ระดับโครงการ

กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

รายงานผลสัมฤทธิ์สำหรับทุนสนับสนุนงานพื้นฐาน (Fundamental Fund)

ปีงบประมาณ พ.ศ. 2564

หน่วยงาน กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

รายงานโครงการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนาการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อย

Research and Development on the Control and Management of Sugarcane White Leaf Disease

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางสาวศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล

Ms. Suchirat Sakuanrungsirikul

ปี 2564

บทสรุปผู้บริหาร

โรคใบขาว (sugarcane white leaf : SCWL) และ โรคใบขาวและกอฝอย (sugarcane grassy shoot : SCGS) มักถูกเรียกรวมกันว่า โรคใบขาว และโรคกอตะไคร้ (sugarcane green grassy shoot : SCGGS) จัดเป็นโรคติดต่อร้ายแรงในอ้อย เป็นปัญหาสำคัญต่อการผลิตอ้อยของไทยที่เกิดขึ้นมาอย่างเรื้อรังยาวนาน การแก้ปัญหาเดิมใช้วิธีขุดทำลายต้นที่เป็นโรคทิ้ง และปลูกทดแทนด้วยอ้อยสะอาด แต่พบการแพร่ระบาดเป็นระยะๆ การจัดการแปลงที่ลดผลกระทบจากสภาวะแวดล้อม และเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน ร่วมกับการใช้ท่อนพันธุ์สะอาดปลอดโรค เป็นแนวทางใหม่ที่ลดความรุนแรงของโรคอย่างได้ผล แต่สามารถจัดการเพียงบางส่วนเท่านั้น การควบคุมระดับปริมาณเชื้อสาเหตุโรคในแปลงทั้งระบบให้อยู่ในระดับที่ไม่สร้างความเสียหายต่อผลผลิต จะสร้างความยั่งยืนในการควบคุมโรคได้อย่างแท้จริง ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการจัดการและควบคุมโรคนี้ทั้งระบบ ตั้งแต่ต้นทางการผลิตอ้อยปลอดเชื้อในห้องปฏิบัติการ ไปจนถึงปลายทางการควบคุมระดับเชื้อในแปลงอย่างต่อเนื่องและเป็นระบบ

ผลจากการศึกษาปริมาณธาตุอาหารรองในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในระดับต่างๆ ร่วมกับการตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR พบว่าท่อนพันธุ์อ้อยที่มีธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี ร้อยละ 0.83, 0.45, 1.136, 0.094, 0.093, 0.0077 และ 0.0009 ตามลำดับ เป็นปริมาณธาตุที่เหมาะสมทำให้อ้อยไม่เป็นโรคใบขาว หากมีธาตุดังกล่าวในระดับที่ต่ำกว่าร้อยละ 0.39, 0.13, 0.097, 0.029, 0.034, 0.0038 และ 0.0006 ตามลำดับ จะส่งเสริมให้มีปริมาณเชื้อในท่อนพันธุ์อ้อยมากขึ้นจนถึงระดับที่อ้อยสามารถแสดงอาการใบขาวได้ทุกเวลาและไม่เหมาะสมที่จะนำไปทำพันธุ์ โดยมีผลตรวจโรคใบขาวเป็นรหัสสีแดง (มากกว่า 1000 copy/ul in 25 ng plant DNA) ในท่อนพันธุ์อ้อยควรมีสมดุลของธาตุไนโตรเจนและแมกนีเซียมระหว่าง 8.81-8.96 และมีสมดุลของธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสระหว่าง 2.50-2.79 จึงจะทำให้ท่อนพันธุ์นั้นสามารถนำไปทำพันธุ์ได้ สำหรับอ้อยตอมีธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสีร้อยละ 1.42 0.48 1.73 0.19 0.09 0.011 และ 0.00096 จึงจะทำให้อ้อยตอไม่เป็นโรคใบขาว โดยมีสมดุลของไนโตรเจนและแมกนีเซียมในอ้อยตอควรอยู่ในช่วง 15-25 สมดุลของธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสควรอยู่ในช่วง 2.36-3.61 และสมดุลของธาตุเหล็กและสังกะสีควรอยู่ในช่วง 11-25 จากการศึกษาการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสีเพื่อลดการแสดงอาการโรคใบขาวของท่อนพันธุ์ พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเกลือสังกะสีที่เหมาะสมในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อย ที่ทำให้เชื้อไฟโตพลาสมาลดลง คือ การแช่สารละลาย $ZnSO_4$ ที่เข้มข้น 1% การใช้ความเข้มข้นที่มากกว่านี้มีผลให้อ้อยไม่งอกเนื่องจาก $ZnSO_4$ ไปทำลายตาอ้อยทำให้ตาอ้อยตาย ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสี คือการแช่ที่ระยะเวลา 15 และ 20 นาที ตามลำดับ โดยให้คุณภาพท่อนพันธุ์ดีที่สุดเนื่องจากเมื่ออ้อยอายุ 11 สัปดาห์ ปริมาณเชื้อภายในต้นอ้อยยังอยู่ในระดับต่ำถึงระดับน้อยมาก คือตรวจพบเชื้อที่ระดับ 0-0.5, 0.5-1.0 และ 1-10 copy/µl in 25 ng plant DNA และปริมาณธาตุสังกะสีจะมากที่สุดหลังการแช่สารละลาย $ZnSO_4$ และจะลดลงไปเรื่อย ๆ เมื่ออ้อยอายุมากขึ้น สำหรับการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสีโดยใช้ความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสม พบว่าท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดมีสมดุลของธาตุไนโตรเจนกับแมกนีเซียม โพแทสเซียมกับฟอสฟอรัส เหล็กกับสังกะสี 10.0 3.71 4.83 ตามลำดับ ท่อนพันธุ์จากแปลงเป็นโรคใบขาวมีสมดุลของธาตุอาหารต่ำกว่าท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดโดยมีสมดุลของธาตุอาหาร 9.1 2.3 และ 3.0 ตามลำดับ ถ้าใช้ท่อนพันธุ์สะอาดไม่จำเป็นต้องแช่สารละลาย $ZnSO_4$ เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตอ้อยปลูกและให้ผลผลิตน้ำตาลสูงที่สุด 19.1 และ 2.48 ตันซีซีเอสต่อไร่ตามลำดับ แต่การแช่สารละลาย $ZnSO_4$ 0.5 % กลับมีผลต่อความหวานของอ้อย โดยให้ค่าความหวานสูงที่สุด 16.0 ซีซีเอส ในทำนองเดียวกับการใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยเป็นโรคใบขาว วิธีการที่ไม่แช่ท่อนพันธุ์ให้ผลผลิตอ้อยปลูกสูงที่สุด 16.4 ตันต่อไร่ แต่การแช่ท่อนพันธุ์ด้วยสารละลาย $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 0.5 % เป็นวิธีที่ให้ผลผลิตน้ำตาลสูงที่สุด 2.18 ตันซีซีเอสต่อไร่ สำหรับการเป็นโรคใบขาวแปลงที่ใช้ท่อนพันธุ์อ้อยสะอาดไม่พบกอเป็นโรคใบขาว แต่พบกอเป็นโรคใบขาวจากแปลงที่ใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงเป็นโรคใบขาว ในวิธีการที่ไม่แช่ท่อนพันธุ์ แช่น้ำสะอาด และ แช่สารละลาย $ZnSO_4$ 0.5% โดยพบโรคใบขาวร้อยละ 0.78 0.49 และ 3.12 ตามลำดับ และไม่พบกอเป็นโรคใบขาวในแปลงที่ใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงเป็นโรคใบขาวที่มีการแช่สารละลาย $ZnSO_4$ 0.75% และ 1.0%

การจัดการสมดุลธาตุอาหารอ้อยเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคใบขาวอ้อยได้ โดยมีผลทำให้อ้อยมีความแข็งแรงมากขึ้น ทำให้ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาลดลง อ้อยจึงไม่แสดงอาการโรคใบขาว การศึกษาด้านการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวในสภาพไร่ ดำเนินการใน ในพื้นที่ปลูกอ้อย ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและภาคตะวันตก รวม 9 จังหวัด ผลการทดลองพบว่า การลดความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีการระบาดของโรครุนแรง เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม แนะนำให้ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใส่ไนโตรเจนอัตรา

27 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ฟอสเฟตอัตราปานกลางถึงสูงระหว่าง 6-9 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ใส่โพแทส อัตราปานกลางถึงสูงระหว่าง 12-18 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ควรเพิ่มธาตุแมกนีเซียมในรูปโดโลไมท์ อัตราระหว่าง 25-75 กิโลกรัมต่อไร่ และเพิ่มธาตุสังกะสีในรูป $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 3.8 - 7.6 กิโลกรัมต่อไร่ ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ และอุดรธานี ส่วนจังหวัดสกลนครไม่จำเป็นต้องใส่ธาตุสังกะสี สำหรับพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันตกซึ่งมีการระบาดของโรคใบขาวต่ำกว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แนะนำให้ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใส่ไนโตรเจนอัตรา 18-27 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ฟอสเฟตอัตราต่ำถึงปานกลางระหว่าง 3-6 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ในพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี อุทัยธานี และนครสวรรค์ ยกเว้นจังหวัดสุพรรณบุรีใส่ฟอสเฟตอัตราสูง 9 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ใส่โพแทส อัตราปานกลางถึงสูงระหว่าง 12-18 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ควรเพิ่มธาตุแมกนีเซียมในรูปโดโลไมท์ อัตราระหว่าง 25-30 กิโลกรัมต่อไร่ และเพิ่มธาตุสังกะสี ในพื้นที่จังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรี ใส่ $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 3.8 กิโลกรัมต่อไร่ ในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี และอุทัยธานีใส่ $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 7.6 กิโลกรัมต่อไร่ ส่วนจังหวัดนครสวรรค์ไม่จำเป็นต้องใส่ธาตุสังกะสี

การป้องกันกำจัดโรคใบขาวจำเป็นต้องมีข้อมูลเชิงพื้นที่ที่แสดงถึงความเสี่ยงของการระบาดของโรคใบขาวในพื้นที่ปลูกอ้อยเพื่อใช้ในการวางแผนการควบคุม ป้องกันกำจัดโรคใบขาวที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ ผลจากการจัดทำแผนที่ความเสี่ยงการระบาดของโรคใบขาวอ้อยโดยใช้ข้อมูลชนิดของเนื้อดิน ความลึกของชั้นดินบน ความแน่นของดิน จากชุดดิน 294 ชุดดินนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สมการ ความรุนแรงใบขาวของอ้อย ร่วมกับปริมาณน้ำฝน แล้ววิเคราะห์ข้อมูลเป็นเชิงพื้นที่และเชิงเวลา พบว่าอาการใบขาวอ้อยมีความสัมพันธ์กับการเกิดในพื้นที่สำรวจเมื่อเทียบกับแผนที่ความเสี่ยงการเกิดอาการใบขาวในอ้อย จากการวิเคราะห์ความแม่นยำ พบว่าความถูกต้องแผนที่ความเสี่ยงระดับ ที่ 1 หรือมีความเสี่ยงต่อการเกิดใบขาวน้อยที่สุดหรือไม่เกิดใบขาว มีความแม่นยำ ถูกต้อง 60.98 % ชั้นความเสี่ยงในการเกิดใบขาวระดับที่ 3 มีความแม่นยำถูกต้อง 100% และระดับที่ 4 มีความแม่นยำถูกต้อง 50% ตามลำดับ ส่วนระดับที่ 2 และระดับที่ 5 คือเล็กน้อย และความเสี่ยงรุนแรง มีค่าเป็น 0 โดยมีระดับความแม่นยำถูกต้องรวมอยู่ที่ 59.57 % หากมีการใช้ข้อมูลสภาพแวดล้อมอื่นๆ มาร่วมวิเคราะห์ประกอบจะยิ่งเป็นแนวทางการจัดการอ้อยใบขาวได้ดียิ่งขึ้น ในพื้นที่ ๆ มีความเสี่ยงการเกิดใบขาวหากเพิ่มการจัดการน้ำ การจัดการธาตุอาหาร หรืออาจเปลี่ยนไปปลูกพืชอื่นก็จะสามารถลดการระบาดของโรคใบขาวลงได้ จากการศึกษาพบว่า ระบบปลูกพืชหมุนเวียนที่เหมาะสม ได้แก่ การปลูกอ้อยตามถั่วลิสง และ ถั่วมะแฮะ โดยพบโรคใบขาวเฉลี่ยร้อยละ 0.6 และ 1.28 ตามลำดับ พืชหมุนเวียนดังกล่าวให้ผลผลิตอ้อยเฉลี่ย 12.8 และ 13.8 ตันต่อไร่ ตามลำดับ โดยหากพบกอเป็นโรคใบขาวควรขุดกออ้อยใบขาวทิ้งออกจากแปลง จึงจะสามารถลดการเป็นโรคใบขาวและสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตอ้อยได้ การใช้พันธุ์สะอาดร่วมกับการจัดสมดุลธาตุอาหาร ในพื้นที่ที่มีโรคใบขาวระบาดน้อย ควรปลูกอ้อยโดยใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดและใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน สำหรับการจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคใบขาวน้อย ทำการประยุกต์วิตามวิธีการจัดการแปลงที่ออกแบบให้มีขอบแปลงที่มีความกว้างเกินระยะบินของแมลงพาหะล้อมรอบแปลงพันธุ์สะอาดเพื่อลดการติดเชื้อจากแปลงข้างเคียง ดำเนินการโดยจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดโดยใช้อ้อยที่ผ่านการตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาว ร่วมกับการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area ผลการดำเนินงานพบว่าแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดที่มีต้นที่มีเชื้อในระดับสีฟ้าและสีเขียว (0-1 copy/ul in 25 ng plant DNA) รวมร้อยละ 84 นั้นเมื่อเป็นอ้อยตอ 1 พบว่ามีเชื้อมีการเพิ่มขึ้นอีก 1 ระดับ โดยตรวจพบต้นที่มีเชื้อในระดับสีเหลืองและสีส้มร้อยละ 92 จากการทดลองใช้ท่อนพันธุ์อ้อยสะอาดเฉพาะจากลำที่มีผลตรวจโรครหัสสีฟ้าและสีเขียว ซึ่งเป็นระดับที่สามารถนำไปทำพันธุ์ได้ ผลการตรวจเชื้อพบว่าอ้อยที่ได้ให้ผลเป็นต้นที่เป็นรหัสสีฟ้าและสีเขียวเฉลี่ยร้อยละ 37 รหัสสีเหลืองซึ่งเป็นระดับเฝ้าระวัง (1-10 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 49 และรหัสสีส้มซึ่งเป็นระดับไม่ปลอดภัย 10-100 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 14 ในส่วนของการขยายผลได้นำท่อนพันธุ์อ้อยตอ 1 ไปขยายผลการจัดทำแปลงผลิตพันธุ์อ้อยสะอาดโดยการปลูกแบบวางลำในไร่เกษตรกร โดยให้เกษตรกรนำไปปลูกในพื้นที่อำเภอน้ำพองเพื่อใช้เป็นแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดของศูนย์เรียนรู้การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสินค้าเกษตรหนองหารจาง ตำบลน้ำพอง อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ได้ติดตามแปลงเกษตรกรยังไม่พบโรคใบขาว และเกษตรกรนำไปปลูกขยายในฤดูปลูกปี 2564 ไม่พบโรคใบขาว

การแสดงอาการใบขาวในอ้อยพบว่าเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ความแข็งแรงของต้น และสภาพแวดล้อม จากการศึกษาผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวระดับต่างๆ ในสภาพควบคุมด้วยการใช้ภาวะร้อนและแล้งในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ (33-39°C) ความชื้นสัมพัทธ์ (60%) ความเข้มแสง (20,000 LUX) และเวลาส่องสว่าง:มืด (14:10 ชม.) ไม่ให้น้ำระหว่างทดสอบเป็นเวลา 4 วัน แล้วทำการฟื้นต้น พบว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาตั้งแต่ 100 copy/ul ในดีเอ็นเออ้อย 25 ng สามารถชักนำอาการใบขาวในอ้อยได้ ส่วนปริมาณเชื้อ 10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng หรือน้อยกว่า ไม่แสดงอาการใบขาว ในกลุ่มต้นที่มีเชื้อน้อยกว่า 1 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng พบว่าหน่อใหม่ที่งอกมีสีเขียว ส่วนกลุ่มที่มีเชื้อระดับมากกว่า 1 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng

กรมวิชาการเกษตร

จะให้หน่อเป็นต้นใบขาว อ้อยที่ติดเชื้อใบขาวระดับสูงพบว่ามีสภาวะเครียดออกซิเดชั่นสูง และความแตกต่างของชุดดินมีผลต่อสภาวะเครียดและปริมาณเชื้อใบขาวในอ้อย โดยพบว่ากลุ่มต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินวาริน มีปริมาณเชื้อสูงกว่ากลุ่มต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินกำแพงแสน การทดสอบในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีเชื้อใบขาวในระดับต่ำกว่า 0.5-10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng ในสภาพแวดล้อมต่างๆ 5 แหล่ง ได้แก่ ศวพ. บุรีรัมย์ แปลงเกษตรกรในอำเภอลำปลายมาศ ศวพ.สุรินทร์ ศวพ.โนนสูง และ ศวพ. ศรีษะเกษ ไม่พบอาการใบขาวในอ้อยปลูก ดังนั้นระดับปริมาณเชื้อที่ควรใช้ในการคัดกรองต้นแม่พันธุ์ควรอยู่ที่ระดับต่ำกว่า 1 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng สำหรับการขยายพันธุ์สะอาด รวมทั้งเป็นระดับที่ใช้ควบคุมการระบาดของโรคใบขาวได้

การศึกษาถึงการเพิ่มของปริมาณเชื้อใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อยทำการศึกษาใน 2 สภาวะ ได้แก่ (1) ในสภาพไร่ จากการวิเคราะห์ตัวอย่างอ้อยที่ปลูกในแปลง ศวร.ขก. ที่ไม่ได้ใส่ปัจจัยอื่นนอกจากให้น้ำในช่วงหน้าแล้ง และอ้อยแสดงภาวะเครียดจากการขาดน้ำ พบว่าเชื้อใบขาวมีการเพิ่มปริมาณสูงขึ้นภายในต้นเมื่อเข้าสู่หน้าแล้งและเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อเข้าสู่หน้าฝน โดยในช่วงเริ่มต้น (พ.ย. ถึง ธ.ค.) มีต้นที่มีเชื้อระดับปลอดภัย (สีฟ้าและสีเขียว) เป็นจำนวนร้อยละ 65 และ 72 ตามลำดับ และสีเหลืองร้อยละ 35 และ 28 ตามลำดับ ในช่วงฤดูร้อน (มี.ค.) มีปริมาณเชื้อระดับสีเหลืองเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 74 และเมื่อเข้าสู่หน้าฝนมีต้นที่มีต้นที่มีปริมาณเชื้อเข้าสู่ระดับสีส้มร้อยละ 16 ส่วนต้นที่มีเชื้อในระดับปลอดภัยลดลงเหลือเพียงร้อยละ 10แสดงให้เห็นว่าเชื้อใบขาวมีการเพิ่มปริมาณภายในต้นตามการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเมื่อนำต้นระดับปริมาณเชื้อสีส้มนี้ไปปลูกขยาย จะได้เป็นต้นใบขาว (2) ในสภาพการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผลการตรวจปริมาณเชื้อใบขาวในต้นอ่อนอ้อยที่ขยายพันธุ์ในรุ่น 1 ถึง 7 พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมามีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นตามจำนวนรุ่นที่ขยาย โดยพบว่าในรุ่นที่ 1-3 มีต้นที่มีเชื้ออยู่ในระดับรหัสสีเขียวร้อยละ 50-94 ส่วนในรุ่นการขยายที่ 4- 6 พบว่าเชื้อมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นภายในต้น โดยมีมีสัดส่วนของต้นที่มีปริมาณเชื้อในระดับสีเหลืองร้อยละ 60-94 จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าเชื้อมีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอภายในเนื้อเยื่อทำให้ประชากรต้นอ่อนที่ได้จากการขยายเพิ่มปริมาณจากต้นแม่ มีปริมาณเชื้อภายในประชากรแปรปรวนสูง ดังนั้นในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีการตรวจเชื้อเพื่อคัดเลือกต้นแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อสำหรับการขยายในรุ่นต่อมาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรุ่นที่ 2 และไม่ควรขยายพันธุ์เกิน 3 -4 รุ่น ซึ่งพบว่าต้นที่ขยายในรุ่นที่ 5 มีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ แคระแกร็น ไม่เหมาะสมต่อการนำไปปลูกขยาย

