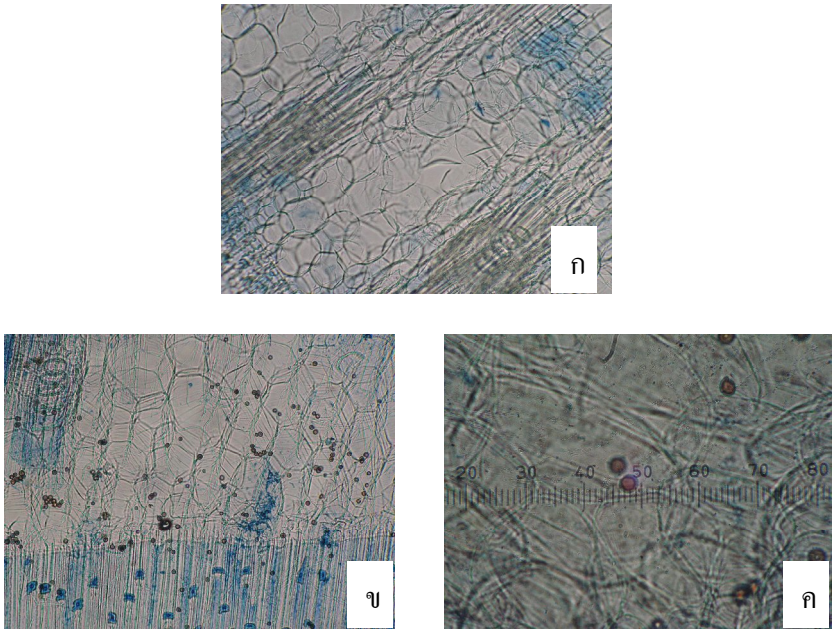
[2/] เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ โดยคำนวณจากจำนวนต้นที่ทดสอบ 4 ต้น

ตารางที่ 8 การตรวจพบเชื้อ *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์ K84-200 และกำแพงแสน 94-13 ที่ปลูกเชื้อโดยการฉีด sporidia suspension

ระยะเวลาหลังปลูกเชื้อ	ตำแหน่ง[1/] ตรวจเชื้อ	เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ[2/]			
		K84-200		กำแพงแสน94-13	
		กล้องจุลทรรศน์	PCR	กล้องจุลทรรศน์	PCR
1 วัน	P_1	0	25	0	75
	P_2	0	50	0	100
	$\overline{P}$	0	37.5	0	87.5
7 วัน	P_1	0	100	0	100
	P_2	0	100	50	50
	$\overline{P}$	0	100	25	75
14 วัน	P_1	25	75	75	100
	P_2	50	100	0	100
	$\overline{P}$	37.5	87.5	37.5	100
21 วัน	P_1	0	100	0	75
	P_2	0	100	0	50
	$\overline{P}$	0	100	0	62.5
28 วัน	P_1	50	100	25	75
	P_2	25	100	50	100
	$\overline{P}$	37.5	100	37.5	87.5

หมายเหตุ [1/] P_1 = บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ P_2 = เหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และ $\overline{P}$ = ค่าเฉลี่ยทุกตำแหน่งที่ตรวจเชื้อ ($P_1 + P_2 + P_3$)

[2/] เปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อ โดยคำนวณจากจำนวนต้นที่ทดสอบ 4 ต้น

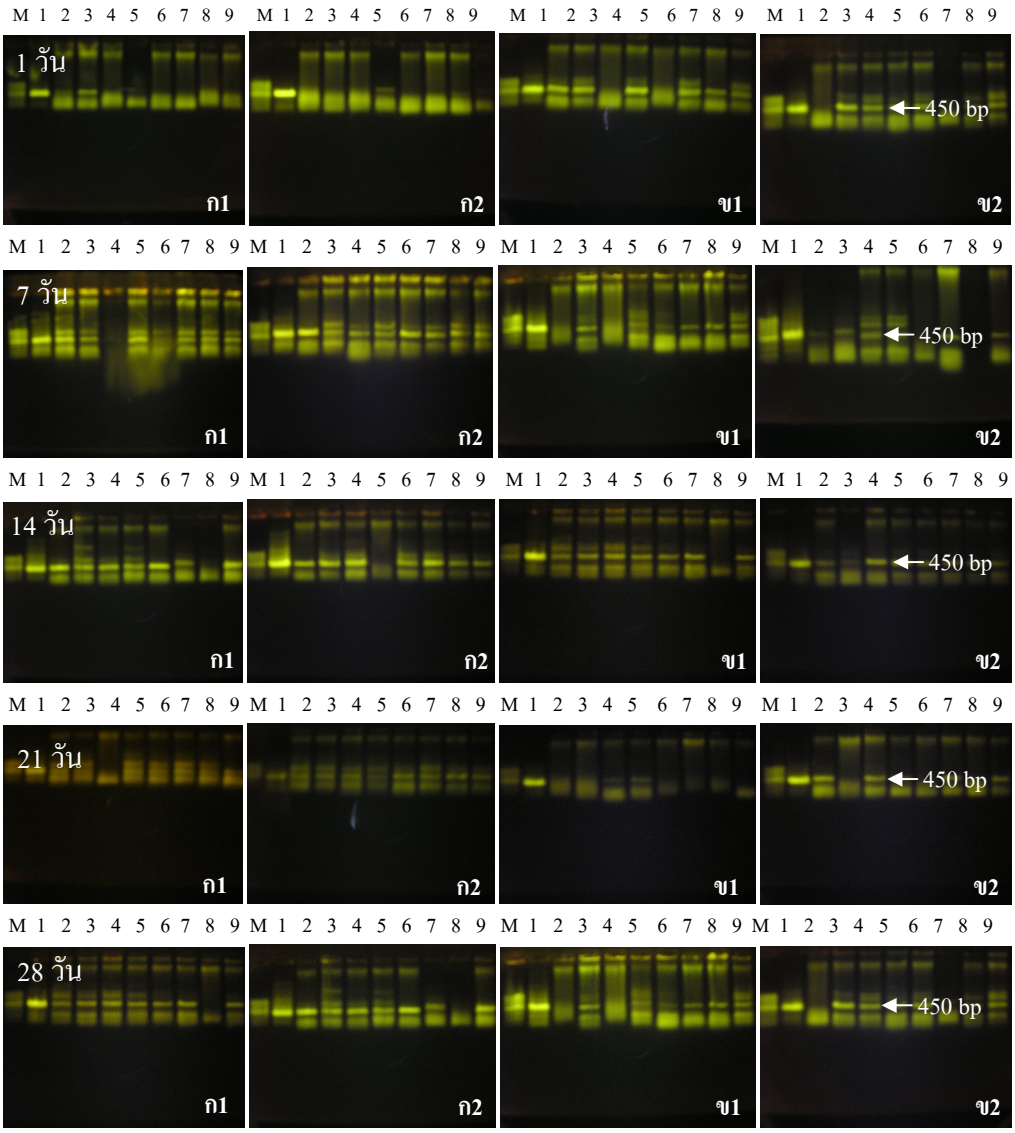


ภาพที่ 10 ลักษณะของเชื้อที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่ระยะเวลา 1 วัน หลังการปลูกเชื้อ ในอ้อยพันธุ์K84-200 และกำแพงแสน94-13

ก. เนื้อเยื่ออ้อยที่ปลูกเชื้อด้วย sporidia suspension ไม่พบ teliospore ของเชื้อ

ข. เนื้อเยื่ออ้อยที่ปลูกเชื้อด้วย teliospore suspension แสดงลักษณะของ teliospore ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่ออ้อย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100x

ค. เนื้อเยื่ออ้อยที่ปลูกเชื้อด้วย teliospore suspension แสดงลักษณะของ teliospore ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่ออ้อย ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 400x



ภาพที่ 11 ผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ต่อดีเอ็นเอเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในอ้อยพันธุ์ K84-200 (ก) และกำแพงแสน94-13 (ข) ที่ปลูกเชื้อด้วยการฉีด teliospore suspension (1) และ sporidia suspension (2) เมื่อ lane: Marker (100 bp ladder); lane 1: sporidia เชื้อ *U. scitaminea*; lane 2 3: ต้นที่ 1 บริเวณตำแหน่งที่ตรวจ 2 ตำแหน่ง คือ บริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ และเหนือบริเวณตำแหน่งปลูกเชื้อ; lane 4 5: ต้นที่ 2; lane 6 7: ต้นที่ 3 และ lane 8 9: ต้นที่ 4