โรคใบขาวอ้อยนอกจากแสดงอาการใบขาวแล้ว ยังพบว่าอาการเส้นกลางใบเหลืองเป็นอาการหนึ่งของโรคใบขาว ซึ่งถูกเข้าใจว่าเป็นการขาดธาตุอาหารและนำต้นที่มีอาการเหล่านี้ไปขยายพันธุ์ ในสภาพปลูกที่ไม่เหมาะสม จะแสดงอาการใบขาวได้ ผลจากการศึกษาอุบัติการณ์การตรวจพบเชื้อโรคใบขาวอ้อยที่มีอาการร่วมกับเส้นกลางใบเหลือง จากการสำรวจในแหล่งปลูกอ้อย 7 จังหวัด ทั้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกของไทย สามารถสำรวจและรวบรวมตัวอย่างอ้อยที่มีอาการคล้ายโรคนี้ได้ทั้งสิ้น 240 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินจำนวนทั้ง 7 จังหวัด ผลการตรวจวิเคราะห์ดินจากแปลงที่สำรวจ พบว่า จังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครสวรรค์ ระดับ pH ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่สูงส่วนจังหวัดกาญจนบุรีมีปริมาณเหล็กที่ต่ำ ส่วนปริมาณธาตุอาหารในใบอ้อยของแต่ละจังหวัดอยู่ที่ระดับปกติ การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาจากตัวอย่างใบด้วยเทคนิค Nested-PCR มีตัวอย่างที่ให้ผลบวก คิดเป็นร้อยละ 95 ซึ่งส่วนใหญ่มีการติดเชื้อไฟโตพลาสมาในปริมาณที่สูง ตั้งแต่ระดับสีแดง (>1,000 copies/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม) จนถึงระดับสีเหลือง ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าทั้งหมดเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Sugarcane green grassy shoot (SCGGS), Sugarcane grassy shoot (SCGS) และ Sugarcane white leaf (SCWL) ดังนั้นอาการเส้นกลางใบเหลืองนี้จึงเป็นอาการหนึ่งของโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งไม่ควรนำไปขยายพันธุ์

การหาแนวทางกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อย ทำการศึกษาใน 2 แนวทาง ได้แก่ (1) การหาเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อใบขาว พบว่าเชื้อกลุ่ม Xanthomonas สาเหตุโรคใบลวก ทำให้มีต้นที่แสดงอาการใบขาวลดลง จากการปลูกเชื้อ Xanthomonas sp สาเหตุโรคใบลวก 5 ไอโซเลต ในต้นกล้าพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีการติดโรคใบขาว พบว่า isolate B และ D มีแนวโน้มของเชื้อใบขาวลดลงหรือคงตัว ซึ่งอาจนำไปพัฒนาต่อเป็นสารกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อได้ แนวทางที่ (2) การฉายรังสีแกมม่าแบบเฉียบพลัน พบค่า LD_{50} ของระดับปริมาณรังสีในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ที่ 47 Gy โดยระดับรังสีที่ 90 Gy ขึ้นไป ต้นตายทั้งหมด และที่ 30 Gy มีการเจริญเติบโตปกติ การทดสอบในอ้อยที่ติดโรคใบขาวพบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ฉายรังสีมีการแสดงอาการใบขาวมากกว่ากลุ่มฉายรังสี (60.8% และ 14.3% ตามลำดับ) และที่ 5 เดือนหลังปลูกพบว่ากลุ่มควบคุมมีต้นที่มีเชื้อสูงและแสดงอาการใบขาวมากกว่าในกลุ่มฉายรังสี จากการศึกษาพบว่าระดับปริมาณเชื้อในเนื้อเยื่ออาจมีผลต่อประสิทธิภาพของการใช้รังสี รังสีที่ระดับ 20-60 Gy อาจสามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีปริมาณในระดับ 1 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng หรือน้อยกว่าได้ ในขณะที่เชื้อในระดับ 1-10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ฉายและไม่ฉายรังสี

กรมวิชาการเกษตร

วิธีการตรวจเชื้อใบขาวในปัจจุบันยังมีปัญหาความล่าช้า ความไว ความแม่นยำของวิธีการและราคาแพง ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการใหม่ 4 วิธีการ เป็นวิธีการในการตรวจโรคใบขาว 3 วิธีการ และวิธีการในการตรวจการติดเชื้อซ้ำซ้อนอีก 1 วิธีการ การพัฒนาเทคนิคใหม่ M13-tagged two-steps-PCR เพื่อทดแทนวิธี nested-PCR ที่ใช้เวลานานและราคาสูงในการตรวจโรคใบขาว พบว่าวิธีใหม่มีความไวสูงขึ้นกว่า PCR ทั่วไปแต่น้อยกว่าวิธี nested-PCR ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายลดลงเท่าตัว การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจยีน Immunodominant protein (IMP) สำหรับการตรวจระดับปริมาณเชื้อใบขาวด้วย qPCR เพื่อทดแทนเครื่องหมายโมเลกุลเดิมที่มีปัญหา พบว่ามีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อใบขาวสูง ทำให้ตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วย qPCR ได้อย่างแม่นยำยิ่งขึ้น การพัฒนาเทคนิคตรวจโรคใบขาวที่ง่ายและรวดเร็ว ด้วยเทคนิค LAMP พบว่าเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ใช้เวลาในการตรวจเพียง 2 ชั่วโมง ประหยัด ใช้เครื่องมือจำนวนน้อย และง่ายต่อการปฏิบัติ สามารถนำไปใช้ในการตรวจโรคใบขาวได้ในห้องปฏิบัติทั่วไป ในตัวอย่างอ้อยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นซ้ำซ้อนบางชนิดพบว่ารบกวนผลการตรวจหาเชื้อโรคใบขาว ทำให้แปลผลผิดหรือไม่สามารถอ่านผลได้ การตรวจแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีดั้งเดิมใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 14 วัน การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแบบใหม่ด้วยเทคนิค High-Resolution Melting (HRM) พบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจจำแนกชนิดของเชื้อที่ซ้ำซ้อนอยู่กับโรคใบขาวได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 วัน ผลการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจากยีน 16S-23S rDNA (p210/p1370) พบว่าสามารถตรวจเชื้อและจำแนกเชื้อจากตัวอย่างอ้อยได้อย่างน้อย 8 ชนิด สามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างต่อครั้ง โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียต่ำที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้ คือ 0.1% ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลตัวอย่างอ้อยที่มีการติดเชื้อซ้ำซ้อนได้ง่ายและรวดเร็ว

เทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นนี้ รวมทั้งข้อมูลองค์ประกอบ จะทำให้สามารถนำมาใช้ในการจัดการและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และต่อเนื่องจากต้นทางที่ผลิตแม่พันธุ์สะอาด จนถึงปลายทางที่ควบคุมระดับปริมาณเชื้อในแปลงให้อยู่ในระดับที่ไม่สร้างความเสียหายต่อผลผลิต จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำมาจัดทำเป็นคำแนะนำการใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคใบขาวเฉพาะพื้นที่ที่ผสมผสานข้อมูลการจัดการในสภาพไร่ การใช้ท่อนพันธุ์สะอาด ที่ใช้เทคโนโลยีด้านการตรวจคัดกรองโรค ร่วมกับองค์ความรู้ด้านการลดความเสี่ยงในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะนำไปสู่การลดความเสียหายจากโรคใบขาวและการจัดการควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างยั่งยืน

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

โรคใบขาวของอ้อยเป็นโรคที่สร้างความเสียหายมากที่สุดในอุตสาหกรรมอ้อยของไทย มีการระบาดเป็นเวลายาวนานต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน การใช้ท่อนพันธุ์ปลอดเชื้อร่วมกับการจัดการในสภาพไร่ เป็นแนวทางในการจัดการโรคใบขาวได้อย่างยั่งยืน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อวิจัยและพัฒนาในหัวข้อดังกล่าว เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการจัดทำคำแนะนำการใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคใบขาวเฉพาะพื้นที่ และเพื่อให้ได้เทคโนโลยีในการกำจัดเชื้อในสภาพเนื้อเยื่อ

ในการจัดการในสภาพไร่ ผลจากการศึกษาปริมาณธาตุอาหารรองในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในระดับต่างๆ ร่วมกับการตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่าสัดส่วนธาตุอาหารในอ้อยที่เหมาะสมที่ทำให้อ้อยไม่เป็นโรคใบขาว ในอ้อยปลูก พบว่ามีธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสีร้อยละ 0.83, 0.45, 1.136, 0.094, 0.093, 0.0077 และ 0.0009 ตามลำดับ และอ้อยตอ ร้อยละ 1.42 0.48 1.73 0.19 0.09 0.011 และ 0.00096 มีสมดุลของธาตุไนโตรเจนและแมกนีเซียมระหว่าง 8.81-8.96 และมีสมดุลของธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสระหว่าง 2.50-2.79 ในลดการแสดงอาการโรคใบขาวของท่อนพันธุ์ พบว่าการแช่สารละลาย $ZnSO_4$ ที่เข้มข้น 1% ที่ระยะเวลา 15 และ 20 นาทีทำให้เชื้อไฟโตพลาสมาลดลง จากการศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาว ใน 9 จังหวัด พบว่าการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินช่วยลดความรุนแรงของการแสดงอาการใบขาวได้ การปลูกอ้อยในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคใบขาวสร้างความสูญเสียต่อผลผลิต จากการจัดทำแผนที่ความเสี่ยงการระบาดของโรคใบขาวอ้อยเพื่อใช้สำหรับวางแผนการปลูก โดยใช้ข้อมูลชนิดของเนื้อดิน ความลึกของชั้นดินบน ความแน่นของดิน จากชุดดิน 294 ชุดดิน นำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สมการ ความรุนแรงใบขาวของอ้อย ร่วมกับปริมาณน้ำฝน แล้ววิเคราะห์ข้อมูลเป็นเชิงพื้นที่และเชิงเวลา พบว่าแผนที่ที่ได้มีความแม่นยำแต่ละระดับความเสี่ยง (น้อยไปมาก :1-5) ตั้งแต่ 50% ถึง 100% ในพื้นที่เสี่ยง นอกจากการจัดการธาตุอาหาร พบว่าการปลูกอ้อยตามถั่วลิสง และ ถั่วมะแฮะ เพื่อหมุนเวียนจะสามารถตัดวงจรการระบาดของโรคใบขาวลงได้ ในการจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคใบขาวน้อย จากการทดลองโดยใช้อ้อยที่ผ่านการตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาว มีเชื้อในระดับสีฟ้าและสีเขียว (0-1 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร่วมกับการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area พบว่าไม่พบเชื้อโรคใบขาวในระดับไม่ปลอดภัยต่อการเกิดโรคใบขาว การขยายผลจากการนำท่อนพันธุ์อ้อยตอ 1 ไปในไร่เกษตรกร ที่อำเภอน้ำพองยังไม่พบโรคใบขาว

ในการจัดการควบคุมกำจัดเชื้อในระดับเนื้อเยื่อพืช ผลจากการศึกษาผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวระดับต่างๆ พบว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาตั้งแต่ 100 copy/ul สามารถชักนำอาการใบขาวในอ้อยได้ ที่ 10 copy/ul หรือน้อยกว่า ไม่แสดงอาการใบขาว ส่วนเชื้อน้อยกว่า 1 copy/ul พบว่าหน่อใหม่ที่งอกมีสีเขียว จากการทดสอบอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีเชื้อในระดับต่ำกว่า 10 copy/ul ในสภาพไร่ในสภาพแวดล้อมต่างๆ ใน 5 จังหวัด พบว่าไม่แสดงอาการใบขาวในอ้อยปลูก ดังนั้นระดับปริมาณเชื้อที่ควรใช้ในการคัดกรองต้นแม่พันธุ์ควรอยู่ที่ระดับต่ำกว่า 1 copy/ul ส่วนในการควบคุมการแพร่ระบาดและลดความรุนแรงในสภาพไร่ ควรมีระดับเชื้อไม่เกิน 10 copy/ul ในการศึกษาถึงการเพิ่มของปริมาณเชื้อใบขาวในอ้อยที่ปลูกในแปลง และแสดงภาวะเครียดจากการขาดน้ำ พบว่าเชื้อมีการเพิ่มปริมาณสูงขึ้นภายในต้นเมื่อเข้าสู่หน้าแล้งและเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อเข้าสู่หน้าฝน แสดงให้เห็นว่าในสภาวะเครียดเชื้อใบขาวมีการเพิ่มปริมาณภายในต้นตามการเจริญเติบโตของพืช ส่วนในการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมามีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นตามจำนวนรุ่นที่ขยาย และเชื้อมีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอ ดังนั้นในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีการตรวจเชื้อเพื่อคัดเลือกต้นแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อสำหรับการขยายในรุ่นต่อมาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรุ่นที่ 2 และไม่ควรขยายพันธุ์เกิน 3 -4 รุ่น

อาการเส้นกลางใบเหลืองในอ้อยมักถูกมองว่าเกิดจากการขาดธาตุ ผลจากการศึกษาปริมาณธาตุอาหารในใบอ้อยที่มีอาการเส้นกลางใบเหลืองร่วมกับอาการคล้ายเป็นโรคสำรวจในแหล่งปลูกอ้อย 7 จังหวัดพบว่าปริมาณธาตุอาหารในใบอ้อยของแต่ละจังหวัดอยู่ที่ระดับปกติ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าทั้งหมดเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Sugarcane green grassy shoot (SCGGS), Sugarcane grassy shoot (SCGS) *และ* Sugarcane white leaf (SCWL) ดังนั้นเพื่อการควบคุมการแพร่ระบาดมีประสิทธิภาพ อาการเส้นกลางใบเหลืองนี้จึงเป็นอาการหนึ่งของโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งไม่ควรนำไปขยายพันธุ์ ในการหาแนวทางกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยโดยหาเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อใบขาว ด้วยการปลูกเชื้อในอ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาว พบว่าเชื้อกลุ่ม Xanthomonas มีแนวโน้มของเชื้อใบขาวลดลงหรือคงตัว ซึ่งอาจนำไปพัฒนาต่อเป็นสารกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อได้ ส่วนการฉายรังสีแกมม่าแบบเฉียบพลัน เพื่อแนวทางในการกำจัดเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อย พบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ฉายรังสีมีการแสดงอาการใบขาวมากกว่ากลุ่มฉายรังสี โดยพบว่าระดับปริมาณเชื้อในเนื้อเยื่ออาจมีผลต่อประสิทธิภาพของการใช้รังสี รังสีที่ระดับ 20-60 Gy อาจสามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีปริมาณในระดับ 1 copy/ul

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ในดีเอ็นเอพืช 25 ng หรือน้อยกว่าได้ การตรวจคัดกรองเชื้อนับเป็นหัวใจสำคัญในการควบคุมโรคใบขาว แต่วิธีการตรวจเชื้อใบขาวในปัจจุบันยังมีปัญหาความล่าช้า ความไว ความแม่นยำของวิธีการและราคาแพง ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการใหม่ 4 วิธีการ ได้แก่ (1) เทคนิค M13-tagged two-steps-PCR เพื่อทดแทนวิธี nested-PCR ที่ใช้เวลานานและราคาสูง (2) พัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจยีน Immunodominant protein (IMP) สำหรับการตรวจระดับปริมาณเชื้อใบขาวด้วย qPCR เพื่อทดแทนเครื่องหมายโมเลกุลเดิมที่มีปัญหาความไม่แม่นยำ (3) พัฒนาเทคนิค Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) ที่ตรวจโรคใบขาวที่ง่าย รวดเร็ว และประหยัด สามารถนำไปใช้ในการตรวจโรคใบขาวได้ในห้องปฏิบัติทั่วไป (4) เทคนิค High-Resolution Melting (HRM) เพื่อแยกชนิดแบคทีเรียอย่างรวดเร็วที่รบกวนการตรวจหาเชื้อโรคใบขาวในตัวอย่างอ้อย

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นทำให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำมาจัดทำเป็นคำแนะนำการใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคใบขาวเฉพาะพื้นที่ที่ผสมผสานข้อมูลการจัดการในสภาพไร่ การใช้ท่อนพันธุ์สะอาด ที่ใช้เทคโนโลยีด้านการตรวจคัดกรองโรค ร่วมกับองค์ความรู้ด้านการลดความเสี่ยงในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งจะนำไปสู่การลดความเสียหายจากโรคใบขาวและการจัดการควบคุมการระบาดของโรคได้อย่างยั่งยืน

กรมวิชาการเกษตร

Abstract

Sugarcane white leaf disease is one of the most devastated diseases that has long been destroying sugarcane productivity in Thailand. Planting of clean seed canes in cooperation with field management, promote effectivity and sustainability controlling of this disease. This project thus aimed to achieve outputs of those research activities mentioned, to formulate region-specific condition technologies and recommendations for sustainably controlling of the white leaf disease. Moreover, it is also aimed to develop technologies for effective white leaf disease elimination in the plant tissues that can be used as source for clean and healthy seed canes.