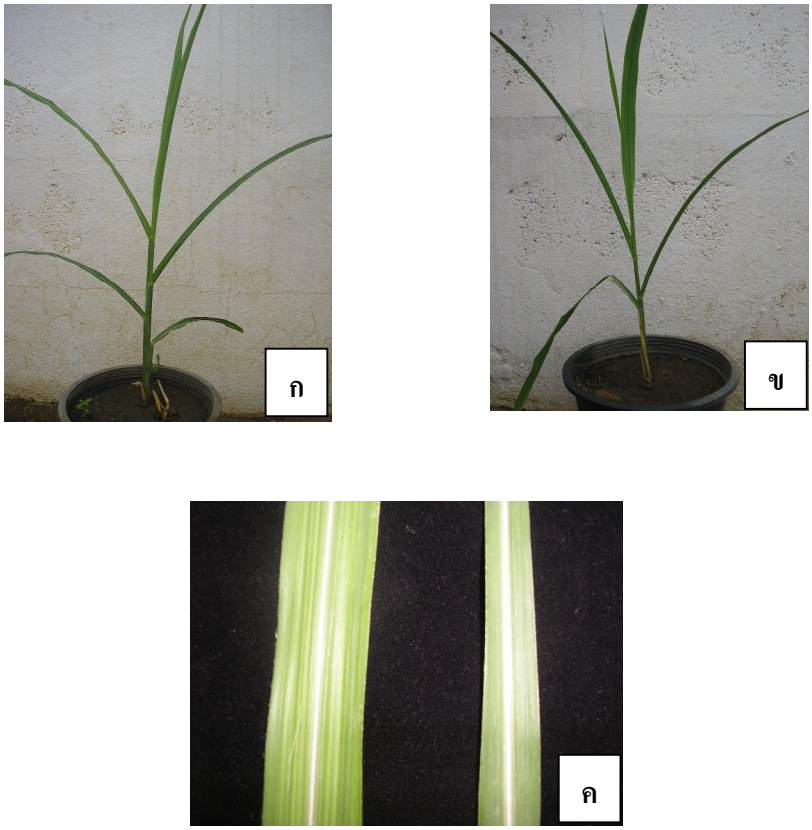
วิจารณ์ผลการทดลอง

โรคแส้ดำของอ้อยที่เกิดจากเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow มีกลไกความต้านทานโรค 2 ลักษณะ คือ ความต้านทานการเข้าติดเชื้อของตาอ้อย เป็นกลไกความต้านทานแบบที่มีอยู่แล้วก่อนการเข้าทำลายของเชื้อ (pre-infection) ซึ่งอาจเป็นกลไกความต้านทานแบบ mechanical หรือ chemical ก็ได้ และกลไกความต้านทานแบบที่เกิดขึ้นภายหลังการเข้าทำลายของเชื้อ (post-infection) เกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อราแบบ systemic เป็นกลไกความต้านทานเนื่องจากสภาพทางสรีรวิทยาของพืช (Matsuoka *et al.*, 1986) ในการศึกษาความต้านทานโรคของพันธุ์อ้อยที่ใช้ครั้งนี้ ใช้อ้อยที่มีการแสดงออกของความต้านทานโรคต่างกัน และทำการศึกษาการแสดงออกของโรคแส้ดำ ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง โดยปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด teliospore suspension ในอ้อย 4 พันธุ์ คือ พันธุ์กำแพงแสน94-13 K84-200 อู่ทอง1 และ H59-3775 หลังปลูกเชื้อ 4 เดือน พบว่า อ้อยพันธุ์H59-3775 มีการสร้างแส้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ พันธุ์กำแพงแสน94-13 อู่ทอง 1 และ K84-200 ตามลำดับ เมื่อนำมาจัดระดับความต้านทานโรค พบว่า ในอ้อยพันธุ์K84-200 และอู่ทอง 1 จัดอยู่ในระดับ 3 คือ ต้านทานปานกลางต่อโรคแส้ดำ ส่วนในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 และH59-3775 อยู่ในระดับ 4 คือ ค่อนข้างอ่อนแอต่อโรคแส้ดำ ซึ่งระดับความต้านทานของโรคในระดับแปลงของอ้อยพันธุ์K84-200 และอู่ทอง 1 เป็นพันธุ์ต้านทานต่อโรคแส้ดำ อ้อยพันธุ์ H59-3775 เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อโรค ส่วนอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 เป็นพันธุ์ที่พบการแสดงอาการของโรคแส้ดำในแปลง โดยเฉพาะในระยะอ้อยตอ ซึ่งการแสดงออกของอ้อยแต่ละพันธุ์ ให้ผลสอดคล้องระหว่างการทดสอบในสภาพโรงเรือน กับการแสดงความต้านทานในสภาพแปลง แต่ทว่าระดับการต้านทานโรคของอ้อยแต่ละพันธุ์จะลดลงเมื่อทำการทดสอบในสภาพโรงเรือน ทั้งนี้เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมเหมาะสม และมีความแปรปรวนน้อยกว่าในสภาพแปลง

นอกจากนี้วิธีการปลูกเชื้อที่ใช้ ในการศึกษาการตอบสนองของพืชต่อการเกิดโรค เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการแสดงออกถึงความต้านทานโรค ในการปลูกเชื้อและทำการทดสอบพันธุ์อ้อยในโรงเรือนทดลองในครั้งนี้พบว่า วิธีการปลูกเชื้อโดยการฉีดเชื้อเข้าบริเวณโคนต้นอ้อยในระยะกล้าทำให้ต้นอ้อยเกิดการตายได้มาก เนื่องจากมีโอกาสไปทำลายจุดเจริญของอ้อยได้ ดังนั้นจึงควรทำการทดสอบในต้นอ้อยจำนวนมากขึ้น อย่างไรก็ตาม แม้ว่าวิธีการทดสอบพันธุ์ต้านทานโรคในสภาพโรงเรือน จะทำให้พืชแสดงความอ่อนแอต่อโรคมากกว่าในสภาพแปลง แต่การทดสอบในระดับโรงเรือนก็ยังมีความสำคัญในการทดสอบเบื้องต้นในกรณีที่มีพันธุ์ทดสอบ

จำนวนมาก และข้อมูลที่ได้จะช่วยลดปัญหาความเสี่ยงที่อาจจะเกิดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในสภาพแปลง ทำให้พืชไม่แสดงอาการของโรค

ในการศึกษาการตรวจหาเชื้อ *U. scitaminea* ในต้นอ้อยที่ปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์ใน teliospore suspension ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ แล้วนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์และเทคนิค PCR พบว่า หลังปลูกเชื้อ 1 2 และ 3 เดือน ไม่สามารถตรวจพบเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อยทุกพันธุ์และทุกตำแหน่งที่ทำการตรวจ ทั้ง 2 วิธีการตรวจ เมื่อศึกษาอาการที่เกิดขึ้นกับต้นอ้อย พบว่า ต้นอ้อยแสดงอาการลำต้นผอมเรียว ใบแคบเล็กกว่าปกติ ซึ่งพบในอ้อยทุกพันธุ์ที่ทำการปลูกเชื้อ (ภาพที่ 12) ทั้งนี้วิธีการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยใน teliospore suspension เป็นวิธีการที่นิยมใช้ในการตรวจสอบพันธุ์ต้านทานโรคแส้ดำ ไม่พบรายงานการตรวจเชื้อในต้นอ้อยที่ทำการปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่ท่อนพันธุ์ โดยมีการศึกษาพบว่า อ้อยจะเริ่มปรากฏอาการแส้ดำที่อายุ 4 เดือน หลังปลูกเชื้อ (เลิศวิทย์, 2534) ในปี พ.ศ. 2550 วรัญญา ได้ทดลองแช่ท่อนพันธุ์ใน sporidia และ teliospore suspension เป็นเวลา 30 นาที พบว่า การปลูกเชื้อทั้ง 2 วิธี ทำให้ต้นอ้อยแสดงอาการ ใบแคบ ใบตั้ง ลำต้นผอมเรียว มีการแตกตาข้างเพิ่มขึ้น และมีการสร้างแส้ดำให้เห็น หลังได้รับการปลูกเชื้อเป็นเวลา 4 เดือน เช่นกัน ทั้งนี้ในการศึกษาพบว่า ไม่สามารถตรวจพบเชื้อในต้นอ้อยที่มีอายุน้อยกว่า 3 เดือน ดังนั้นการศึกษาการตรวจหาเชื้อรา *U. scitaminea* ในเนื้อเยื่ออ้อย โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการแช่ท่อนพันธุ์อาจต้องใช้เวลานานกว่า 3 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่ใกล้เคียงกับที่ต้นอ้อยปรากฏอาการของโรค



ภาพที่ 12 ลักษณะของต้นอ้อยอายุ 2 เดือน ที่ปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์

ก. ต้นอ้อยปกติ

ข. ต้นอ้อยที่แช่ท่อนพันธุ์ด้วย teliospore ก่อนปลูก ลำต้นจะผอมเรียวกว่าปกติ

ค. ใบของต้นอ้อยปกติ กับ ใบของต้นอ้อยที่แช่ท่อนพันธุ์ด้วย teliospore ก่อนปลูก ซึ่งใบอ้อยที่แช่ท่อนพันธุ์จะมีขนาดเล็กกว่าปกติ

การตรวจหาเชื้อโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension ซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการทดสอบพันธุ์ต้านทานโรคในระดับโรงเรือน ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า มีการตรวจพบเชื้อได้ดีในอ้อยพันธุ์K84-200 และอู่ทอง 1 โดยการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR มีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อสูงกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า วิธีการฉีดเชื้อเข้าสู่ต้นอ้อยเป็นวิธีการที่สามารถนำไปพัฒนา เพื่อใช้ในการศึกษาการแพร่กระจายของเชื้อโรคภายในพืชได้ เนื่องจากสามารถตรวจสอบเชื้อในส่วนต่างๆ ของต้นอ้อยได้

แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยหลายอย่างที่ต้องคำนึงถึง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดโรค ได้แก่ สภาพแวดล้อม และปริมาณของเชื้อที่ใช้ เนื่องจากต้นกล้าอ้อยที่ได้จากการปลูกด้วยท่อนพันธุ์จะมีการเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ จึงทำการทดลองโดยการจัดกลุ่มอายุและขนาดของลำต้นอ้อยออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5-6.5 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 2 อายุ 2 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.5-8 มิลลิเมตร กลุ่มที่ 3 อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร และกลุ่มที่ 4 อายุ 3 สัปดาห์ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8-10 มิลลิเมตร จากนั้นทำการปลูกเชื้อในต้นกล้าอ้อยด้วยวิธีการฉีด sporidia suspension โดยทำการทดลองในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 เมื่อนำมาตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR และกล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีการตรวจพบเชื้อได้สูงสุดในอ้อยที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร ที่อายุ 2-3 สัปดาห์ ดังนั้นในการตรวจสอบเชื้อภายในต้นอ้อยจึงควรเลือกใช้ต้นกล้าอ้อยที่มีขนาดใกล้เคียงกัน และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-8 มิลลิเมตร