In the field condition, the study on trace elements in the sugarcane with different white leaf disease severity revealed that nutrient elements concentration i.e., nitrogen, phosphorus potassium, calcium, magnesium, iron, and zinc in plant tissues at 0.83%, 0.45%, 1.136%, 0.094%, 0.093%, 0.0077% and 0.0009% respectively, promoted seed canes health in plant canes, while those of ratoon cane were at of 0.39%, 0.13%, 0.097%, 0.029%, 0.034%, 0.0038% and 0.0006% respectively. The proper balance of nitrogen and magnesium was 8.81-8.96, and potassium and phosphorus was 2.50-2.79. To promote seed cane health and reduce white leaf symptom, soaking seed canes in 1% $ZnSo_4$ solution for 15 to 20 minutes resulted in healthy seed canes that harbored low phytoplasma concentration. Field management plays part in subsiding disease severity. The study on nutrient management in the fields located in 9 provinces, showed that application of fertilizers as recommended by soil tests based on deficiency correction reduced the incidence of white leaf disease. It is known that planting in the disease hot spot reduce the production. In this study, the white leaf disease risk map was created using soil data of 294 soil series and rainfall, then spatial and temporal analysis of data. Accuracy analysis of the map based on different disease severity level at low to high risks (1 to 5) was between 50% to 100%. To promote sugarcane productivity in the white leaf disease risk areas, using of peanut and pigeon pea as rotate crops can interrupt the cycle of white leaf disease. In the experiment on producing of healthy mother plant plot in the low risk area, clean seed canes with low phytoplasma in the blue and green codes level were planted in the field with border area. It was found that phytoplasma in the seed canes were at low concentration and classified as safe level. Extension of this clean seed cane production technology has been transferred to the farmers. No white leaf disease was observed so far.

To understanding the pathogen ecology in plant tissues, investigation on the impact of phytoplasma doses and growing environment to white leaf symptom expression was conveyed. It was found that some plants harboring phytoplasma concentration at 100 copies/µl showed transient white leaf symptom, while those at 10 copies and less, did not show white symptom in the leaf. The new shoots emerged from plant samples with phytoplasma less than 1 copy/µl revealed green. No white leaf symptom observed in sugarcane var KK3. harbored phytoplasma concentration at less than 10 copies/µl testing in the field located in 5 different planting areas. Hence, the phytoplasma concentration at less than 10 copies/µl can be used as threshold for field disease surveillance, while at less than 1 copy is used as screening threshold of healthy seed canes. The investigation on the increase of phytoplasma concentration in plant with severe drought stress in the field revealed that increase of phytoplasma concentration during summer and proliferate higher during rainy season along with plant growth. In the sugarcane propagated by tissue culture revealed phytoplasma proliferation along with the consecutive subculturing and distribute unevenly in the plant tissues. Therefore, screening for phytoplasma free mother plantlet is essential. The subculturing should not more than 3 to 4 generations.

Yellow midrib syndrome was recognized as malnutrition in sugarcane. Nutrient analysis of the suspected sugarcane samples with yellow midrib syndrome surveying from 7 provinces revealed normal levels.

กรมวิชาการเกษตร

Nucleotide analysis revealed 3 phytoplasmas i.e., sugarcane green grassy shoot (SCGGS), sugarcane grassy shoot (SCGS) and sugarcane white leaf (SCWL). It is thus concluded that the yellow midrib syndrome in sugarcane is a mild symptom of phytoplasma infected diseases and not recommended for propagation. The searching for a potential bacterial antagonist to control phytoplasma in plant tissues revealed that the inoculation of *Xanthomonas* spp. in sugarcane with phytoplasma infection, resulted in reduction or stabilized the number of plants with white leaf symptom. This finding can lead to further development of antibiotic to suppress phytoplasma in plant tissue. Irradiation was applied as trial to eliminate the pathogen in the sugarcane tissue. The result showed that acute gamma irradiation in sugarcane var KK3 population resulted in lower number of plants with white leaf. The effectiveness of the irradiation affected by phytoplasma concentration in the plant tissues. Irradiation at 20-60 Gy were effective in the plant harbored phytoplasma at 1 copy/ul or less. Disease screening is the main part to control white leaf disease spreading, however the detection techniques are facing slowness, high cost, detection sensitivity and precision. Four new detection techniques were developed in this project. (1) M1 3-tagged two-steps-PCR was developed as a high sensitivity method alternative to the nested-PCR. (2). The new markers developed for the Immunodominant protein (IMP) was found more accurate quantification of phytoplasma in qPCR than the marker of 16rDNA based. (3). LAMP detection techniques was developed as the fast, simple and low cost for white leaf disease detection. (4). High-Resolution Melting (HRM) was developed identifying of bacterial in the multiple infection in 1 day.

The result and information from the above experiments that integrate field management technology in cooperation with clean seed canes production technology will be used to formulate the area-based recommendation for effective white leaf disease control. The cost-effective detection techniques in cooperation with disease tolerant threshold will be use as the recommendation for disease surveillance to effective and sustainably control of the white leaf disease.

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบคุณผู้ร่วมดำเนินงานทุกท่าน รวมถึงกลุ่มผู้ช่วยนักวิจัยทั้งที่เกี่ยวข้องกับการดำเนินงานด้านวิทยาศาสตร์ในห้องปฏิบัติการ ในแปลงทดลอง ที่ช่วยให้สามารถดำเนินการทดลองได้ประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โรงงานน้ำตาลพิมาย โรงงานน้ำตาลไทยเอกลักษณ์ โรงงานน้ำตาลเกษตรไทย โรงงานน้ำตาลภาคตะวันออก โรงงานน้ำตาลเอราวัณ และเครือข่ายเกษตรกร ที่ให้การสนับสนุนการดำเนินงาน รวมทั้งอนุเคราะห์ตัวอย่างอ้อยที่ใช้ในการวิเคราะห์ นอกจากนี้คณะวิจัยขอขอบคุณเกษตรกรดีเด่น นายวีนัด และ นางบุญพร้อม สำราญวงศ์ ปราชญ์ชาวไร่อ้อยอำเภอลำปลายมาศ จังหวัดบุรีรัมย์ นางอุทัย สุขศรีพะเนาว์ ชาวไร่อ้อยอำเภอจักราช จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความรู้จากประสบการณ์ด้านการปลูกอ้อยแบบผสมผสานที่ให้ผลให้ผลผลิตสูงอย่างยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม รวมทั้งให้ความร่วมมือในระหว่างการดำเนินงานวิจัย เป็นอย่างดีเยี่ยม ขอขอบคุณคณาจารย์จากคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และศูนย์วิจัยอ้อยและน้ำตาลภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รศ.ดร.ประสิทธิ์ ใจศีล ศ.ดร. ยุพา หาญบุญทรง รศ.ดร.พัชรินทร์ ส่งศรี และคณาจารย์ที่ให้การสนับสนุนและให้ความร่วมมือกับโครงการนี้เป็นอย่างดีเยี่ยม รวมทั้งให้โอกาสในการขยายผลงานวิจัยสู่เกษตรกร นักวิชาการ รวมทั้งหน่วยงานเป้าหมาย ขอขอบคุณ ดร.ธวัช หะหมาน และคณะนักวิชาการจากศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายทั้ง 4 ภาค จากสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุสาหกรรม และอาจารย์รังสิต เฮียงราช และบริษัท ไทยชูการ์ มิลเลอร์ จำกัด (TSMC) ที่ให้โอกาสในการขยายผลงานวิจัยสู่ผู้ใช้ประโยชน์เป้าหมายทั้งในประเทศและประเทศสมาชิกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ขอขอบคุณนักวิจัยจากศูนย์ขยายพันธุ์พืชเขตที่ 10 กรมส่งเสริมการเกษตร อาจารย์สังคม ออมอด อาจารย์สุมณฑา คำโฮง และคณะนักวิจัย ที่ให้ความร่วมมือกับการดำเนินงานในโครงการใบขาวอย่างดีเยี่ยม ทั้งเอื้อเฟื้อต้นอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณคณะนักวิจัยจากหน่วยงาน Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS) Dr. Kobori Youichi, Mr. Ando Shataro, Dr. Terajima Yoshifumi และ Dr. Shinichi Tsuruta ที่ให้ความร่วมมือ สนับสนุนงานวิจัย และร่วมดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดีเยี่ยม รวมทั้งให้โอกาสนำเสนอผลงานวิจัยและจัดการประชุมเชิงปฏิบัติการในระดับนานาชาติ ขอขอบคุณบริษัท Kaneka และบริษัท Ushio จากประเทศญี่ปุ่น รวมทั้งบริษัทมิตซุยจำกัด ที่สนับสนุนการพัฒนางานด้านเทคโนโลยีการตรวจโรคใบขาวเป็นอย่างดีเยี่ยมรวมทั้งให้โอกาสในการขยายผลงานวิจัยสู่ผู้ใช้งานเป้าหมาย ขอขอบคุณนักวิชาการอาวุโสด้านอ้อยแห่งสถาบันวิจัยพืชไร่ ดร.ศรีสุดา ทิพยรักษ์ อาจารย์วีระพล พลรักดี ดร.ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ อาจารย์รังสี เจริญสถาพร อาจารย์ทักษิณา สันสยะวิชัย อาจารย์สุนี ศรีสิงห์ อาจารย์วิภาวรรณ กิตติวัชระ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษา รวมถึงให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณกรมวิชาการเกษตรที่ให้โอกาสในการดำเนินวิจัยโครงการนี้ คณะนักวิจัยในโครงการวิจัยป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยจึงใคร่ขอขอบคุณท่านที่สนับสนุนงานวิจัยทั้งที่กล่าวนามและไม่ได้กล่าวนาม ด้วยความเคารพ นับถือ และจริงใจมา ณ โอกาสนี้ด้วย

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	1
บทคัดย่อ	5
Abstract	7
กิตติกรรมประกาศ	9
สารบัญ	10
สารบัญภาพ	11
สารบัญตาราง	12
บทที่ 1 บทนำ	13
บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน	19
บทที่ 3 ผลการศึกษา	38
บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล	51
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	63

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 4.1.1 แผนที่ความเสี่ยงในการเกิดใบขาวในอ้อยปลูก (ก) และอ้อยตอ (ข) 63

ภาพที่ 4.2.1 การจัดทำแปลงผลิตพันธุ์อ้อยสะอาดโดยการตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาวและการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area 63

ภาพที่ 4.2.2 ปริมาณเชื้อโรคใบขาวในอ้อยปลูกแปลงผลิตพันธุ์อ้อยสะอาดโดยการตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาวและการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area 64

ภาพที่ 5.2.1 Xanthomonas isolates ที่ใช้ในการปลูกเชื้อในตัวอย่างอ้อยชุดที่ 2-2561 ที่อายุ 2 เดือน 65

ภาพที่ 5.4.1 เปรียบเทียบความจำเพาะของวิธีการตรวจโรคใบขาวด้วย nested-PCR (ซ้าย) และ M13-tagged two steps- PCR (ขวา) ในตัวอย่างใบอ้อยที่เก็บจากแปลงทดลอง 65

ภาพที่ 5.4.2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี M13-tagged two steps- PCR เปรียบเทียบกับข้อมูลสากลของ SCWL และ SCGS 65

ภาพที่ 5.4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค LAMP ต่อเชื้อphytoplasma genesด้วยเทคนิค LAMP 66

ภาพที่ 5.4.4 ผลจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย Primer Imp2 66

ภาพที่ 5.5.1 สัดส่วนปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในอ้อย 67

ภาพที่ 5.6.1 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างอ้อย 67

ภาพที่ 5.6.2 การวิเคราะห์ Melting curve และ Normalized curve ด้วยวิธี real-time PCR บริเวณยีน 16S-23S rRNA เชื้อแบคทีเรียและเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย 68

ภาพที่ 5.6.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยจากการใช้ฐานข้อมูลลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรีย 8 ชนิด 68

ภาพที่ 5.7.1 สัดส่วนของต้นอ่อนอ้อยที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแต่ละรุ่นของการขยายเพิ่มจำนวนและระดับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาภายในต้น ตรวจวิเคราะห์ยีนเป้าหมาย 16S-23S rDNA ด้วยวิธี nested-PCR 69

ภาพที่ 5.7.2 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ่อนอ้อยที่ขยายเพิ่มปริมาณด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแต่ละรุ่นของการขยายเพิ่มปริมาณ วิเคราะห์ด้วย qPCR ใช้ยีนเป้าหมาย 16S rDNA 69

ภาพที่ 5.8.1 อาการเส้นกลางใบเหลืองในอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา 70

ภาพที่ 5.8.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยของแต่ละพื้นที่ 70

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1.1 ผลการวิเคราะห์ความแม่นยำถูกต้องจากการสำรวจภาคสนาม 71

ตารางที่ 5.1.1. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาวิเคราะห์ด้วย 16S-23S rDNA nested-PCR และ secA gene ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ได้จากลำที่ติดเชื้อใบขาว ก่อนการทดสอบ และสีของใบในวันที่ 5 และ90 วันหลังทดสอบในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 33 °C ความชื้น 55% RH ความเข้มแสง 20,000 LUX ระยะเวลาส่องสว่าง/มืด 14/10 ชม. 71

ตารางที่ 5.2.1 ปริมาณเชื้อโรคใบขาวในใบอ้อยหลังการปลูกเชื้อโรคใบลวก ตรวจด้วย nested-PCR และ secA 72

ตารางที่ 5.3.1 อัตราการงอกและการเกิดอาการใบขาวในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมม่าแบบเฉียบพลันที่ระดับ 0-150 Gy ที่อายุ 2 เดือนหลังปลูก 73

ตารางที่ 5.3.2 เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีอาการใบขาวหลังผ่านการฉายรังสีแกมม่าแบบเฉียบพลันที่ระดับ 20-80 Gy 73

ตารางที่ 5.4.1 ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจด้วยเทคนิค LAMP และ Nested PCR ใช้พลาสมิด pUC1318 ที่มีชิ้นยีนขนาด 700 คู่เบสของ 16S-23S rDNA ในการทดสอบ copy number 74

ตารางที่ 5.7.1 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในอ้อยขยายพันธุ์รุ่นที่ 1-7 ที่ขยายเพิ่มปริมาณด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตรวจวิเคราะห์ยีนเป้าหมาย 16S-23S rDNA ด้วยวิธี qPCR 74

ตารางที่ 5.8.1 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของดินในแปลงปลูกอ้อยและตัวอย่างใบอ้อยที่มีอาการเส้นกลางใบเหลือง 75

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 1 บทนำ

1. วิสัยทัศน์ และพันธกิจของหน่วยงาน

วิสัยทัศน์

กรมวิชาการเกษตรเป็นองค์กรที่เป็นเลิศด้านการวิจัยและพัฒนาด้านพืช เครื่องจักรกลการเกษตร และเป็นศูนย์กลางรับรองมาตรฐานสินค้าเกษตรด้านพืชในระดับสากล บนพื้นฐานการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

พันธกิจ

1. สร้างและถ่ายทอดองค์ความรู้จากงานวิจัยด้านพืชและเครื่องจักรกลการเกษตรสู่กลุ่มเป้าหมาย
2. กำหนดและกำกับดูแลมาตรฐานระบบการผลิตและผลิตพันธุ์พืชและปัจจัยการผลิต พัฒนาระบบตรวจรับรองสินค้าการเกษตรด้านพืชให้เป็นที่ยอมรับในระดับสากล
3. อนุรักษ์และพัฒนาการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพด้านพืช แมลง และจุลินทรีย์
4. กำกับ ดูแล และพัฒนากฎหมายที่กรมวิชาการเกษตรรับผิดชอบ

2. ยุทธศาสตร์ชาติที่สอดคล้องกับแผนปฏิบัติงานด้าน ววน. ของหน่วยงาน (โปรดเลือกเฉพาะยุทธศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับหน่วยงานของท่าน)

- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 1 ด้านความมั่นคง
  เพื่อบริหารจัดการสภาวะแวดล้อมของประเทศให้มีความมั่นคง ปลอดภัย และมีความสงบเรียบร้อยในทุกระดับและทุกมิติ
- ☑ ยุทธศาสตร์ที่ 2 ด้านการสร้างความสามารถในการแข่งขัน
  เน้นการยกระดับศักยภาพในหลากหลายมิติควบคู่กับการขยายโอกาสของประเทศไทยในเวทีโลก
- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 3 ด้านพัฒนาและเสริมสร้างศักยภาพทรัพยากรมนุษย์
  คนไทยในอนาคต มีความพร้อมทั้งกาย ใจ สติปัญญา มีทักษะที่จำเป็นในศตวรรษที่ 21 มีทักษะสื่อสารภาษาอังกฤษและภาษาที่ 3 และมีคุณธรรม
- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 4 ด้านการสร้างโอกาสและความเสมอภาคทางสังคม
  สร้างความเป็นธรรม และลดความเหลื่อมล้ำในทุกมิติ กระจายศูนย์กลางความเจริญทางเศรษฐกิจและสังคม เพิ่มโอกาสให้ทุกภาคส่วนเข้ามาเป็นกำลังของการพัฒนาประเทศในทุกระดับ
- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 5 ด้านการสร้างการเติบโตบนคุณภาพชีวิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม
  คำนึงถึงความยั่งยืนของฐานทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ปรับเปลี่ยนพฤติกรรมของประชาชนให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ผ่านมาตรการต่างๆ ที่มุ่งเน้นให้เกิดผลลัพธ์ต่อความยั่งยืน
- ❑ ยุทธศาสตร์ที่ 6 ด้านการปรับสมดุลและพัฒนาระบบการบริหารจัดการภาครัฐ
  การปรับเปลี่ยนภาครัฐ ยึดหลัก “ภาครัฐของประชาชนเพื่อประชาชนและประโยชน์ส่วนรวม”

3. วงเงินงบประมาณกองทุน ววน. ที่ได้รับจัดสรรในปีงบประมาณ พ.ศ. 2564 และโปรดระบุแผนงาน/โครงการให้สอดคล้องกับโปรแกรมของแผน ววน.