การศึกษาการตรวจสอบเชื้อภายในต้นอ้อยเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยให้ทราบถึงการเจริญของเชื้อภายในต้นอ้อยก่อนที่จะแสดงอาการของโรค ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อและพืชอาศัย การศึกษาครั้งนี้จึงทำการตรวจเชื้อในอ้อยพันธุ์K84-200 และกำแพงแสน94-13 ที่มีระดับความต้านทานแตกต่างกันด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการฉีดสปอร์ และใช้สปอร์ทั้ง 2 แบบ คือ teliospore และ sporidia จากผลการทดลองพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อในอ้อยพันธุ์K84-200 มากกว่าในอ้อยพันธุ์กำแพงแสน94-13 โดยเฉพาะเมื่อทำการตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค PCR ส่วนในการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าสามารถตรวจพบเส้นใยของเชื้อทุกระยะที่ทำการตรวจ ยกเว้นที่ระยะเวลา 1 วัน หลังปลูกเชื้อที่ตรวจไม่พบเชื้อในทุกตัวอย่างและทุกตำแหน่งที่ทำการตรวจ โดยการฉีดด้วย teliospore suspension มีการตรวจพบเส้นใยของเชื้อราได้ดีกว่าการใช้ sporidia suspension ทั้งนี้อาจเนื่องจากในวงจรการเจริญเติบโตของเชื้อนั้น teliospore ซึ่งเป็นสปอร์ที่มีความทนทานกว่า และจะงอกให้

promycelium และแตกหน่อให้ sporidia จำนวน 4 สปอร์ เมื่อ sporidia งอกจะเกิดการเชื่อมเซลล์ได้เป็น dikaryotic cell แล้วเจริญเป็นเส้นใย ทำให้มีโอกาสตรวจพบเส้นใยได้ดี จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า การตรวจเชื้อภายในเนื้อเยื่ออ้อยในระยะกล้าไม่สามารถบ่งชี้ถึงระดับความต้านทานโรคได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากความต้านทานโรคของพืชมีหลายกลไก การแสดงออกถึงความต้านทานโรคของอ้อยพันธุ์K84-200 ในสภาพแปลง เป็นความต้านทานโรคโดยไม่ปรากฏอาการของโรคแต่มีการเจริญของเชื้อโรคภายในเนื้อเยื่อพืช

ในการศึกษาการตรวจเชื้อรา *U. scitaminea* ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ ในครั้งนี้ได้นำวิธีการตรวจเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อมาใช้ 2 วิธี คือ การตรวจหาเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ และเทคนิค PCR ซึ่งทั้ง 2 วิธีนี้มีความแตกต่างกัน คือ ในการตรวจเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์จะต้องใช้เวลาในการตรวจนานกว่า เนื่องจากจำนวนชิ้นพืชที่ได้จากการตัดมีจำนวนมาก และสีที่ใช้ย้อม ตัวอย่าง คือ trypan blue เป็นสีที่ใช้ย้อมเพื่อให้เห็นส่วนของเชื้อโรคได้ชัดเจน แต่ไม่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่ง ส่วนเทคนิค PCR เป็นเทคนิคที่ต้องใช้เครื่องมือเฉพาะ และความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อจะขึ้นกับไพรเมอร์ที่เลือกใช้ ซึ่งในการทดลองนี้ได้ใช้ไพรเมอร์ *b*E4 และ *b*E8 ซึ่ง Albert and Schenck (1996) ได้นำเทคนิคทางโมเลกุลมาใช้โดยการพัฒนาไพรเมอร์ *b*E4 และ *b*E8 ในการเพิ่มปริมาณยีน *b*E ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนที่ใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตของเส้นใยในระยะ dikaryon ของเชื้อที่สามารถเข้าทำลายอ้อยได้ และ Schenk (1998) ได้ทำการศึกษาการตรวจสอบการเกิดแส้ดำอ้อยด้วยเทคนิค PCR พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อรา *U. scitaminea* ได้ในต้นอ้อยที่ปลูกเชื้อและการวิเคราะห์ผล PCR สอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์การสร้างแส้ในต้นอ้อยที่ปลูกเชื้อในสภาพโรงเรือนและสภาพแปลงทดลอง โดยการตรวจสอบด้วย PCR มีความถูกต้องแม่นยำมากกว่าการตรวจสอบเส้นใยของเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อยด้วยกล้องจุลทรรศน์ การตรวจสอบการเกิดโรคด้วยเทคนิค PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ *U. scitaminea* ในขณะที่ต้นอ้อยไม่แสดงอาการของโรค ซึ่งจากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า การตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุโรคแส้ดำด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้ดีกว่าการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ เช่นกัน โดยในการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้ทันทีหลังปลูกเชื้อ และมีเปอร์เซ็นต์การตรวจพบเชื้อมากกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ การศึกษาความต้านทานโรคแส้ดำของอ้อย และการจัดระดับความต้านทานโรคตามปฏิกิริยาของอ้อย โดยจัดแบ่งตามเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในอ้อยปลูกและอ้อยตอ ต้องใช้ระยะเวลานานกว่า 4 เดือน และการแสดงอาการของโรคยังมีปัจจัยอื่นเกี่ยวข้องต่อการแสดงออกของพืชนอกเหนือจากพันธุกรรมของพืช โดยเฉพาะสภาพแวดล้อม ดังนั้น การตรวจเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อยจึง

เป็นวิธีการที่ทำให้ทราบถึง ความต้านทานโรคของพืชโดยพันธุกรรม อย่างไรก็ตาม ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม โดยการตรวจเชื้อในอ้อยก่อนการแตกกอ จนถึงระยะย่างปล้อง และตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อที่ทำให้เกิดแส้ในอ้อยพันธุ์ต่างๆ ต่อไป เนื่องจากผลการทดลองพบว่า การตรวจพบเชื้อในต้นอ้อยในระยะต้นกล้าไม่สัมพันธ์กับความต้านทานโรค ซึ่งสอดคล้องกับกับที่ Willits and Sherwood (1999) พบว่า มีการตรวจพบเชื้อรา *Ustilago hordei* สาเหตุโรคของข้าวบาร์เลย์ตั้งแต่ระยะแรกๆ ทั้งในพันธุ์ต้านทานและอ่อนแอต่อโรค แต่จะบอกได้ว่าเป็นพันธุ์ต้านทานหรืออ่อนแอได้ต้องตรวจในระยะแทงช่อดอกหรือใบธง ซึ่งการตรวจพบเชื้อในพันธุ์ต้านทานจะมีปริมาณที่น้อยกว่าในพันธุ์อ่อนแอ

สรุปผลการทดลอง

การปลูกเชื้อโดยการฉีด sporidia suspension สามารถตรวจพบเชื้อสาเหตุหลังการปลูกเชื้อได้ทั้ง 2 วิธีที่ทำการตรวจ โดยที่ระยะเวลา 28 วัน หลังปลูกเชื้อ สามารถตรวจพบเชื้อมากที่สุด ในขณะที่การปลูกเชื้อด้วยการแช่ท่อนพันธุ์ไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้ตั้งแต่ปลูกจนอ้อยอายุ 3 เดือน

อายุและขนาดมีผลต่อการตรวจพบเชื้อ โดยสามารถตรวจพบเชื้อได้ดีที่สุด เมื่อกล้าอ้อยที่ใช้ในการปลูกเชื้อที่อายุ 2-3 สัปดาห์ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางลำต้นเท่ากับ 6-8 มิลลิเมตร

การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค PCR สามารถตรวจพบเชื้อได้ดีกว่าการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เนื่องจากสามารถตรวจพบเชื้อได้มากกว่า

การตรวจพบเชื้อไม่มีความสัมพันธ์กับระดับความต้านทานโรคของอ้อย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2545. **เกษตรดีที่เหมาะสมสำหรับอ้อย**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กระทรวงเกษตร และสหกรณ์. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, กรุงเทพฯ.

กรมวิชาการเกษตร. 2549. **โรคอ้อยที่สำคัญและการป้องกันกำจัด**. แหล่งที่มา: http: //www.sugarzone.in.th/disease_cane.htm, 28 มิถุนายน 2550.

เกษม สุขสถาน. 2527. **พืชเศรษฐกิจ เล่ม 2**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 217 น.

เกษม สุขสถาน. 2540. **คู่มือการทำไร่อ้อย** (เอกสารเผยแพร่). บริษัทมิตรผลวิจัยพัฒนาอ้อยและน้ำตาลจำกัด, ชัยภูมิ.

เกษม สุขสถาน, อุดม พูลเกษ และบัญญัติ โกมลวาจ. 2520. **พันธุ์อ้อยที่ปลูกเป็นการค้าในประเทศไทย**. ภาควิชาพืชไร่นา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และสถานีอ้อยกาญจนบุรี. สำนักงาน คณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุสาหกรรม. 61 น.

ประเสริฐ ฉัตรวชิระวงษ์. 2542. อ้อย, น. 270-295. ใน คณาจารย์ภาควิชาพืชไร่นา, บรรณาธิการ. **พืชเศรษฐกิจ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, อุดม เลียบวัน และอดุลย์ พงษ์พัว. 2544. การปรับปรุงพันธุ์อ้อยในประเทศไทย (อดีต ปัจจุบัน และอนาคต). **ว. อ้อยและน้ำตาลไทย** 8 (2): 12-34.