โปรแกรมตามแผน ววน.	งบประมาณ (บาท)
P10. ยกระดับความสามารถการแข่งขันและวางรากฐานทางเศรษฐกิจ	2,769,160

4. รายละเอียดโครงการ

ที่มาและความสำคัญ/หลักการและเหตุผล

โรคใบขาวของอ้อยเป็นโรคที่สร้างความเสียหายมากที่สุดในอุตสาหกรรมอ้อยของไทย มีการระบาดเป็นเวลายาวนานต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน สาเหตุหลักเกิดจากการใช้ท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้อโรคใบขาว การระบาดส่วนใหญ่มักอยู่ในแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศ ได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งพื้นที่ส่วนใหญ่เป็นดินทราย ขาดความอุดมสมบูรณ์จึงส่งผลต่อคุณภาพท่อนพันธุ์และความแข็งแรงของต้นอ้อยรวมทั้งมีการจัดการแปลงที่ไม่เหมาะสม มีการเผาใบที่ทำให้ความอุดมสมบูรณ์ของหน้าดินลดลง มักพบ

กรมวิชาการเกษตร

การแสดงอาการใบขาวมากในปีที่มีสภาพภูมิอากาศร้อน แล้ง ฝนทิ้งช่วงเป็นระยะเวลานาน การลดพื้นที่การระบาด และการลดความรุนแรงของโรค ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากขาดความรู้ ความเข้าใจ ในตัวเชื้อโรค การเกิดโรคจึงทำให้ขาดวิธีการและเทคโนโลยีในการจัดการและควบคุมโรคอย่างยั่งยืน นอกจากนี้การคัดกรองโรคยังขาดประสิทธิภาพ สาเหตุจากความยุ่งยากซับซ้อนของวิธีการตรวจ และมีค่าใช้จ่ายที่สูง ทำให้หน่วยตรวจโรคมีน้อย ไม่สามารถยับยั้งการแพร่ระบาดได้ทันการณ์ การใช้อ้อยจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่าอาจเป็นหนึ่งในสาเหตุของการแพร่ระบาดสาเหตุจากใช้วิธีการตรวจโรคที่ไม่ถูกต้อง เกิดเป็นการขยายเพิ่มปริมาณอ้อยที่ติดเชื้อแบบอาการแฝง จากผลการศึกษาที่ผ่านมาของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นพบว่าการแสดงอาการใบขาวเกิดจากปัจจัยหลัก 3 ประการคือ 1) ความแข็งแรงของอ้อย ทั้งในส่วนของท่อนพันธุ์ และต้นในสภาพแปลง 2) สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตที่ส่งผลต่อการเกิดภาวะเครียดในอ้อย ได้แก่สมดุลธาตุอาหาร ความชื้น น้ำ พื้นที่เสี่ยง และ 3) ปริมาณเชื้อโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อย ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหาวิธีตรวจเชื้อและวิธีกำจัดเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อยที่มีประสิทธิภาพ การศึกษาหาเทคโนโลยีและผสมผสานงานทั้งด้านการใช้ท่อนพันธุ์สะอาดและแข็งแรง การกำจัดเชื้อในระดับเนื้อเยื่อ การจัดการสมดุลธาตุอาหารในสภาพไร่ ที่เหมาะสมตามสภาพแวดล้อมต่างๆ การลดความความเสียหายจากโรคใบขาวโดยหลีกเลี่ยงพื้นที่เสี่ยงภัยของโรคนี้ การสร้างความเข้าใจในตัวเชื้อ การส่งถ่ายเชื้อจากรุ่นสู่รุ่น และวิเคราะห์ปัจจัยในการเกิดโรคใบขาว รวมถึงการพัฒนาวิธีการตรวจโรคที่มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว แม่นยำ ง่าย ราคาไม่แพง จะทำให้ได้ข้อมูล แนวทางในการจัดการ และเทคโนโลยีในสู่การจัดการโรคใบขาวอย่างยั่งยืน

โรคใบขาวเกิดจากเชื้อPhytoplasma (Lin and Lee, 1968) มีการแพร่ระบาดโดยเชื้อติดไปกับท่อนพันธุ์และมีเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) (Chen, 1978) และ *Yamatotettix flavovitatus* (ยุพา และคณะ, 2548) เป็นแมลงพาหะนำโรค (Chen,1973,1978; Wongkaew et al., 1997) เพลี้ยจักจั่นชนิดนี้จะแพร่พันธุ์ได้ดีในดินทรายซึ่งเป็นที่วางไข่ ลักษณะของโรคจะพบใบเป็นสีเขียวอ่อนหรือขาวหรือขาวสลับเขียวอ่อน เนื่องจากคลอโรฟิลล์ถูกทำลาย ใบเรียวแคบ อ้อยที่เป็นโรคจะแคระแกร็นในระยะแตกกอจะสังเกตเห็นง่ายเนื่องจากใบที่เกิดใหม่จะเป็นสีขาวต้นอ้อยที่ได้รับเชื้อเมื่อยังมีความแข็งแรงจะไม่ปรากฏอาการให้เห็น โดยจะมีอาการโรคใบขาวแฝง แต่จะทำให้ผลผลิตอ้อยลดลงตั้งแต่ 6.1-74.4% (กนกพร และคณะ, 2552) เมื่อนำต้นอ้อยเหล่านี้ไปทำพันธุ์จะทำให้การระบาดของโรคมากขึ้น หน่อที่งอกใหม่จะแสดงอาการของโรค และรุนแรงมากในอ้อยตอจนไม่สามารถให้ผลผลิต โรคใบขาวเป็นโรคที่ระบาดรุนแรงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีรายงานการระบาดครั้งแรกในปี พ.ศ.2495 ในอ้อยพันธุ์ NCo421 ในแหล่งปลูกอำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง มีรายงานว่าในปี 2532 ทำความเสียหายให้กับพื้นที่ปลูกอ้อยในจังหวัดอุดรธานีประมาณ 50,000 ไร่ (อนุสรณ์, 2534 และ อนุสรณ์, 2536) ข้อมูลจากชมรมสถาบันชาวไร่อ้อยภาคอีสาน ปี 2554 พบว่า มีการระบาดของโรคใบขาวมาก ที่จังหวัดมหาสารคาม 61,000 ไร่ ระบาดในเขตอีสานใต้(จังหวัดนครราชสีมาและชัยภูมิ) 44,598 ไร่ จังหวัดนครราชสีมา 41,645 ไร่ พื้นที่ระบาดในปี 2554 รวม 147,243 ไร่

สำหรับการส่งเสริมการเจริญเติบโตของอ้อยมีรายงานเบื้องต้นว่า การใช้ธาตุอาหารรองบางชนิดสามารถเพิ่มผลผลิตอ้อยที่ติดเชื้อได้กอบเกียรติและคณะ (2553) รายงานว่า อ้อยที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาจะแสดงอาการใบขาวหรือไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในพืชที่มีมากเกินไป มีธาตุสังกะสีและแมกนีเซียมน้อยกว่าอ้อยปกติ และพบว่าการใส่ปุ๋ย ไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) และ โพแทสเซียม (K) มากเกินไปทำให้พืชดูดใช้สังกะสี (Zn) น้อยลง การที่พืชดูดใช้เหล็ก (Fe) มากไป จะทำให้อ้อยดูดใช้ Zn น้อยลง ความรุนแรงของโรคมีความสัมพันธ์กับความสมดุลธาตุอาหารพืช เมื่อสัดส่วนของธาตุอาหารพืชผิดปกติ โดยเฉพาะเหล็ก/โพแทสเซียม (Fe/K ratio) เหล็ก/ไนโตรเจน (Fe/N ratio) จะทำให้กระบวนการชีวเคมี เช่นการเคลื่อนย้ายสารอาหาร ในอ้อยเปลี่ยนแปลงไป ในทางตรงข้ามอาจทำให้อ้อยอ่อนแอลง ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อ และพบว่าการใส่ปุ๋ยไนโตรเจนที่พอเพียงกับอ้อยปลูกมีแนวโน้มทำให้เปอร์เซ็นต์ใบขาวในอ้อยตอ 1 ลดลง การใส่โดโลไมท์ และ/หรือ ซิลิคอนร่วมกับปุ๋ยเคมีก็ให้ผลเช่นเดียวกัน จึงตั้งสมมุติฐานว่าอ้อยที่เป็นโรคใบขาวมีสมดุลของธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองในพืชไม่เหมาะสม ทำให้อ้อยที่ได้รับเชื้อโรคใบขาวแสดงอาการของโรคใบขาวออกมา จึงทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่า อ้อยที่แสดงอาการใบขาวน่าจะมีปริมาณธาตุอาหารในพืชต่ำกว่าปกติ เพื่อนำความรู้ที่ได้ไปจัดการให้อ้อยได้รับธาตุอาหารในระดับที่เหมาะสม เพื่อลดโรคใบขาว นอกจากนี้การจัดทำแปลงแม่พันธุ์ต้องหลีกเลี่ยงพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคใบขาว ซึ่งเป็นปัญหาในเกษตรกรรายย่อย ที่พื้นที่ปลูกน้อย การปลูกแปลงแม่พันธุ์แบบกระจัดกระจายในแปลงเล็ก พบว่าเกิดใบชาวได้จากการติดเชื้อจากแปลข้างเคียงโดยแมลงพาหะ จากการศึกษาของ Kobori (2021) พบว่าการจัดการแปลงที่ออกแบบให้มีขอบแปลงที่มีความกว้างเกินระยะบินของแมลงพาหะล้อมรอบแปลงพันธุ์สะอาดสามารถลดการติดเชื้อจากแปลงข้างเคียงได้ ทำให้ได้ต้นพันธุ์สะอาด ดังนั้นในกรณีที่อยู่ในแหล่งที่มีการระบาดของโรคใบขาว การใช้หลักการนี้จะทำให้ได้เสมือนมีแปลงแยกกัก (isolation area) ที่ป้องกันการติดเชื้อจากแมลงได้

การแสดงอาการใบขาวในอ้อยพบว่าเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ความแข็งแรงของต้น และสภาพแวดล้อม โดยพบว่าอ้อยที่มีปริมาณเชื้อมากแต่ยังไม่แสดงอาการใบขาว จะแสดงอาการได้หากถูกกระตุ้นด้วยสภาวะแวดล้อม

กรมวิชาการเกษตร

ที่ไม่เหมาะสม พบว่าอ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาว เมื่อผ่านสภาพอากาศร้อน แล้ง และขาดน้ำ เป็นระยะเวลานาน แล้วได้รับน้ำหลังจากนั้น จะแสดงอาการใบขาวหลังจากมีการคลี่ใบ หรือมีการงอกใบใหม่ อ้อยที่ลำหลักมีปริมาณเชื้อสูงมาก มักจะแสดงอาการหน่อขาว แต่ในบางครั้งจะพบว่า หน่อขาวนั้นจะตายไป และหน่อใหม่ที่งอกอาจจะไม่แสดงอาการใบขาว มักพบได้ในแปลงที่ดินมีความอุดมสมบูรณ์สูง ชุ่มชื้นซึ่งอาจเกิดจากพืชสามารถควบคุม หรือลดปริมาณเชื้อใบขาวลงได้หากอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การนำอ้อยเหล่านี้มาปลูกในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ดินทราย แล้ง อาจพบอาการใบขาวได้ในรุ่นอ้อยปลูก หรือในรุ่นอ้อยตอ การสังเกตเหล่านี้แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว

จากการศึกษาพบว่าสภาวะแล้ง ขาดน้ำ ทำให้อ้อยเกิดภาวะเครียด และหลังจากฟื้นตัวจากการได้รับน้ำแล้วพบว่าหลายต้นแสดงอาการใบขาว และยังพบอีกว่ากลุ่มที่แสดงอาการใบขาวเหล่านี้ บางต้นใบที่เคยขาวกลับเขียวคืนได้อีก ส่วนต้นที่แสดงอาการใบขาวตั้งแต่เริ่มงอก จะไม่สามารถฟื้นคืนได้และตายในที่สุด แสดงให้เห็นถึงตัวแปรสองชนิดที่แยกกัน คือ ปริมาณเชื้อ และการแสดงอาการใบขาว ซึ่งอาจมีสภาวะเครียดที่เกิดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เป็นตัวเชื่อมให้เกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างสองตัวแปรนี้ โดยที่พืชอาจมีปฏิกริยาตอบสนองต่อความเครียดที่สามารถควบคุมการแสดงอาการหรือปริมาณเชื้อได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าอ้อยที่ติดเชื้อใบขาวมีการสร้างอนุมูลอิสระกลุ่ม Reactive oxygen species (ROS) ขึ้นเพื่อกำจัดเชื้อ รวมทั้งปฏิกิริยาต่อต้านอื่นอีกเพื่อกำจัดเชื้อซึ่งความสามารถของปฏิกิริยาตอบสนองต่อสิ่งเร้าเหล่านี้น่าจะขึ้นอยู่กับพันธุกรรมด้วย โดยจากการสังเกตพบว่าหน่อของอ้อยป่า (*S. spontaneum*) ที่แสดงอาการใบขาว จะไม่พัฒนาเป็นลำแต่จะเหี่ยวตายเร็วมาก ซึ่งแสดงถึงภาวะ Hypersensitive response (HR) ที่พืชชนิดนี้สร้างขึ้นเพื่อจำกัดการกระจายตัวของเชื้อรวมทั้งกำจัดเชื้อทิ้งไปด้วยการทำให้เซลล์ตายอย่างรวดเร็วในขณะที่ลูกผสมระหว่างอ้อยปลูก *(S.officinarum)* และอ้อยป่าแสดงอาการใบขาวชัดเจน

การกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธีการต่างๆ ทั้งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การใช้สารต้านจุลชีพ พบว่ายังไม่ได้ผล ยังคงพบเชื้อได้ระดับมากน้อยแตกต่างกันไป อ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาวในระดับต่ำหรือมีปริมาณเชื้อน้อย จะไม่มีอาการใบขาว ในอ้อยเหล่านี้พบว่ามีสารและปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดจากความเครียดออกซิเดชั่นในระดับต่ำ ซึ่งอาจเกิดจากพืชไม่สามารถตรวจพบเชื้อปริมาณน้อยนี้ได้ แต่ในต้นที่มีปริมาณเชื้อสูงขึ้นแต่ยังไม่แสดงอาการ จะพบปฏิกิริยาดังกล่าวนี้สูงขึ้นแสดงถึงภาวะที่พืชตอบสนองเพื่อกำจัดเชื้อ รวมทั้งมีการสร้างสารประกอบอื่นเช่น ฟีนอลิก และแคลโลส เป็นต้น แต่หากมีภาวะเครียดจากสภาพแวดล้อมร่วมด้วย ยิ่งจะทำให้อ่อนแอลงการเกิดภาวะเครียดในพืช สามารถเกิดได้เช่นกันเมื่อพืชได้รับสารรังสี หากได้รับรังสีในระดับสูงจะทำให้พืชเกิดการกลายพันธุ์หรือตายหากได้รับในปริมาณสูงเกินไป ทั้งนี้เมื่อพืชได้รับรังสี จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และพืชจะต่อต้านด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ดังนั้นหากทำการฉายรังสีระดับต่ำให้อ้อยที่ติดเชื้อใบขาวแต่ยังไม่แสดงอาการ เพื่อกระตุ้นให้สร้างปฏิกิริยาออกซิเดชั่น อาจจะทำให้พืชสามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาได้โดยไม่ต้องใช้สารเคมี

การป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อยที่ดีที่สุดคือการใช้พันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรค ในการทำความสะอาดท่อนพันธุ์ รังษี และคณะ (2552) รายงานว่าการแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำร้อน 2 รอบ ที่อุณหภูมิ 52 และ 50 องศาเซลเซียสสามารถกำจัดเชื้อที่ติดมากับท่อนพันธุ์ได้ดี ส่วนการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถทำได้อย่างรวดเร็ว และเป็นที่ต้องการของเกษตรกร อย่างไรก็ตามการกำจัดเชื้อในท่อนพันธุ์ด้วยวิธีการต่างๆ จากรายงานที่ผ่านมายังไม่มีวิธีใดประสบความสำเร็จ การแก้ปัญหาโดยใช้ต้นพันธุ์ปลอดเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนยอดเจริญ (meristem) ของอ้อยซึ่งยังไม่มีการพัฒนาของท่อน้ำท่ออาหารและเชื่อว่าไม่มีเชื้อไฟโตพลาสมาน่าจะเป็นวิธีแก้ปัญหาได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ต่อมาพบว่าวิธีการนี้ทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคใบขาวได้อย่างรวดเร็วและเกิดพร้อมกันในแหล่งที่นำไปปลูก โดยพบต้นที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีการติดเชื้อภายในต้นในระดับที่สามารถแสดงอาการใบขาวได้ ทั้งพบในรุ่นอ้อยปลูกและในรุ่นอ้อยตอ สาเหตุหลักเกิดจากการตรวจคัดกรองโรคเพื่อการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อขาดประสิทธิภาพ ทำให้ไม่สามารถคัดกรองส่วนที่ยังติดโรคออกไปได้ โดยหลักแล้วประกอบไปด้วยวิธีการสุ่มตรวจตัวอย่างที่ต้องเป็นตัวแทนที่ดี คลอบคลุมผลมากที่สุด จำนวนครั้งในการขยายเพิ่มปริมาณเนื้อเยื่อที่ยังไม่พบการเพิ่มปริมาณของต้นอาการแฝงทีเล็ดลอดการสุ่มตรวจ รวมทั้งการเพิ่มปริมาณเชื้อภายในต้นที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาพที่อุดมสมบูรณ์ นอกจากนี้องค์ประกอบที่สำคัญอีอย่าง คือ ประสิทธิภาพของวิธีในการตรวจโรค ที่ต้องมีความไวสูง มีปัญหาด้านผลลบปลอมต่ำหรือไม่มีเลย แต่ในกรณีที่มีการตรวจคัดกรองอย่างมีประสิทธิภาพแล้ว การเพิ่มขยายเพิ่มปริมาณต้นหลายครั้งเกินไปในอาหารเพาะเลี้ยง อาจทำให้ปริมาณเชื้อในต้นเพิ่มมากขึ้นได้ ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการใดที่มีความไวในการตรวจเชื้อระดับเป็นศูนย์ได้ แต่มีวิธีการที่ตรวจเชื้อในระดับที่ต่ำมากได้ ปัจจุบันแม้เกษตรกรจะขาดความเชื่อมั่นในต้นอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเหตุผลที่พบต้นใบขาวในปริมาณสูงพร้อมกัน เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อยังเป็นวิธีที่จำเป็นในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรค ดังนั้นจำนวนตัวอย่างที่สุ่มตรวจโรคที่พอเพียงคลอบคลุมประชากร จำนวนความถี่ในการสุ่มตรวจที่สามารถคัดกรองโรคได้ทุกครั้งที่มีการเพิ่มขยาย จำนวนครั้งในการขยายเพิ่มปริมาณที่ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณต้นที่มีเชื้อแฝง และวิธีการตรวจที่มี

ประสิทธิภาพ จะทำให้การขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และได้ต้นที่ปลอดเชื้ออย่างแท้จริงสำหรับการขยายพันธุ์

การทดลองตรวจเชื้อโรคใบขาวในอ้อยที่สำรวจได้จากแปลงเกษตรกร พบว่าตัวอย่างอ้อยที่ติดเชื้อโรคใบลวก (Leaf scald) มักตรวจไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โรคใบลวกเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomanas albilineans* เชื้อนี้มีการสร้างสารพิษ albicidin ที่ทำลายระบบท่อน้ำท่ออาหารของพืช สารพิษดังกล่าวอาจมีผลต่อการดำรงชีวิตของไฟโตพลาสมาด้วย นอกจากนี้จากการสำรวจในกลุ่มตัวอย่างที่ตรวจพบว่ามีเชื้ออื่นร่วมด้วย ที่สังเกตจากผลการตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้น มักไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในปริมาณที่สูง แตกต่างจากต้นที่ตรวจไม่พบเชื้ออื่น จะเห็นการติดเชื้อเดี่ยวที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวมากหรือน้อยที่ชัดเจน ดังนั้นจึงอาจมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคอื่นในอ้อยบางชนิดอาจเป็นปฏิปักษ์กับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย ซึ่งอาจเป็นแนวทางในการพัฒนายาปฏิชีวนะหรือสารในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาได้และในการตรวจหาชนิดของเชื้อแบคทีเรียนั้น นอกจากใช้วิธีการตรวจลักษณะโคโลนีร่วมกับการตรวจผลทางชีวเคมีแล้ว การใช้เทคนิค HRM สามารถนำมาใช้ในการบ่งบอกชนิดของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดได้ โดยอาศัยหลักของความแตกต่างลำดับเบสของยีนเป้าหมาย ซึ่งวิธีการนี้มีความแม่นยำ รวดเร็ว ทำให้แยกความแตกต่างของเชื้อที่เกิดการติดเชื้อร่วมในตัวอย่างพืชได้