ปรีดา จาติกวณิช และปรีชา สุริยพันธุ์. 2523. ประวัติการปลูกอ้อยและการทำน้ำตาลของโลก, น. 1-10. ใน ปรีชา สุริยพันธุ์, บรรณาธิการ. **อ้อยเอกสารวิชาการเล่มที่ 1**. ธนประดิษฐ์การพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ธนาคร จารุพัฒน์, วิชัย ก่อประดิษฐ์กุล, นิพนธ์ ทวีชัย และศศินาฏ แสงวงศ์. 2526. **โรคอ้อยในประเทศไทย.** ชมรมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 180 น.

ยงยุทธ สายฟ้า, วิรัช ชูบำรุง และปิยะ เกียรติก้อง. 2519. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีววิทยาเซลล์วิทยาของเชื้อโรคอ้อย (*Ustilago scitaminea* Syd), น. 10-16. ใน **รายงานประจำปี**. กองวิจัยโรคพืช, กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

เลิศวิทย์ ศศิปรียจันทร์. 2534. **การถ่ายทอดโรคและการจำแนกสายพันธุ์เชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow สาเหตุโรคแส้ดำของอ้อย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วันชัย โตวิริยะเวช. 2522. **โรคแส้ดำของอ้อย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วรัญญา อริยสุระ. 2550. **การตรวจสอบเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow ในการเข้าทำลายอ้อยระยะเริ่มต้น.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม. 2544. **สรุปสถานการณ์อ้อยและน้ำตาลทรายของประเทศไทย ในฤดูกาลผลิตปี 2542/43**. สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. **ผลการพยากรณ์ผลผลิตอ้อยโรงงานปี 2551** (ปีเพาะปลูก 2550/51). แหล่งที่มา: http: //www.oae.go.th/mis/Forecast/thai/situation/sit_t_10. htm. 28 มิถุนายน 2550.

สุวนิตย์ แวงวรรณ. 2524. **การสำรวจโรคที่เกิดจากเชื้อรา และศึกษาวงจรของโรคราแขม่าดำของอ้อยในประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่ม 5. 2550. **อ้อย**. แหล่งที่มา: http: //kanchanapisek. or. th/kp6/BOOK5/chapter3/t5-3-m.htm, 28 มิถุนายน 2550.

ศิริลักษณ์ ลิละคร. 2547. **ความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อรา *Ustilago scitaminea* Sydow**

สาเหตุโรคแส้ดำของอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

อนุสรณ์ กุศลวงศ์, วันทนีย์ อู่วาณิชย์, สุนี ศรีสิงห์, และจุไรรัตน์ หิรัญประดิษฐ์. 2525. การศึกษา Physiological race ของเชื้อ *Ustilago scitaminea* บนอ้อยในประเทศไทย, น. 79. ใน **รายงานการค้นคว้าวิจัยปี 2525**. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

———, วันทนีย์ อู่วาณิชย์, สุนี ศรีสิงห์, ประพันธ์สุข พัฒนานนท์ และประชา ถ้ำทอง. 2529. การคัดเลือกอ้อยลูกผสมชุดที่ 5 และ 6 ที่ต้านทานต่อโรคแส้ดำ. **รายงานผลการวิจัย.** กองโรคพืชและจุลชีววิทยา, กรมวิชาการเกษตร,กรุงเทพฯ. 12 น.

Akalach, M. and B. Touil. 1996. Occurrence and spread of sugarcane smut caused by *Ustilago scitaminea* in Morocco. **Plant Dis.** 80: 1363-1366.

Albert, H.H. and S. Schenck. 1996. PCR amplication from a homology of the *bE* mating-type gene as a sensitive assay for the presence of *Ustilago scitaminea* DNA. **Plant Dis**. 80: 1189-1192.

Alexander, K.C. 1981. Studies on variation in the smut disease organism (*Ustilago scitaminea* syd.) of sugarcane. **Sugarcane Pathologists' Newsletter.** 27: 18-20.

Antoine, R. 1961. Smut, pp. 327-345. *In* J.P. Martin, E.V. Abbott and C.G. Hughes (eds). **Sugarcane Disease of the World**. Vol. 1. Elsevier Publishing Company, Amsterdam.

Bock, K.R. 1964. Studies on sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in Kenya. **Trans. Brit. Mycol. Soc.** 47: 403-417.

Comstock, J.C. and D.J. Heinz. 1977. A new race of culmicolous smut of sugarcane in Hawii. **Sugarcane Pathologists' Newsletter** 19: 24-25.

Fereol, L. 1984. Inoculation of in vitro cultivated sugarcane with smut (*Ustilago scitaminea*). **Can. J. Bot.** 62: 2043-2046.

Ferreira,S.A. and J.C. Comstock. 1989. Smut, pp. 211-229. *In* C. Ricaud,B.T. Egan, A.G. Gillaspie, Jr. and C.G. Hughes (eds). **Disease of Sugarcane Major Disease**. Elsevier Science Publishers Company Inc, New York.

Goldman, M. 1986. Colonial and cellular morphology of sporidia of *Ustilago scitaminea.* **J. Soc. Sugar Cane Technol**. 6: 134.

Grisham, M.P. 1986. Sporidia compatibility and hyphal development of *Ustilago scitaminea,* causal agent of sugar cane smut. **J. Amer. Soc Sugar Cane Tehnol**. 6: 134. (Abstr.)

Grisham, M.P. 1988. Inoculation of upright of tissue culture of sugar cane with teliospore, sporidia or mycelium of *Ustilago scitaminea***. J. Amer. Soc. Sugar Cane Technol**. 8: 132. (Abstr.)

Jandhu, S.S., D.J. Bhatti and B.K. Rattan. 1969. Extent of losses in sugarcane causal by *Ustilago scitaminea*. **Int. Res. Ludhiana** 6: 341-344.

Juangbhanich, P. and S. Wangwon. 1983. Effect of temperature and some substrate on teliospore germination of sugarcane smut and inoculation method on infection by *Ustilago scitaminea*. **Kasetsart J.** 17: 45-52.

Kalaimani, D., P. Padmanabhan and S. Rajasekaran. 1989. Epidemiology of sugar cane smut. **Braratiya Sugar** 14: 55-57.

Lee-Lovick, G. 1978. Smut of sugarcane- *Ustilago scitaminea*. **Rev. Plant Pathol.** 57: 181-188.

Martin, J.P. 1964. A survey of sugarcane disease in Thailand. **Bangkok Sugar Indust**. 28 p.

Matsuoka, S.S., R.A. Masuda and H. Arizono. 1986. Reliability feasibility of the needle bud puncture method for rapid identification of smut susceptible sugarcane clone. **International Society of Sugar Cane Technologists**, pp. 375-380. In Proceedings XIX congress 1986, Jakatar.

Mohanraj, D., P. Padmanaban and K.C. Alexander. 1987. Effect of inoculum method on early expression of sugarcane smut**. Sugar Cane** 1: 7-8.

Natarajan, S. and T. Kalaimani. 1996. Effect of smut disease on the yield of sugarcane. **Indian J. of Mycol. and Plant Pathology.** 66 (1): 32-33.

Padmanaban, P., K.C. Alexander and N. Shanmugam. 1988 a. Effect on yield of sett selection from cane infected with smut. **Sugar Cane** 2: 14-15.

Padmanaban, P., K.C. Alexander and N. Shanmugam. 1988 b. Mechanism of smut resistance in sugar cane. **Sugar Cane** 6: 14-15.

Rajesh kumer, S.R. Misra, A.K. Singh and Ramji Lal. 2003. Yield loss in sugarcane genotypes to smut at different resistance levels. **Sugarcane Int**. (September/October): 22-24.

Schenk, S. 1998. Evaluation of PCR amplification method for detection of systemic smut infections in sugarcane. **Sugar Cane**. 6: 2-5.

Shenck, S. 1999. Molecular aspects of the sugarcane smut disease pathogen*, U .scitaminea*, pp. 131-139. In G.P. Rao, A.B. Filho, R.C. Magarey and L. Autrey, eds. **Sugarcane pathogen vol 1 Fungal disease**, Science publ. Co. Inc., USA.

Singh, K., T.R. Budhraja and A. Lal. 1966. Variation in the longevity of teliospore of *Ustilago scitaminea* Syd. **Indian Phytopathol**. 19: 394-396.

Singh, N., B.M. Somai and D. Pillay. 2004. Smut disease assessment by PCR and microscopy in inoculated tissue cultured sugarcane cultivars. **Plant Sci.** 167: 987- 994.

Singh, N., B.M. Somai and D. Pillay. 2005. Molecular profiling demonstrates limited diversity amongst geographically separate stains of *Ustilago scitaminea***. FEMS Microbiology Letters** 247 (1): 7-15.

Sinha, O.K., K. Singa and S.R. Misra. 1982. Stain technique for detection of smut hyphae in nodal buds of sugarcane. **Plant Sci.** 66: 932-933.

Trione, E.J. 1990. Growth and sporulation of *Ustilago scitaminea in vivo* and *in vitro.* **Mycololgical Research** 94: 489-493.

Willits, D. A. and Sherwood, J. E. 1999. Polymerase chain reaction detection of *Ustilago hordei* in leaves of susceptible and resistant barley varieties. **Phytopathology** 89: 212-217.

Xu, L., Y. Que and R. Chen. 2004. Genetic diversity of *Ustilago scitaminea* in Mainland China. **Sugar Tech**. 6 (4): 267-271.

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาววัลวิษา ปีติมาตร์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	26 พ.ค. 2526
สถานที่เกิด	อำเภอผักไห่ จังหวัดพระนครศรีอยุธยา
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผู้ช่วยนักวิจัยโครงการ โรคแส้ดำและวิธีการทดสอบพันธุ์ต้านทาน
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ห้องปฏิบัติการ A411 เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเกษตร กำแพงแสน อาคารเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 7314