การตรวจโรคใบขาวอ้อยในปัจจุบันใช้วิธี PCR และเกือบทั้งหมดจะทำการตรวจยีน 16S-23S rDNAโดยยีนนี้มีชุดเครื่องหมายโมเลกุลที่มีการออกแบบไพร์เมอร์ให้จับกับบริเวณที่สามารถตรวจพบได้ในแบคทีเรียหลายชนิด และไฟโตพลาสมาได้หลายชนิด ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลชุดนี้สามารถระบุว่ามีการติดเชื้อ แต่ไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อได้ ส่วนการตรวจด้วย secAที่มีการออกแบบไพร์เมอร์ให้มีความจำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยนั้น (ศุจิรัตน์ และคณะ , 2556) ถูกนำมาใช้ตรวจควบคู่ไปกับการตรวจ 16S-23S rDNAแต่จากประสบการณ์การตรวจโรคใบขาวที่ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นนั้น บางครั้งพบว่า 2 วิธีนี้ ให้ผลตรวจขัดแย้งกัน ทำให้ตัดสินผลค่อนข้างยาก สาเหตุหลักอาจเกิดได้จากปริมาณดีเอ็นเอที่ตรวจมีปริมาณน้อยมาก และแนวทางแก้ไขคือ ต้องทำหลายซ้ำ ซึ่งทำให้สิ้นเปลืองมากขึ้น หากมีการพัฒนาวิธีกี่ตรวจยีนชนิดอื่นเพิ่ม จะทำให้ผลการตรวจมีความมั่นใจ ถูกต้อง น่าเชื่อถือ และแม่นยำมากขึ้น

ยีน Imp เป็นยีนที่มีความสำคัญในไฟโตพลาสมา จัดเป็นยีนอนุรักษ์ชนิดหนึ่ง (conserved gene) จึงสามารถตรวจพบในไฟโตพลาสมาหลายชนิด มีรายงานการตรวจพบยีนนี้ในเชื้อหลายไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคหลายชนิด เช่น aster yellows (AY) and rice yellow dwarf (RYD) groups รวมทั้งพบว่าลำดับเบสของยีนนี้ของเชื้อไฟโตพลาสมาต่างๆ มีความแปรปรวนสูงมาก (Kakizawa et al., 2009)ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจยีนนี้ในเชื้อโรคใบขาวอ้อย 3 ชนิด รวมทั้งตรวจหาความแตกต่างของเชื้อจากการตรวจลำดับเบส เพื่อพัฒนาวิธีการแยกความแตกต่างของเชื้อร่วมด้วย จึงน่าจะมีความเป็นไปได้สูง

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาจำเป็นต้องใช้การตรวจจากเนื้อเยื่อพืชต้องสงสัยเท่านั้น เนื่องจากไม่มีวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ วิธีที่นิยมใช้วิธี nested-PCR ที่สามารถตรวจเชื้อปริมาณต่ำมากได้ และจากประสบการณ์ยังพบว่ามีความไวสูงกว่า realtime PCR อีกด้วย แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ช้า เพราะต้องทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้ง และเกิดปัญหาปนเปื้อนดังกล่าวข้างต้น การใช้เทคนิค two steps-PCR เป็นการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ชุดต่อเนื่องกันในการทำพีซีอาร์เพียงครั้งเดียว จึงทำให้สามารถดำเนินการเสร็จภายในวันเดียวกัน ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ชุดแรก จะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ที่มีการออกแบบเป็นชนิด M13F tailed primer ก่อน ซึ่งสามารถจับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการ จากนั้นจึงเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตำแหน่งนั้นด้วย M13 primer วิธีการนี้นิยมใช้ในการตรวจลำดับเบส การศึกษา genotyping ด้วยวิธี fragment analysis ที่ต้องมีการติดสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ จะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายลงมาก ดังนั้นการประยุกต์วิธีการดังกล่าวนี้จะทำให้สามารถเพิ่มความไวให้กับวิธี direct PCR ได้ โดยไม่ต้องใช้เทคนิค nested-PCR สามารถใช้ตรวจยีนเป้าหมายทั้ง 3 ชนิดในที่นี้ ได้แก่ 16S-23S rDNA, secAและ impในปฏิกิริยาชุดเดียวกัน หรือเรียกว่า multiplex PCR ได้ หากผลผลิตพีซีอาร์มีขนาดที่ต่างกันดังนั้นการประยุกต์วิธีการดังกล่าวนี้จะทำให้การตรวจโรคใบขาวอ้อยมีความรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ประหยัด ลดค่าใช้จ่ายส่วนของวัสดุ อุปกรณ์ที่ต้องใช้ในการตรวจลงไปได้อีกมาก

เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยในไทยตามรายงานพบว่ามี 3 ชนิด คือ เชื้อโรคใบขาวอ้อย (sugarcane white leaf: SCWL) เชื้อโรคใบขาวร่วมกับอาการกอฝอย (sugarcane grassy shoot: SCGS) และ เชื้อโรคกอตะไคร้ (sugarcane green grassy shoot : SCGGS) โดยเชื้อสองชนิดแรกมีอาการที่เด่นชัดคืออาการใบขาว โดยเชื้อ SCWL จะไม่แสดงอาการแตกกอฝอย ส่วนเชื้อ SCGS จะแสดงอาการแตกกอฝอยขาวร่วมด้วย ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในอ้อยทุกอายุ ทั้งที่ยอดและหน่อ ส่วนอ้อยที่ติดเชื้อSCGGS นั้น แสดงอาการแตกกอฝอยและใบยังคงมีสีเขียวก่อนแห้งตายไป อาการของโรคโดยเฉพาะอาการใบขาวจะเห็นได้เด่นชัดในแหล่งปลูกที่เป็นดินทรายมากกว่าแหล่งปลูกที่เป็นดินเหนียว อาการเส้นกลางใบเหลืองในอ้อย มักพบในแหล่งปลูกภาค

กลางและภาคตะวันออก โดยมักถูกเข้าใจว่าเป็นอาการขาดธาตุอาหารหรือจากสภาพแล้งเนื่องจากมักพบอาการใบแห้งร่วมด้วย แต่จากการสังเกตจะพบว่าอาการเส้นกลางใบเหลืองนี้บางครั้งไม่พบในกอที่ปลูกข้างๆ กันและในบางกอที่มีอาการนี้ จะแสดงหน่อขาวชีด ซึ่งระดับสีแตกต่างจากหน่อขาวที่พบในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ในขณะอาการเส้นกลางใบเหลืองสามารถสังเกตพบได้มมากเช่นเดียวกันในแปลงเกษตรกรที่อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี การศึกษาเบื้องต้นโดยวิเคราะห์ชนิดของเชื้อโตพลาสมาในตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกของเกษตรกรในเขตจังหวัดสระแก้วที่มีอาการเส้นกลางใบเหลืองและมีการแตกหน่อฝอยขาว และต้นที่มีอาการเส้นกลางใบเหลืองจากนครสวรรค์ พบว่ามีลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีน 16S-23S rDNA เหมือนกับ SCGS ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนต้นที่มีอาการเส้นกลางใบเหลืองที่พบในอำเภอกุมภวาปียังไม่มีการศึกษา แต่จากการศึกษาของ Soufi et al. (2013) ที่เก็บตัวอย่างจากตำบลท่าพระ จังหวัดขอนแก่น จังหวัดสุพรรณบุรี และจังหวัดชลบุรี พบว่ามีลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนนี้เหมือนกับ SCWL รวมทั้งยังพบว่าอาการเส้นกลางใบเหลืองนี้ไม่ได้เกิดจากเชื้อ Westren-X disease phytoplasma ที่เป็นสาเหตุของโรคใบเหลืองในอ้อยด้วย จากการสำรวจเบื้องต้นพบอ้อยที่มีอาการเส้นกลางใบเหลืองในแหล่งปลูกภาคกลางและภาคตะวันออกมากกว่าในแหล่งภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งทั้งสองแหล่งมีลักษณะดินที่แตกต่างกัน ในแหล่งปลูกภาคกลางหากไม่ใช่แหล่งดินทรายมักไม่ค่อยพบอาการใบขาว ส่วนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เป็นแหล่งดินทราย พบอาการใบขาวได้มากและรุนแรง ดังนั้นจึงอาจมีความเป็นไปได้ว่าอาการเส้นกลางใบเหลืองอาจเป็นอาการหนึ่งของอาการโรคใบขาว ซึ่งหากนำท่อนพันธุ์ที่มีมาจากลำที่มีอาการเส้นกลางใบเหลืองมาปลูกในแหล่งดินทราย อาจจะแสดงอาการใบขาวได้ ดังนั้นการศึกษาถึงเชื้อสาเหตุ ระดับปริมาณเชื้อนั้นในต้นที่มีอาการเส้นกลางใบเหลือง จะทำให้ทราบได้ว่าอาการเส้นกลางใบเหลืองดังกล่าวมานี้ เป็นหนึ่งในอาการของโรคใบขาวอ้อยหรือไม่ เพื่อประโยชน์ในการจัดการและควบคุมการแพร่กระจายของโรคใบขาวให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจัดทำคำแนะนำการใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคใบขาวเฉพาะพื้นที่
2. เพื่อหาวิธีการกำจัดเชื้อโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อย

ขอบเขตการศึกษา

การศึกษาประกอบด้วย 5 กิจกรรม คือ 1) ศึกษาปริมาณธาตุอาหารหลักและรองในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในระดับต่างๆ 2) ศึกษาการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสีเพื่อลดการแสดงอาการโรคใบขาวของท่อนพันธุ์ 3) ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาว ดำเนินการในเขตปลูกอ้อยอาศัยน้ำฝน 9 จังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลาง คัดเลือกพื้นที่ปลูกอ้อยในสภาพดินทราย 4) การจัดการโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยการระบาดโรคใบขาวอ้อย ประกอบด้วย การจัดทำแผนที่พื้นที่เสี่ยงภัยจากการระบาดของโรคใบขาวอ้อย และการทดสอบเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยต่อการเป็นโรคใบขาว 5) การกำจัดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อย ประกอบด้วย การศึกษาผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อย ผลของการติดเชื้อโรคอื่นซ้ำซ้อนต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยในสภาพไร่ ผลของการฉายรังสีแกมมาต่อการแสดงอาการใบขาวและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในอ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาว การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่และวิธีการตรวจเชื้อโรคใบขาวด้วยเทคนิค M13-tagged two steps- PCR ที่แม่นยำและมีความไวสูง การศึกษาการถ่ายทอดปริมาณเชื้อโรคใบขาวในอ้อยสู่อ้อยตอและการแสดงอาการของโรคในสภาพไร่ การใช้เทคนิค HRM ในการตรวจชนิดเชื้อแบคทีเรียที่เกิดร่วมกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย การศึกษาอุบัติการณ์การตรวจพบเชื้อโรคใบขาวอ้อยที่มีอาการร่วมกับเส้นกลางใบเหลืองและการจำแนกชนิดของเชื้อด้วยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ และการศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการขยายพันธุ์หลายรุ่นในอาหารสังเคราะห์

นิยามศัพท์

อ้อย หมายถึง อ้อยที่เกษตรกรเก็บเกี่ยวส่งเข้าโรงงานน้ำตาลในฤดูหีบอ้อย ระหว่างเดือนธันวาคม ถึงเดือนเมษายนของปีถัดไป

ธาตุอาหารพืช หมายถึง แร่ธาตุที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตของพืชถ้าพืชได้รับธาตุอาหารไม่เพียงพอจะทำให้พืชไม่เจริญเติบโต แคระแกร็น ให้ผลผลิตไม่เต็มที่

กรมวิชาการเกษตร

โรคใบขาวอ้อย หมายถึง โรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมามีอาการใบอ้อยเรียวแคบเล็ก สีเขียวอ่อน หรือขาว แตกกอ เป็นฝอยแคระแกร็น มีการแตกหน่อสีขาว ที่โคนกอหรือตาข้าง

เชื้อไฟโตพลาสมา หมายถึง จุลินทรีย์เซลล์เดียวคล้ายแบคทีเรียแต่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) มีขนาดประมาณ 80 ถึง 800 นาโนเมตร เป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบขาว มีแมลงที่เป็นพาหะของโรค ได้แก่ เพลี้ยจักจั่นลายจุดสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* และเพลี้ยจักจั่นหลังขาว *Yamatotettix flavovittatus*

โรคใบลวก หมายถึง โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas albilineans* อาการของโรคใบจะมีลักษณะเป็นแผลมีแถบสีขาวเหลือง เมื่อแผลขยายใหญ่ขึ้นจะมีลักษณะเป็นสีน้ำตาลไหม้ คล้ายใบลวก เมื่ออาการรุนแรงขึ้นจะมีการเน่าจากยอดลงมาและทำให้ต้นอ้อยตาย

การติดโรคซ้ำซ้อน หมายถึง การติดเชื้อก่อโรคภายในพืชมากกว่า 1 ชนิด

การฉายรังสีแบบเฉียบพลัน หมายถึง วิธีการที่ให้พืชได้รับรังสีในปริมาณสูง ในระยะ เวลาสั้น เพื่อฆ่าเชื้อไฟโตพลาสมาในชิ้นส่วนของอ้อย

ความเครียดออกซิเดชั่น หมายถึง การที่อนุมูลอิสระเข้าไปทำลายระบบต่างๆ ภายในเซลล์ของสิ่งที่มีชีวิต เช่น รวมตัวกับสารพันธุกรรม คือ ดีเอ็นเอ ทำให้โมเลกุลของ ดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป หรือการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิดที่เป็นองค์ประกอบในเมมเบรนของเซลล์ได้เป็นสารเพอร์ออกไซด์ ทำให้เซลล์เมมเบรนเสียสภาพ และไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ

การติดเชื้อโรคใบขาวรหัสสีฟ้า หมายถึง การใช้รหัสสีแทนปริมาณการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย ระดับสีฟ้ามีปริมาณเชื้อน้อยมาก (0 - 0.5 copy/ul in 25 ng plant DNA) สามารถนำไปขยายพันธุ์ต่อได้จะยังไม่เกิดอาการใบขาวในรุ่นต่อมา

การติดเชื้อโรคใบขาวรหัสสีเขียว หมายถึง การใช้รหัสสีแทนปริมาณการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย ระดับสีเขียวตรวจพบเชื้อในระดับต่ำ (0.5 - 1 copy/ul in 25 ng plant DNA) สามารถนำไปขยายพันธุ์ต่อได้น่าจะยังไม่เกิดอาการใบขาวในรุ่นนี้ และในรุ่นตอต่อมา แต่อาจพัฒนามีเชื้อมากขึ้นได้ หากผ่านสภาวะเครียด

การติดเชื้อโรคใบขาวรหัสสีเหลือง หมายถึง การใช้รหัสสีแทนปริมาณการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย ระดับสีเหลืองมีปริมาณเชื้อน้อย (1-10 copy/ul in 25 ng plant DNA) ควรเฝ้าระวังอาจเกิดโรคใบขาวได้

การติดเชื้อโรคใบขาวรหัสสีส้ม หมายถึง การใช้รหัสสีแทนปริมาณการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย ระดับสีส้มมีเชื้อระดับปานกลาง (10-100 copy/ul in 25 ng plant DNA) อาจเกิดใบขาวได้ภายในรุ่นนี้ และอาจเกิดใบขาวในอ้อยตอหากผ่านสภาวะเครียด

การติดเชื้อโรคใบขาวรหัสสีแดง หมายถึง การใช้รหัสสีแทนปริมาณการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย ระดับสีแดงมีปริมาณเชื้อสูง (> 100 copy/ul in 25 ng plant DNA)

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 2 วิธีการดำเนินงาน

1.วิธีการดำเนินการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 ศึกษาปริมาณธาตุอาหารรองในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในระดับต่างๆ

การทดลองที่ 1.1 ศึกษาปริมาณธาตุอาหารรองในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในระดับต่างๆ (ปี 2559-2561)

ศึกษาปริมาณธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองในท่อนพันธุ์อ้อยที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับต่างๆเพื่อนำผลไปจัดการธาตุอาหารให้อ้อยมีปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสม ซึ่งทำให้อ้อยมีความแข็งแรงมากขึ้นและการแสดงอาการใบขาวลดลง

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาระดับต่างๆ
2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองในท่อนพันธุ์อ้อย
3. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างอ้อย
4. วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับเก็บ และ บันทึกข้อมูล

แบบและวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 ซ้ำ

กรรมวิธี: ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาระดับต่างๆ ตามวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาของ ศุจิรัตน์ (2558)

1) ท่อนพันธุ์อ้อยที่ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา (รหัสสีฟ้า)
2) ท่อนพันธุ์อ้อยที่ตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับต่ำ (รหัสสีเขียว)
3) ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาต่ำ (รหัสสีส้ม)
4) ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสูง (รหัสสีแดง)

วิธีปฏิบัติการทดลองปี 2559-2560

เตรียมท่อนพันธุ์อ้อยอายุ 10 เดือน จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ท่อนพันธุ์อ้อยปกติจากแปลงที่ไม่มีโรคใบขาว และท่อนพันธุ์จากแปลงที่เป็นโรคใบขาว ไปวิเคราะห์ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา จากผลวิเคราะห์ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาจำแนกท่อนพันธุ์อ้อยออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มที่ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา (รหัสสีฟ้า) 2) กลุ่มที่ตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับต่ำ (รหัสสีเขียว) 3) กลุ่มที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาต่ำ (รหัสสีส้ม) และ 4) กลุ่มที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสูง (รหัสสีแดง)แบ่งท่อนพันธุ์แต่ละกลุ่มออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในท่อนพันธุ์ ส่วนที่สองนำไปเพาะกรรมวิธีละ 4 ซ้ำเพื่อดูการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางท่อนพันธุ์

การบันทึกข้อมูล

1. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในท่อนพันธุ์อ้อย
2. ปริมาณธาตุอาหารในท่อนพันธุ์อ้อย N P K Ca Mg Zn Fe
3. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นกล้าอ้อยที่อายุ 2 สัปดาห์

วิธีปฏิบัติการทดลอง ปี 2561

ติดตามกออ้อยที่ตัดลำไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารรอง ซึ่งจะมีกอที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา 4 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มที่ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา (รหัสสีฟ้า) 2) กลุ่มที่ตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในระดับต่ำ (รหัสสีเขียว) 3) กลุ่มที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาต่ำ (รหัสสีส้ม) และ 4) กลุ่มที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสูง (รหัสสีแดง) ทำการทดลองกลุ่มละ 5 กอ ใส่ปุ๋ยให้ทั้ง 20 กอตามค่าวิเคราะห์ดินโดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ทำการเก็บตัวอย่างใบ Top visible dewlap ส่งวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาก่อนและหลังใส่ปุ๋ย 1 เดือน

การบันทึกข้อมูล

1. คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน (pH %OM Avail.P Exch.K Exch.Ca Exch.Mg Avail.Zn และ Avail.Fe) เก็บตัวอย่างดินแบบ Composite sample ส่งวิเคราะห์ที่ความลึก 0-30 เซนติเมตร
2. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในใบอ้อยก่อนและหลังใส่ปุ๋ย 1 เดือน
3. ปริมาณธาตุอาหารในใบอ้อย N P K Ca Mg Zn Fe ก่อนและหลังใส่ปุ๋ย 1 เดือน

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2558 –กันยายน 2561

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสีเพื่อลดการแสดงอาการโรคใบขาวของท่อนพันธุ์

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเกลือสังกะสีและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อย (ปี2559-2562)

ขั้นตอนที่ 1ศึกษาความเข้มข้นของสารละลายเกลือสังกะสีที่เหมาะสมในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อย

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ท่อนพันธุ์อ้อยอายุประมาณ 10 เดือน จากอ้อยปกติกับอ้อยจากกอเป็นโรคใบขาว

แบบและวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Split plot จำนวน 3 ซ้ำ

กรรมวิธี มี 2 ปัจจัย ปัจจัยหลัก คือ ความเข้มข้นของสารละลาย $ZnSO_4$ 6 ระดับ คือ 0% 1% 2% 3% 4% และ 5 % โดยแช่สารละลาย $ZnSO_4$ เป็นเวลา 20 นาที ปัจจัยรอง คือ อายุของอ้อยชำข้อ 1 3 5 7 และ 9 สัปดาห์โดยหนึ่งหน่วยทดลองประกอบด้วยท่อนพันธุ์ 4 ท่อน

วิธีปฏิบัติการทดลองปี 2559

นำลำอ้อยปกติ และลำจากกอเป็นโรคใบขาว มาแช่ $ZnSO_4$ความเข้มข้นตามวิธีทดลองในระยะเวลาการ15 นาที หลังแช่เก็บตัวอย่างท่อนพันธุ์อ้อยไปตรวจวัดปริมาณ Zn เพื่อดูปริมาณการซึมของ Zn ในท่อนพันธุ์อ้อย แล้วนำท่อนพันธุ์อ้อยที่แช่แล้วไปเพาะในวัสดุเพาะ เมื่ออ้อยงอกที่อายุ 1 3 5 7 9 สัปดาห์ นำไปตรวจปริมาณเชื้อโรคใบขาว

การบันทึกข้อมูล

1) ปริมาณ Zn ในท่อนพันธุ์ ก่อนแช่ $ZnSO_4$ และ หลังแช่ $ZnSO_4$
2) ปริมาณ Zn ในอ้อยที่อายุ 1 3 5 7 9 สัปดาห์
3) ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ก่อนและหลังแช่ $ZnSO_4$
4) ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่อายุ 1 3 5 7 9 สัปดาห์
5) เปอร์เซ็นต์การงอกของอ้อย

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสี

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ท่อนพันธุ์อ้อยอายุประมาณ 10 เดือน จากอ้อยปกติกับอ้อยจากกอเป็นโรคใบขาว

แบบและวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Split plot จำนวน 3 ซ้ำ

กรรมวิธี มี 2 ปัจจัย ปัจจัยหลัก คือ ระยะเวลาการแช่สารละลาย $ZnSO_4$ 1 % จำนวน 7 ช่วงเวลา คือ 01020 30 40 50 และ 60 นาทีปัจจัยรอง คือ อายุของอ้อยชำข้อ 1 3 5 7 และ 9 สัปดาห์โดยหนึ่งหน่วยทดลองประกอบด้วยท่อนพันธุ์ 4 ท่อน

วิธีปฏิบัติการทดลองปี 2560

นำลำอ้อยปกติ และลำจากกอเป็นโรคใบขาว มาแช่ $ZnSO_4$ความเข้มข้น 1% ระยะเวลาการแช่ตามวิธีทดลอง หลังแช่แล้วนำท่อนพันธุ์อ้อยไปตรวจวัดปริมาณ Zn เพื่อดูปริมาณการซึมของ Zn ในท่อนพันธุ์อ้อย นำท่อนพันธุ์อ้อยที่แช่แล้วไปเพาะในวัสดุเพาะ เมื่ออ้อยงอกที่อายุ 1 3 5 7 9 สัปดาห์ นำไปตรวจปริมาณเชื้อโรคใบขาว

การบันทึกข้อมูล

1. ปริมาณ Zn ในท่อนพันธุ์ ก่อนแช่ $ZnSO_4$ และ หลังแช่ $ZnSO_4$
2. ปริมาณ Zn ในอ้อยที่อายุ 1 3 5 7 9 สัปดาห์
3. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ก่อนและหลังแช่ $ZnSO_4$
4. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่อายุ 1 3 5 7 9 สัปดาห์
5. เปอร์เซ็นต์การงอกของอ้อย

ปี 2561นำผลการทดลองการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสีจากขั้นตอนที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมและจากขั้นตอนที่ 2 ศึกษาระยะเวลาการแช่ที่เหมาะสม มาทดลองเพื่อยืนยันผลในการลดการแสดงอาการของโรคใบขาวในระดับแปลงทดลอง

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ท่อนพันธุ์อ้อยอายุประมาณ 10 เดือน จากแปลงที่เป็นโรคใบขาว

แบบและวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ RCBD จำนวน 5 ซ้ำ

กรรมวิธี คือการแช่ท่อนพันธุ์อ้อย 4 วิธี

1. ไม่แช่ท่อนพันธุ์

กรมวิชาการเกษตร

2. แช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยน้ำสะอาดระยะเวลา 15 นาที
3. แช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลาย $ZnSO_4$ 1 % ระยะเวลา 15 นาที
4. แช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลาย $ZnSO_4$ 2 % ระยะเวลา 15 นาที

วิธีปฏิบัติการทดลองปี 2561-2562

ก่อนปลูกอ้อย 1 เดือนเก็บตัวอย่างดินในระดับความลึก 30 เซนติเมตรส่งวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร ได้แก่ pH %OM Avail.P Exch.K Exch.Ca Exch.Mg Avail.Zn และ Avail.Fe ปลูกอ้อยเดือนพฤศจิกายน 2560 โดยใช้ระยะระหว่างแถว 1.5 เมตร ระยะหลุม 0.5 เมตร จำนวน 6 แถวต่อแปลงย่อย แถวยาว 6 เมตร ขนาดแปลงย่อย 54 ตารางเมตร นำลำอ้อยจากแปลงที่เป็นโรคใบขาว มาแบ่งเป็น 4 ส่วน เก็บใบ Top visible dewlapส่งวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาและวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารได้แก่ %N %P %K %Ca %Mg %Zn และ %Feตัดอ้อยเป็นท่อนๆละ 2 ตา ท่อนพันธุ์อ้อยส่วนที่ 1 ไม่ต้องแช่ท่อนพันธุ์ ส่วนที่ 2 แช่ในน้ำสะอาด 15 นาที ส่วนที่ 3 แช่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 1% 15 นาที หลังแช่ $ZnSO_4$ แล้วปล่อยให้ท่อนพันธุ์แห้ง นำไปปลูกตามกรรมวิธีทดลองโดยช่วงปลูกไม่ต้องใส่ปุ๋ยรองพื้น หลังจากอ้อยงอกได้ 4 สัปดาห์เก็บใบ Top visible dewlapส่งวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาและวิเคราะห์ปริมาณ Zn แล้วจึงใส่ปุ๋ยรองพื้นโดยธาตุอาหารหลักใส่อัตราครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน ธาตุรองใส่ครั้งเดียวในช่วงรองพื้น ถ้าค่าวิเคราะห์ธาตุแคลเซียมไม่เหมาะสมใส่ยิปซั่มในช่วงใส่ปุ๋ยรองพื้น และธาตุอาหารหลักใส่อีกครั้งตอนใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 โดยใส่เมื่ออ้อยอายุ 5 เดือนให้ครบตามค่าวิเคราะห์ดิน

การบันทึกข้อมูล

1. คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน (pH %OM Avail.P Exch.K Exch.Ca Exch.Mg Avail.Zn และ Avail.Fe) เก็บตัวอย่างดินแบบ Composite sample ส่งวิเคราะห์ที่ความลึก 0-30 เซนติเมตร 1 ตัวอย่าง
2. วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร และปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยก่อนปลูก โดยสุ่มตัวอย่างใบอ้อยที่ Top visible dewlap จากทุกลำที่จะใช้ปลูกในแต่ละกรรมวิธีนำมารวมกันแบบ Composited sample นำใบอ้อยมาแบ่งครึ่งตามความยาวของใบใน 1 กรรมวิธี จะได้ใบอ้อย 2 ตัวอย่าง ส่งวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหาร 1 ตัวอย่าง ที่ห้องปฏิบัติการ ศวร.ขอนแก่น ค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ ได้แก่ %N %P %K %Ca %Mg Zn(mg/kg) และ Fe(mg/kg) และส่งวิเคราะห์ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยก่อนปลูก 1 ตัวอย่าง ที่ห้องปฏิบัติการ ศวร. ขอนแก่น
3. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาหลังอ้อยงอก 4 สัปดาห์(ก่อนใส่ปุ๋ยรองพื้น) 8 สัปดาห์ (หลังใส่ปุ๋ยรองพื้น) ก่อนใส่ปุ๋ยแต่งหน้า หลังใส่ปุ๋ยแต่งหน้า และก่อนเก็บเกี่ยวไปทำพันธุ์ (อายุ 10 เดือน)
4. ปริมาณ Zn ในอ้อยก่อนปลูก หลังอ้อยงอก 4 สัปดาห์ (ก่อนใส่ปุ๋ยรองพื้น) 8 สัปดาห์ (หลังใส่ปุ๋ยรองพื้น) ก่อนใส่ปุ๋ยแต่งหน้า หลังใส่ปุ๋ยแต่งหน้า และก่อนเก็บเกี่ยวไปทำพันธุ์ (อายุ 10 เดือน)
5. เปอร์เซ็นต์การงอกของอ้อยปลูก ที่อายุ 4 8 และ 12 สัปดาห์หลังงอกเก็บข้อมูลทุก plot
6. การเจริญเติบโต จำนวนหน่อต่อกอ ที่อายุ 4 เดือน จำนวนลำต่อกอที่อายุ 6 เดือนหลังงอกเก็บข้อมูลทุก plot
7. เปอร์เซ็นต์กอเป็นโรคใบขาว ที่อายุ 4 8 เดือนหลังงอก และก่อนเก็บเกี่ยว แต่ละ plot นับจำนวนกอทั้งหมดและจำนวนกอที่เป็นโรคใบขาว เพื่อหาเปอร์เซ็นต์กอเป็นโรคใบขาว
8. ความสูงอ้อยช่วงเก็บเกี่ยว Plot ละ 10 กอ
9. ผลผลิตเมื่อเก็บเกี่ยว (อายุ 10 เดือน) นับจำนวนกอเก็บเกี่ยว จำนวนลำเก็บเกี่ยว ชั่งน้ำหนักลำ สุ่ม 10 ลำ วัดความยาว เส้นผ่านศูนย์กลางที่กลางลำ จำนวนปล้อง เก็บข้อมูลทุก plot
10. ค่าความหวานเมื่อเก็บเกี่ยว สุ่มอ้อย plot ละ 6 ลำ วัดค่าบริกซ์ โพล ไฟเบอร์ คำนวณค่าซีซีเอส เก็บข้อมูลทุก plot

การถ่ายทอดเชื้อผ่านทางท่อนพันธุ์ในแต่ละplot สุ่มอ้อยแถวที่ 2 และ 5 ไว้แถวละ 5 กอ ก่อนเก็บเกี่ยว 2 สัปดาห์ฉีดพ่นสารละลาย $ZnSO_4$1% บนอ้อยแถวที่ 2 จำนวน 5 กอที่สุ่มเลือกไว้ สำหรับแถวที่ 5 พ่นน้ำสะอาด เก็บเกี่ยวอ้อยแถวที่ 2 และ 5 ที่ฉีดพ่นสารละลาย $ZnSO_4$1% และน้ำสะอาดที่อายุ 10 เดือน ตัดเป็นข้อแล้วนำไปเพาะแถวละ 100 ข้อตา บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์ความงอก เปอร์เซ็นต์การเป็นโรคใบขาว ปริมาณ Zn และปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาหลังอ้อยงอก 4 สัปดาห์

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2558 - กันยายน 2562

กรมวิชาการเกษตร

กิจกรรมที่ 3 การจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาว (ปี2559-2564)

ประกอบด้วย 9 การทดลอง ดำเนินการในเขตปลูกอ้อยอาศัยน้ำฝน โดยคัดเลือกพื้นที่ปลูกอ้อยในสภาพดินทราย ซึ่งการปลูกอ้อยในสภาพดินทรายเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคใบขาวปัจจัยหนึ่ง ดำเนินการในไร่เกษตรกรจังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ อุดรธานี สกลนคร ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี อุทัยธานี และ นครสวรรค์ จังหวัดละ 2 ราย

การทดลองที่ 3.1 ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวจังหวัดขอนแก่น
การทดลองที่ 3.2 ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวจังหวัดกาฬสินธุ์
การทดลองที่ 3.3 ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวจังหวัดอุดรธานี
การทดลองที่ 3.4ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวจังหวัดสกลนคร
การทดลองที่ 3.5 ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวจังหวัดราชบุรี
การทดลองที่ 3.6 ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวจังหวัดกาญจนบุรี
การทดลองที่ 3.7 ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวจังหวัดสุพรรณบุรี
การทดลองที่ 3.8 ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวจังหวัดอุทัยธานี
การทดลองที่ 3.9 ศึกษาการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวจังหวัดนครสวรรค์

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1) อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 จากแปลงที่ไม่พบโรคใบขาว
2) ปุ๋ยเคมี สูตร 15-15-15 46-0-0 18-46-0 0-0-60 และ $ZnSO_4$
3) ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก และกากตะกอนหม้อกรองอ้อย
4) ปูนขาว ยิบซั่ม โดโลไมท์
5) สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช
6) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีของดิน
7) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างอ้อย
8) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ค่าความหวาน
9) วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับเก็บ และ บันทึกข้อมูล

แบบและวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ RCB 4 ซ้ำ

กรรมวิธี : การจัดการธาตุอาหาร 5 วิธี

1) ใส่ปุ๋ยตามวิธีเกษตรกร
2) ใส่ปุ๋ย N-P-K ตามค่าวิเคราะห์ดิน
3) ใส่ปุ๋ย N-P-K + Mg ตามค่าวิเคราะห์ดิน
4) ใส่ปุ๋ย N-P-K + Zn ตามค่าวิเคราะห์ดิน
5) ใส่ปุ๋ย N-P-K + Mg+Znตามค่าวิเคราะห์ดิน

วิธีปฏิบัติการทดลองปี 2559

เก็บตัวอย่างดินส่งวิเคราะห์ก่อนการเตรียมดิน ไถเตรียมแปลงปลูกอ้อยประมาณเดือนตุลาคม ปลูกอ้อยโดยเปิดร่องวางลำคู่ สับลำให้ขาดจากกัน 3-4 ท่อน โรยปุ๋ยรองพื้นอัตราครึ่งหนึ่งของผลวิเคราะห์ดิน กลบดิน พ่นสารเคมีคุมวัชพืช และกำจัดวัชพืชตามความจำเป็น ใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 เมื่ออ้อยอายุ 5 เดือนในอัตราอีกครึ่งหนึ่งของผลวิเคราะห์ดิน เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 12 เดือน ในพื้นที่ 4 แถวกลางยาว 6 เมตร ตัดลำต้นชิดดิน ลอกกาบ ตัดยอด บันทึกผลผลิต

การบันทึกข้อมูล

1. คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน pH OM (%) Avail. P Exch.K Ca Mg Zn Fe
2. วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในอ้อย N P K Ca Mg Zn Fe เมื่ออายุ 6 เดือน
3. เปอร์เซ็นต์การงอกของอ้อยปลูก ที่อายุ 4 6และ 12 สัปดาห์หลังงอก
4. การเจริญเติบโต จำนวนหน่อต่อกอ ที่อายุ 4 เดือนหลังงอก จำนวนลำต่อกอ ที่อายุ 6 เดือนหลังงอก
5. จำนวนกอที่แสดงอาการใบขาวต่อไร่ ที่อายุ 4 8 เดือนหลังงอก และ ก่อนเก็บเกี่ยว แต่ละกรรมวิธีนับจำนวนกอที่เป็นโรคใบขาวทั้งหมดในพื้นที่ทดลอง
6. สุ่มตัวอย่างอ้อยส่งตรวจเชื้อโรคใบขาวก่อนและหลังการใส่ปุ๋ย 1 เดือน

กรมวิชาการเกษตร

7. ความสูงอ้อยช่วงเก็บเกี่ยว ซ้ำละ 10 กอ
8. ผลผลิตเมื่อเก็บเกี่ยว นับจำนวนกอเก็บเกี่ยว จำนวนลำเก็บเกี่ยว ชั่งน้ำหนักลำสุ่ม 10 ลำ วัดความยาว เส้นผ่านศูนย์กลางที่กลางลำ จำนวนปล้อง
9. ค่าความหวานเมื่อเก็บเกี่ยว สุ่มอ้อยซ้ำละ 6 ลำ วัดค่าบริกซ์ โพล ไฟเบอร์ คำนวณค่า ซีซีเอส

วิธีปฏิบัติการทดลองปี 2560-2564

ปี 2560-2564 เป็นการเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกและดำเนินงานกับอ้อยตอ ก่อนเก็บเกี่ยวอ้อยทำการวัดความสูง บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์กอที่เป็นโรคใบขาว เก็บเกี่ยวอ้อยที่อายุ 10-12 เดือน บันทึกข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต วัดค่าซีซีเอส การดูแลรักษาอ้อยตอ หลังเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกแล้วรีบแต่งตอ หากดินมีความชื้นเพียงพอ ใส่ปุ๋ยรองพื้นโดย ธาตุอาหารหลักใส่อัตราครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดินตามกรรมวิธี ส่วนธาตุรองใส่ครั้งเดียวในช่วงรองพื้น แปลงที่มีค่าวิเคราะห์ธาตุแคลเซียมไม่เหมาะสมให้ใส่ยิปซั่มทุกPlot ในช่วงใส่ปุ๋ยรองพื้นด้วย และธาตุอาหารหลักใส่อีกครั้งตอนใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 โดยใส่เมื่ออ้อยอายุ 5 เดือนให้ครบตามกรรมวิธีทดลอง โดยใช้ค่าวิเคราะห์ดินเดิมของอ้อยปลูก ไม่ต้องเก็บดินส่งวิเคราะห์ใหม่

การจัดการธาตุอาหารอ้อยตอได้นำหลักการจัดการสมดุลธาตุอาหารเพื่อลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคใบขาวมาปรับใช้ดังนี้ การปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินให้เหมาะสม ถ้าดินมีพีเอช 4.5-5.0 ปรับปรุงโดยการหว่านปูนขาวอัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ หรือใส่ฟิลเตอร์เค้ก 1 ตันต่อไร่ ดินมีพีเอชน้อยกว่า 4.5 ปรับปรุงโดยการหว่านปูนขาวอัตรา 200 กิโลกรัมต่อไร่ หรือใส่ฟิลเตอร์เค้ก 2 ตันต่อไร่ การจัดการธาตุอาหารถ้าดินมีอินทรียวัตถุต่ำมาก (%OM < 0.5%) จะใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 0.5 เท่าของคำแนะนำ ในที่นี้คำแนะนำการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินของอ้อยปกติถ้า%OM < 0.5% แนะนำให้ใส่ไนโตรเจน 18 กิโลกรัมต่อไร่ ในอ้อยตอจะใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มเป็น 27 กิโลกรัมต่อไร่ นอกจากนี้ยังได้นำสัดส่วนของธาตุโพแทสเซียมกับธาตุฟอสฟอรัสมาพิจารณาร่วมด้วย ถ้าสัดส่วนของK/P มากกว่า 4.55 ควรเพิ่มปุ๋ยฟอสฟอรัสให้มากกว่าเดิม 0.3 เท่า เนื่องจากดินมีค่า K/P เกินปกติ (กอบเกียรติ, 2553) การจัดสมดุลของธาตุ K/P จำเป็นต้องใช้ค่า BD มาคำนวณหาน้ำหนักดินในพื้นที่ 1 ไร่ ดังนั้นหลังจากเก็บเกี่ยวควรเก็บดินเพื่อนำไปหาค่า BD หรือวัดพิกัดแปลงเพื่อนำไปหาค่า BD จากข้อมูลดิน Soil.sol เมื่อได้ข้อมูลน้ำหนักดินแล้วจะสามารถจัดการธาตุอาหารอ้อยตอในแต่ละการทดลองได้

การใส่ธาตุรองในอ้อยตอ

ธาตุสังกะสีใส่ในรูป $ZnSO_4$ตอนซื้อ $ZnSO_4$ให้ดูสูตรเคมี ถ้าเป็น $ZnSO_4.H_2O$ ตัวนี้มี Zn 33% ใส่ $ZnSO_4.H_2O$= (1.6*100)/33 = 4.8 กก./ไร่ ถ้าเป็น$ZnSO_4.7H_2O$ ตัวนี้มี Zn 21% ใส่ $ZnSO_4.7H_2O$= (1.6*100)/21 = 7.6 กก./ไร่

ธาตุแคลเซียม การใส่ Ca ถ้าใส่ในรูปปูนขาว ซึ่งมีสูตรเคมี คือ $Ca(OH)_2$จะมี Ca 46% ปูนขาวควรใส่ช่วงเตรียมดิน ถ้าจะใส่ตอนอ้อยโตแล้วควรใส่ยิบซั่ม เนื่องจากยิบซั่ม ปลดปล่อย Ca ได้เร็วกว่าปูนขาว แต่ในการทดลองนี้เพื่อความสะดวกใส่ยิบซั่มให้อ้อยตอในช่วงใส่ปุ๋ยครั้งที่ 1 เลยก็ได้ ยิปซั่ม สูตรเคมี คือ $CaSO_4.2H_2O$ มี Ca 23%

ธาตุแมกนีเซียม ใส่ในรูปโดโลไมท์ สูตรเคมี คือ $CaCO_3$+$MgCO_3$มี Ca22%และมี Mg 13.5%ใส่โดโลไมท์ จะได้ทั้ง Ca และ Mg

การดูแลรักษาอื่นๆ พ่นสารเคมีคุมวัชพืช และกำจัดวัชพืชตามความจำเป็น เก็บเกี่ยวอ้อยตอเมื่ออายุ 12 เดือน ในพื้นที่ 4 แถวกลางยาว 6 เมตร ตัดลำต้นชิดดิน ลอกกาบ ตัดยอด บันทึกผลผลิต

คำแนะนำการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินในอ้อย

ธาตุอาหาร	ค่าวิเคราะห์ดิน	ระดับ	อัตราปุ๋ยแนะนำ
อินทรียวัตถุ (%)	น้อยกว่า 1	ต่ำ	ไนโตรเจน 18 กก./ไร่
	1-2	ปานกลาง	ไนโตรเจน 12 กก./ไร่
	มากกว่า 2	สูง	ไนโตรเจน 6 กก./ไร่
ฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์ (มก./กก.)	น้อยกว่า 7	ต่ำ	ฟอสเฟต 9 กก./ไร่
	7-30	ปานกลาง	ฟอสเฟต 6 กก./ไร่
	มากกว่า 30	สูง	ฟอสเฟต 3 กก./ไร่
โพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มก./กก.)	น้อยกว่า 30	ต่ำ	โพแทช 18 กก./ไร่
	30-90	ปานกลาง	โพแทช 12 กก./ไร่
	มากกว่า 90	สูง	โพแทช 6 กก./ไร่

กรมวิชาการเกษตร

แคลเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มก./กก.)	น้อยกว่า 110	ต่ำ	ยิบซั่ม 100 กก./ไร่
	110-250	ปานกลาง	ยิบซั่ม 50 กก./ไร่
	มากกว่า 250	สูง	ไม่ต้องใส่
แมกนีเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ (มก./กก.)	น้อยกว่า 12	ต่ำ	โดโลไมท์ 50 กก./ไร่
	12-30	ปานกลาง	โดโลไมท์ 25-50 กก./ไร่
	มากกว่า 30	สูง	โดโลไมท์ 25 กก./ไร่
สังกะสีที่เป็นประโยชน์ (มก./กก.)	น้อยกว่า 0.6	ต่ำ	ธาตุสังกะสี 1.6 กก./ไร่
	มากกว่า 0.6	สูง	ธาตุสังกะสี 0.8 กก./ไร่

ที่มา : สถาบันวิจัยพืชไร่ (2544) และ ทักษิณา (2556)

การบันทึกข้อมูล

1. วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในอ้อยตอ เมื่ออายุ 6 เดือน วิธีการสุ่ม เก็บตัวอย่างใบอ้อยที่ Top visible dewlap จาก main stem แต่ละกรรมวิธีนำใบอ้อยที่เก็บได้จากทุกซ้ำมารวมกันแบบ Composited sample ส่งวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารกรรมวิธีละ 1 ตัวอย่าง ๆละ ครึ่งกิโลกรัม (น้ำหนักสด) โดยจังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ อุดรธานี สกลนคร และกาญจนบุรี ส่งห้องปฏิบัติการ ศวร.ขอนแก่น จังหวัดราชบุรี สุพรรณบุรี อุทัยธานี และนครสวรรค์ ส่งห้องปฏิบัติการกองวิจัยพัฒนาปัจจัยการผลิตทางการเกษตรค่าทางเคมีที่วิเคราะห์ ได้แก่ %N %P %K %Ca %Mg Zn(mg/kg) และ Fe(mg/kg)
2. การเจริญเติบโตของอ้อยตอ จำนวนหน่อต่อกอ ที่อายุ 4 เดือนหลังเก็บเกี่ยวอ้อยปลูก จำนวนลำต่อกอ ที่อายุ 6 เดือนหลังเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกเก็บข้อมูลทุก Plot
3. เปอร์เซ็นต์กอเป็นโรคใบขาว ที่อายุ 4 8 เดือนหลังเก็บเกี่ยวอ้อยปลูก และ ก่อนเก็บเกี่ยว แต่ละ Plot นับจำนวนกอทั้งหมดและจำนวนกอที่เป็นโรคใบขาว เพื่อหาเปอร์เซ็นต์กอเป็นโรคใบขาว
4. สุ่มตัวอย่างอ้อยส่งตรวจเชื้อโรคใบขาวก่อนและหลังการใส่ปุ๋ยอ้อยตอ 1 เดือนโดยเก็บตัวอย่างแบบ Composited sample ส่งตัวอย่างวิเคราะห์กรรมวิธีละ 1 ตัวอย่าง วิธีการเก็บใบแต่ละกรรมวิธีสุ่มเก็บใบอ้อยจากทุกซ้ำๆละ 20 กอ แต่ละกอเก็บกอละ 1 ใบจาก main stem โดยเก็บจาก Top visible dewlap เมื่อสุ่มเก็บได้ 20 ใบแล้วนำใบอ้อยใส่ถุงกระดาษส่งตรวจเชื้อโรคใบขาวที่ห้องปฏิบัติการของ ศวร.ขอนแก่น
5. ความสูงอ้อยช่วงเก็บเกี่ยว Plot ละ 10 กอ
6. ผลผลิตอ้อยตอเมื่อเก็บเกี่ยว นับจำนวนกอเก็บเกี่ยว จำนวนลำเก็บเกี่ยว ชั่งน้ำหนักลำสุ่ม 10 ลำ วัดความยาว เส้นผ่านศูนย์กลางที่กลางลำ จำนวนปล้อง เก็บข้อมูลทุก Plot
7. ค่าความหวานเมื่อเก็บเกี่ยว สุ่มอ้อยซ้ำละ 6 ลำ วัดค่าบริกซ์ โพล ไฟเบอร์ คำนวณค่าซีซีเอส เก็บข้อมูลทุก Plot

สถานที่ทดลอง ไร่เกษตรกรจังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ อุดรธานี สกลนคร ราชบุรี กาญจนบุรีสุพรรณบุรี อุทัยธานี และ นครสวรรค์

ระยะเวลา ตุลาคม 2558 - กันยายน 2564

กิจกรรมที่ 4 การจัดการโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยการระบาดโรคใบขาวอ้อย

การทดลองที่ 4.1 การจัดทำแผนที่พื้นที่เสี่ยงภัยจากการระบาดของโรคใบขาวอ้อย(ปี2559-2563)

ดำเนินการรวบรวมข้อมูลและสร้างฐานข้อมูลเชิงพื้นที่ของปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อย แบ่งเขตเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อยตามเกณฑ์ที่กำหนดจัดทำแผนที่พื้นที่เสี่ยงภัยจากการระบาดของโรคใบขาวอ้อย และ สำรวจ/สัมภาษณ์เทคโนโลยีการผลิตอ้อยของเกษตรกรในพื้นที่เสี่ยงภัยระดับต่างๆ

วิธีการดำเนินงาน

ขั้นตอนที่ 1 สำรวจ/สัมภาษณ์เทคโนโลยีการผลิตอ้อยของเกษตรกรในพื้นที่เสี่ยงภัยระดับต่างๆ ได้แก่ การใช้ที่ดิน การเตรียมดิน แหล่งพันธุ์อ้อย การใส่ปุ๋ย การดูแลรักษา ข้อมูลการเลือกใช้พันธุ์อ้อยของเกษตรกร การป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช การควบคุมวัชพืช การเก็บเกี่ยวเก็บข้อมูลพิกัดแปลงเกษตรกร และ เก็บตัวอย่างอ้อยจากแปลงเกษตรกรส่งตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 2 รวบรวมข้อมูลและสร้างฐานข้อมูลเชิงพื้นที่ของปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อย ได้แก่ชุดดิน ปริมาณฝน อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ คุณสมบัติทางกายภาพดิน

ขั้นตอนที่ 3 กำหนดเกณฑ์ที่ใช้ในการแบ่งเขตเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อย ได้แก่ การแบ่งชุดดิน จัดแบ่งภูมิอากาศ วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดินที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาว

ขั้นตอนที่ 4 จัดทำแผนที่พื้นที่เสี่ยงภัยจากการระบาดของโรคใบขาวอ้อยซึ่งจะแบ่งเขตความรุนแรงของพื้นที่การระบาดของอ้อยใบขาวเป็น 3 เขต ดังนี้

พื้นที่เสี่ยงภัยโรคใบขาวมาก (Hot spot) เป็นเขตที่พบการระบาดของโรคใบขาวในพื้นที่ปลูกอ้อยบ่อย โดยพบโรคใบขาวทุกปี เช่น พื้นที่ปลูกอ้อยในเขตอำเภอเขาสวนกวาง อำเภอมัญจาคีรี จังหวัดขอนแก่น อำเภอศรีธาตุ จังหวัดอุดรธานี เป็นต้น

พื้นที่เสี่ยงภัยโรคใบขาวน้อย เขตระบาดน้อย (Less spot) เป็นพื้นที่ที่พบโรคใบขาวน้อย ทำความเสียหายน้อย เช่น พื้นที่ปลูกอ้อยในเขตจังหวัดเลย

ทำการวิเคราะห์แผนที่เสี่ยงภัยการระบาดโรคใบขาวอ้อย จะได้พื้นที่การระบาดตามระดับความรุนแรงเป็นรายอำเภอ ตำบล ซึ่งจะใช้เป็นพื้นที่เป้าหมายของการทดสอบเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวในการทดลองที่ 4.2

ขั้นตอนที่ 5 วิเคราะห์ผลและสรุปผลทำการวิเคราะห์เทคโนโลยีการผลิตอ้อยของเกษตรกรในพื้นที่เสี่ยงภัยระดับต่างๆ ตั้งแต่ฤดูปลูก พันธุ์อ้อยที่ใช้ แหล่งพันธุ์ การปรับปรุงดิน การเตรียมดิน วิธีปลูก การใส่ปุ๋ยเคมี และการเก็บเกี่ยว วิเคราะห์วิธีการที่เกษตรกรปฏิบัติอยู่นั้น ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคใบขาวหรือไม่ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกเทคโนโลยีที่จะทดสอบการป้องกันกำจัดโรคใบขาวในการทดลองที่ 4.2 ต่อไป

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. แบบสัมภาษณ์เกษตรกรจำนวน 30 ชุด
2. เครื่องบันทึกพิกัดแปลง
3. วัสดุอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างอ้อยส่งตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา
4. ระบบคอมพิวเตอร์ 1 ชุด
5. แผนที่ชุดดิน 1: 50,000 จากกรมพัฒนาที่ดิน
6. แผนที่ปริมาณฝนเฉลี่ยรายปี จากกรมอุตุนิยมวิทยา
7. ข้อมูลอากาศ ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ
8. ข้อมูลดิน ได้แก่ คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของดิน

แบบและวิธีการทดลอง

วิธีการดำเนินงาน ปี 2559

1. สำรวจ/สัมภาษณ์การผลิตอ้อยของเกษตรกรบันทึกพิกัดแปลงเกษตรกร จำนวน 30 แปลงเก็บตัวอย่างอ้อยจากแปลงเกษตรกรส่งตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา จำนวน 30 แปลง
2. รวบรวมข้อมูลและสร้างฐานข้อมูลเชิงพื้นที่ของปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อยกำหนดเกณฑ์ที่ใช้ในการแบ่งเขตเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อย
3. จัดทำแผนที่ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อย

การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลจากการสำรวจ/สัมภาษณ์การผลิตอ้อยของเกษตรกร ได้แก่ การใช้ที่ดิน การเตรียมดิน แหล่งพันธุ์อ้อย การใส่ปุ๋ย การดูแลรักษา ข้อมูลการเลือกใช้พันธุ์อ้อยของเกษตรกร การป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช การควบคุมวัชพืช การเก็บเกี่ยว
2. ข้อมูลเชิงพื้นที่ของปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อย ได้แก่ชุดดิน ปริมาณฝน อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ คุณสมบัติทางกายภาพดิน

วิธีการดำเนินงาน ปี 2560

1. วิเคราะห์แผนที่เสี่ยงภัยการระบาดโรคใบขาวอ้อย จะได้พื้นที่การระบาดตามระดับความรุนแรงเป็นรายอำเภอ ตำบล
2. วิเคราะห์วิธีการผลิตอ้อยที่เกษตรกรปฏิบัติอยู่นั้นทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคใบขาวหรือไม่ มีปัจจัยเสี่ยงมากน้อยเพียงใด หากขาดข้อมูลใดลงไปสำรวจ สัมภาษณ์เพิ่มเติม
3. หาแนวทางการแก้ปัญหา การลดปัจจัยเสี่ยงมีเทคโนโลยีใดที่สามารถลดปัจจัยเสี่ยงนั้นได้

กรมวิชาการเกษตร

การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลจากการสำรวจ/สัมภาษณ์การผลิตอ้อยของเกษตรกร ได้แก่ การใช้ที่ดิน การเตรียมดิน แหล่งพันธุ์อ้อย การใส่ปุ๋ย การดูแลรักษา ข้อมูลการเลือกใช้พันธุ์อ้อยของเกษตรกร การป้องกันกำจัดโรคและแมลงศัตรูพืช การควบคุมวัชพืช การเก็บเกี่ยว
2. ข้อมูลเชิงพื้นที่ของปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวอ้อย ได้แก่ชุดดิน ปริมาณฝน อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ คุณสมบัติทางกายภาพดิน

วิธีการดำเนินงาน ปี 2561

ดำเนินการตรวจสอบการระบาดของโรคใบขาวในสภาพการผลิตอ้อยของเกษตรกร

1. สำรวจการระบาดของโรคใบขาว เพื่อตรวจสอบการระบาดจริงดำเนินการคัดเลือกพื้นที่เป้าหมายจากแผนที่เสี่ยงภัยการระบาดโรคใบขาวอ้อย โดยเลือกพื้นที่ที่มีการระบาดมาก ปานกลาง และน้อย อย่างละ 10 แปลง วิธีการสำรวจ เดินตรวจนับกอเป็นโรคใบขาวในแนวทแยงมุมของแปลงอ้อยที่ทำการสำรวจ โดยเดินนับแบบขั้นบันไดแล้วนับกอเป็นโรคใบขาวทีละช่วงๆละ 10 กอ แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคใบขาวของแปลงนั้นๆ วัดพิกัดแปลง
2. จัดความรุนแรงการระบาดของโรคใบขาวเป็นช่วง ดังนี้
    1) ความรุนแรงน้อยมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคใบขาวน้อยกว่าร้อยละ 5
    2) ความรุนแรงปานกลางมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคใบขาวระหว่างร้อยละ 5- 30
    3) ความรุนแรงมากมีเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคใบขาวมากกว่าร้อยละ 30
3. วิเคราะห์หาสาเหตุของความรุนแรงโรคใบขาว และหาแนวทางการแก้ปัญหา การลดปัจจัยเสี่ยง

การบันทึกข้อมูล

1. ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเป็นโรคใบขาว
2. ข้อมูลการผลิตอ้อยของเกษตรกรเของแปลงที่สำรวจการระบาดของโรคใบขาว
3. ข้อมูลผลวิเคราะห์หาสาเหตุของความรุนแรงโรคใบขาว

สำหรับการดำเนินงาน ปี 2562 เป็นการวิเคราะห์เทคโนโลยีการผลิตอ้อยของเกษตรกรในพื้นที่เสี่ยงภัยระดับต่างๆ ตั้งแต่ฤดูปลูก พันธุ์อ้อยที่ใช้ แหล่งพันธุ์ การปรับปรุงดิน การเตรียมดิน วิธีปลูก การใส่ปุ๋ยเคมี และการเก็บเกี่ยว วิเคราะห์วิธีการที่เกษตรกรปฏิบัติอยู่นั้น ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคใบขาวหรือไม่ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกเทคโนโลยีที่จะทดสอบการป้องกันกำจัดโรคใบขาว และเป็นแนวทางในการดำเนินการถ่ายทอดเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวต่อไป

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ไร่เกษตรกรจังหวัดที่มีการปลูกอ้อยหนาแน่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2558 - กันยายน 2562

การทดลองที่ 4.2 การทดสอบเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยต่อการเป็นโรคใบขาว (ปี2559-2564)

นำผลวิเคราะห์จากแผนที่พื้นที่เสี่ยงภัยจากการระบาดของโรคใบขาวอ้อย มาดำเนินการทดสอบเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวในสภาพไร่ในพื้นที่เสี่ยงภัยการระบาดของโรคใบขาว โดยแบ่งเป็นพื้นที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคใบขาวน้อยและพื้นที่เสี่ยงมาก ถ้าพื้นที่แปลงทดสอบอยู่ในเขตเสี่ยงมาก ทดสอบการปลูกพืชหมุนเวียนเพื่อตัดวงจรของโรค จัดการธาตุอาหารพืชให้สมดุล การทำแปลงพันธุ์โดยใช้อ้อยสะอาดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และป้องกันกำจัดแมลงพาหะ พื้นที่แปลงทดสอบอยู่ในเขตระบาดน้อยทดสอบการจัดการธาตุอาหารพืชให้สมดุล เพื่อจัดทำคำแนะนำการใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคใบขาวเฉพาะพื้นที่ ดำเนินการทดสอบในแปลงทดลองศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ไร่เกษตรกรจังหวัดขอนแก่น และกาฬสินธุ์ พื้นที่ 16 ไร่

การขยายผลเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวดำเนินการโดยใช้แนวทางการแก้ไขโรคใบขาวอ้อย ได้แก่ 1) การขจัดแหล่งเชื้อโรค โดยการตรวจแปลงขุดกอเป็นโรคทิ้ง 2) การลดการสะสมโรคและแมลงพาหะด้วยการปลูกพืชหมุนเวียน 3) การปรับปรุงบำรุงดินให้อุดมสมบูรณ์และให้น้ำอย่างเพียงพอ 4) การใช้ท่อนพันธุ์สะอาด การใช้ต้นอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 5) การดูแลรักษาอ้อยให้สมบูรณ์แข็งแรง และ 6) ไม่นำท่อนพันธุ์จากกอที่มีอาการโรคใบขาวไปขยายพันธุ์ต่อ และจากผลงานวิจัยเรื่องการศึกษาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งมีความแม่นยำในระดับ 0.5 copy/ul ของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2558) ได้ออกแบบวิธีการรายงานผลการตรวจโรคโดยใช้รหัสสี โดยรหัสสีจะแสดงถึงปริมาณเชื้อ ระดับความปลอดภัยในการนำท่อนพันธุ์ไป

กรมวิชาการเกษตร

ใช้ขยายต่อ และโอกาสในการแสดงอาการใบขาว โดยใช้รหัสสีแทนปริมาณการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ ระดับสีฟ้ามีปริมาณเชื้อน้อยมาก (0 - 0.5 copy/ul in 25 ng plant DNA) สามารถนำไปขยายพันธุ์ต่อได้จะยังไม่เกิดอาการใบขาวในรุ่นต่อมา ระดับสีเขียวตรวจพบเชื้อในระดับต่ำ (0.5 - 1 copy/ul in 25 ng plant DNA) สามารถนำไปขยายพันธุ์ต่อได้น่าจะยังไม่เกิดอาการใบขาวในรุ่นนี้ และในรุ่นตอต่อมาแต่อาจพัฒนามีเชื้อมากขึ้นได้ หากผ่านสภาวะเครียด ระดับสีเหลืองมีปริมาณเชื้อน้อย (1-10 copy/ul in 25 ng plant DNA) ควรเฝ้าระวังอาจเกิดโรคใบขาวได้ ระดับสีส้มมีเชื้อระดับปานกลาง (10-100 copy/ul in 25 ng plant DNA) อาจเกิดใบขาวได้ภายในรุ่นนี้ และอาจเกิดใบขาวในอ้อยตอหากผ่านสภาวะเครียด และระดับสีแดงมีปริมาณเชื้อสูง (> 100 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร่วมกับผลงานวิจัยเรื่อง Movement ability of vector insects of sugarcane white leaf disease ของ Kobori, Y. *et al*. (2015) ที่กล่าวว่า เพลี้ยจักจั่นอ้อย *Matsumuratettix hiroglyphicus* สามารถเคลื่อนที่ได้ระยะทางเฉลี่ย 162 เมตรภายใน 20 วัน และ *Yamatotettix flavovittatus* สามารถเคลื่อนที่ได้ระยะทางเฉลี่ย 387 เมตรภายใน 20 วัน และผลงานวิจัยเรื่องพฤติกรรมการเคลื่อนที่ของเพลี้ยจักจั่นพาหะนำโรคใบขาวอ้อย ของ ยุพา และทนุธรรม (2559) พบว่าตัวเต็มวัยของเพลี้ยจักจั่นปีกลายจุดสีน้ำตาล ชอบออกหากินในช่วงเวลากลางคืน และมีพฤติกรรมชอบเกาะและดูดกินบริเวณส่วนยอดของต้นอ้อยมากที่สุด ซึ่งขณะดูดกินแมลง มีการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เข้าสู่บริเวณยอดนั้นด้วย นอกจากนี้ตัวอ่อนของเพลี้ยจักจั่นปีกลายจุดสีน้ำตาล มีพฤติกรรมชอบหลบซ่อนและชอบเกาะอยู่บนต้นอ้อย ตัวอ่อนสามารถเคลื่อนที่ได้เป็นระยะทางมากที่สุด 1.2-1.5 เมตร การนำมาใช้โดยการทำแปลงปลูกอ้อยให้มีระยะห่างที่เหมาะสมจากแปลงที่มีแมลงพาหะ อาจทำให้ลดการระบาดของโรคใบขาวอ้อยได้ จึงนำมาประยุกต์ใช้ในแปลงขยายผลเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาว โดยการการจัดทำแปลงผลิตพันธุ์อ้อยสะอาดโดยการตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาวและการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area สำหรับการใส่ปุ๋ยของแปลงพันธุ์ใส่ตามผลวิเคราะห์ดิน โดยใส่ปุ๋ย 27-3-6 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ + โดโลไมท์ 5 กิโลกรัมต่อไร่+$ZnSO_4.7H_2O$ 3.8 กิโลกรัมต่อไร่ วิธีการใส่ปุ๋ยในช่วงใส่ปุ๋ยรองพื้นใส่ธาตุอาหารหลักอัตราครึ่งหนึ่งของค่าวิเคราะห์ดิน ธาตุรองใส่ครั้งเดียวในช่วงรองพื้น ถ้าค่าวิเคราะห์ธาตุแคลเซียมไม่เหมาะสมใส่ยิปซั่มในช่วงใส่ปุ๋ยรองพื้น และธาตุอาหารหลักใส่อีกครั้งตอนใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 โดยใส่เมื่ออ้อยอายุ 5 เดือนให้ครบตามค่าวิเคราะห์ดิน และมีการให้น้ำเสริมในช่วงที่อ้อยขาดน้ำ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง

1. ท่อนพันธุ์อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาระดับต่างๆ
2. ปุ๋ยเคมีเกรด 15-15-15 46-0-0 18-46-0 0-0-60 และ $ZnSO_4$
3. ปุ๋ยคอก ปุ๋ยหมัก และกากตะกอนหม้อกรองอ้อย
4. ปูนขาว ยิบซั่ม โดโลไมท์
5. เมล็ดพันธุ์ถั่วมะแฮะ ปอเทือง และ ถั่วลิสง
6. สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช
7. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารหลักและธาตุอาหารรองในท่อนพันธุ์อ้อย
8. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างอ้อย
9. วัสดุ อุปกรณ์ สำหรับเก็บ และ บันทึกข้อมูล

แบบและวิธีการทดลอง ทดสอบแปลงใหญ่ในไร่เกษตรกร

วิธีการดำเนินงาน

ปี 2559 ดำเนินการผลิตอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพันธุ์ขอนแก่น 3 จำนวน 6,000 ต้น สำหรับใช้ปลูก และขยายพันธุ์อ้อยสะอาดไว้ใช้ใน ปีที่ 2-6 ดำเนินการผลิตเมล็ดพันธุ์ถั่วมะแฮะ ปอเทือง และถั่วลิสง ชนิดพืชละ 2 ไร่ เพื่อนำไปใช้ทดสอบในปีที่ 3 และ ปีที่ 4

ปี 2560 พื้นที่ทดลองที่อยู่ในเขตเสี่ยงภัยจากการระบาดของโรคใบขาวมาก นำพืชหมุนเวียนไปปลูกเพื่อตัดวงจรของโรค ในช่วงฤดูฝนประมาณเดือนมิถุนายน 2560 เก็บตัวอย่างดินส่งวิเคราะห์เพื่อจัดการธาตุอาหารพืชให้สมดุล นำอ้อยจากแปลงพันธุ์สะอาดไปให้เกษตรกรปลูกในเดือนตุลาคม 2559 เพื่อขยายไว้ใช้ปลูกทดลองในเดือนตุลาคม 2560 สำหรับแปลงทดสอบที่อยู่ในเขตระบาดน้อยทำการทดสอบการจัดการธาตุอาหารพืชให้สมดุล นำอ้อยจากแปลงพันธุ์สะอาดไปปลูกทดสอบโดยไถเตรียมแปลงปลูกอ้อยประมาณเดือนตุลาคม 2559

ปี 2561

กรมวิชาการเกษตร

1) แปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวมาก ปลูกพืชปุ๋ยสด ไถกลบ และปลูกอ้อยตามเมื่อวันที่ 23 ธันวาคม 2559 ได้ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ดูแลรักษา ในปีงบประมาณ 2561 จะดำเนินการเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกเดือนพฤศจิกายน 2560 โดยก่อนเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกทำการวัดความสูง บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์กอที่เป็นโรคใบขาว เก็บเกี่ยวอ้อยที่อายุ 12 เดือน บันทึกข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต วัดค่าซีซีเอส ดูแลรักษาอ้อยตอ ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใช้ค่าวิเคราะห์ดินเดิมของอ้อยปลูก

2) แปลงที่มีการระบาดน้อย ทดสอบการจัดการธาตุอาหารพืชให้สมดุล เก็บตัวอย่างดินส่งวิเคราะห์ก่อนการเตรียมดิน นำอ้อยจากแปลงพันธุ์สะอาดไปปลูกทดสอบโดยไถเตรียมแปลงปลูกอ้อยประมาณเดือนตุลาคม 2560 ปลูกอ้อยโดยเปิดร่องวางลำคู่ สับลำให้ขาดจากกัน 3-4 ท่อน โรยปุ๋ยรองพื้นอัตราครึ่งหนึ่งของผลวิเคราะห์ดิน กลบดิน พ่นสารเคมีคุมวัชพืช และกำจัดวัชพืชตามความจำเป็น ใส่ปุ๋ยครั้งที่ 2 เมื่ออ้อยอายุ 5 เดือนในอัตราอีกครึ่งหนึ่งของผลวิเคราะห์ดิน เก็บเกี่ยวเมื่ออายุ 12 เดือน ในพื้นที่ 4 แถวยาว 6 เมตร 4 ซ้ำ ตัดลำต้นชิดดิน ลอกกาบ ตัดยอด บันทึกผลผลิต

ปี 2562

1) แปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวมาก เก็บเกี่ยวอ้อยตอ1 ที่ปลูกตามปุ๋ยพืชสดเดือนพฤศจิกายน 2561 โดยก่อนเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกทำการวัดความสูง บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์กอที่เป็นโรคใบขาว เก็บเกี่ยวอ้อยที่อายุ 12 เดือน บันทึกข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต วัดค่าซีซีเอส ดูแลรักษาอ้อยตอ ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใช้ค่าวิเคราะห์ดินเดิมของอ้อยปลูก

2) แปลงที่มีการระบาดน้อย ทดสอบการจัดการธาตุอาหารพืชให้สมดุล ในปีงบประมาณ 2562 จะดำเนินการเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกประมาณเดือนตุลาคม 2561 โดยก่อนเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกทำการวัดความสูง บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์กอที่เป็นโรคใบขาว เก็บเกี่ยวอ้อยที่อายุ 12 เดือน ในพื้นที่ 4 แถวยาว 6 เมตร 4 ซ้ำ ผลิตบันทึกข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต วัดค่าซีซีเอส ดูแลรักษาอ้อยตอ ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใช้ค่าวิเคราะห์ดินเดิมของอ้อยปลูก

3) การขยายผลเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาว โดยการการจัดทำแปลงผลิตพันธุ์อ้อยสะอาดโดยการตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาวและการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area นำอ้อยชำข้อจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไปปลูกแบบมี border area วิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาในใบอ้อยชำข้อทุกต้น ผลการวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมา หากเป็นรหัสสีแดง และสีส้ม ทำการขุดกอทิ้งออกจากแปลง ผลวิเคราะห์รหัสสีฟ้า แบ่งอ้อยเป็น 2 ส่วนๆที่ 1 นำไปปลูกขยายพันธุ์แบบวางลำ ส่วนที่ 2 นำลำไปชำข้อแล้วนำอ้อยชำข้อกลับเข้าสู่การปลูกแบบมี border area ใหม่ และผลวิเคราะห์รหัสสีเขียว แบ่งอ้อยเป็น 2 ส่วนๆที่ 1 นำไปปลูกขยายพันธุ์แบบวางลำ ส่วนที่ 2 นำลำไปชำข้อแล้วนำอ้อยชำข้อกลับเข้าการปลูกแบบมี border area ใหม่สำหรับการดูแลรักษาเพื่อป้องกันการกลับมาติดเชื้อใหม่ ได้แก่ การป้องกันกำจัดเพลี้ยจักจั่นในระยะต้นกล้าอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และในแปลงปลูกโดยใช้สารเคมีไทอะมีโทแซน การงดน้ำเป็นเวลา 1 เดือนหลังปลูกเพื่อให้ต้นที่ยังคงมีเชื้อโรคใบขาวแสดงอาการเพื่อกำจัดต้นใบขาวทิ้ง และการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน

ปี 2563

1) แปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวมาก นำอ้อยสะอาดรหัสสีฟ้าจากแปลงผลิตและกระจายพันธุ์อ้อยสะอาด ไปปลูกเพื่อลดการระบาดของโรคใบขาว เตรียมดิน ปลูกอ้อย เดือนตุลาคม ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ดูแลรักษา บันทึกข้อมูลการเป็นโรคใบขาว

2) แปลงที่มีการระบาดน้อยทดสอบการจัดการธาตุอาหารพืชให้สมดุล ในปีงบประมาณ 2563 จะดำเนินการเก็บเกี่ยวอ้อยตอ1 ประมาณเดือนตุลาคม 2562โดยก่อนเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกทำการวัดความสูง บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์กอที่เป็นโรคใบขาว เก็บเกี่ยวอ้อยที่อายุ 12 เดือน ในพื้นที่ 4 แถวยาว 6 เมตร 4 ซ้ำ บันทึกข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต วัดค่าซีซีเอส ดูแลรักษาอ้อยตอ ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใช้ค่าวิเคราะห์ดินเดิมของอ้อยปลูก

3) การขยายผลเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยต่อการเป็นโรคใบขาว ในปีงบประมาณ 2563 ทดลองการนำลำอ้อยรหัสสีฟ้ากับสีเขียวกลับเข้าสู่การปลูกแบบมี border areaรอบ 2 เทียบกับการนำไปปลูกขยายพันธุ์แบบวางลำ ดูการเป็นโรคใบขาว และการกลับมาติดเชื้อใหม่

กรมวิชาการเกษตร

ปี 2564

1) แปลงที่มีการระบาดของโรคใบขาวมาก นำอ้อยสะอาดรหัสสีฟ้าจากแปลงผลิตและกระจายพันธุ์อ้อยสะอาด ไปปลูกเพื่อลดการระบาดของโรคใบขาว เตรียมดิน ปลูกอ้อย เดือนตุลาคม ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน ดูแลรักษา บันทึกข้อมูลการเป็นโรคใบขาว
2) แปลงที่มีการระบาดน้อยทดสอบการจัดการธาตุอาหารพืชให้สมดุล ในปีงบประมาณ 2564 จะดำเนินการเก็บเกี่ยวอ้อยตอ2 ประมาณเดือนตุลาคม 2563 โดยก่อนเก็บเกี่ยวอ้อยปลูกทำการวัดความสูง บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์กอที่เป็นโรคใบขาว เก็บเกี่ยวอ้อยที่อายุ 12 เดือน ในพื้นที่ 4 แถวยาว 6 เมตร 4 ซ้ำ ผลิตบันทึกข้อมูลผลผลิตและองค์ประกอบผลผลิต วัดค่าซีซีเอส ดูแลรักษาอ้อยตอ ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใช้ค่าวิเคราะห์ดินเดิมของอ้อยปลูก
3) การขยายผลเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยต่อการเป็นโรคใบขาว ในปีงบประมาณ 2564 ดูการเป็นโรคใบขาว และการกลับมาติดเชื้อใหม่ ของแปลง border area รอบ 2

การบันทึกข้อมูล

1. คุณสมบัติทางกายภาพเคมีของดิน pH OM (%) Avail. P Exch. K Ca Mg Zn Fe
2. วันปลูกพืชปุ๋ยสด วันปลูกอ้อย และวันปฏิบัติการต่างๆ
3. วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในใบอ้อย ที่อายุ 6 เดือน
4. เปอร์เซ็นต์การงอกของอ้อยปลูก ที่อายุ 4 6 และ 12 สัปดาห์หลังงอก
5. การเจริญเติบโตของพืชปุ๋ยสด
6. การเจริญเติบโตของอ้อย จำนวนหน่อต่อกอที่อายุ 4 เดือนหลังงอก จำนวนลำต่อกอที่อายุ 6 เดือนหลังงอก
7. จำนวนกอที่แสดงอาการใบขาวต่อไร่ ที่อายุ 4 8 เดือนหลังงอก และ ก่อนเก็บเกี่ยว แต่ละกรรมวิธีนับจำนวนกอที่เป็นโรคใบขาวทั้งหมดในพื้นที่ทดลอง
8. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในใบอ้อยที่อายุ 6 เดือน
9. ความสูงอ้อยช่วงเก็บเกี่ยว
10. ผลผลิตเมื่อเก็บเกี่ยว นับจำนวนกอเก็บเกี่ยว จำนวนลำเก็บเกี่ยว ชั่งน้ำหนักลำสุ่ม 10 ลำ วัดความยาว เส้นผ่านศูนย์กลางที่กลางลำ จำนวนปล้อง
11. ค่าความหวานเมื่อเก็บเกี่ยว สุ่มอ้อยซ้ำๆละ 6 ลำ วัดค่าบริกซ์โพล ไฟเบอร์ คำนวณค่า ซีซีเอส
12. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยแปลงขยายผลเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาว
13. บันทึกจำนวนต้นที่เป็นโรคใบขาวในแปลงขยายผลเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวทุกกอ แล้วขุดทิ้ง

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ไร่เกษตรกรจังหวัดขอนแก่น และกาฬสินธุ์
ระยะเวลา ตุลาคม 2558 - กันยายน 2564

กิจกรรมที่ 5 การกำจัดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อย

การทดลองที่ 5.1 ผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว

ขั้นตอนที่ 1 : การตรวจหาระดับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่ชักนำให้เกิดอาการใบขาวได้โดยทดสอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิและสภาพแวดล้อม

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ต้นอ้อยอายุประมาณ 2 เดือนที่เพาะจากลำอ้อยที่มีอาการใบขาวที่ยอดหรือหน่อไม่มีอาการใบขาวและจากลำที่มาจากกอที่ไม่มีอาการใบขาว จำนวนไม่ต่ำกว่า 2 พันธุ์

แบบและวิธีการทดลอง : -

วิธีปฏิบัติการทดลอง :

ในแต่ละพันธุ์ นำอ้อยอาการระดับต่างๆ ชนิดละไม่ต่ำกว่า 10 ลำ นำมาตัดข้อ แช่ข้ออ้อยที่ได้ในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส 30 นาที แล้วนำมาเพาะตัวอย่างที่คัดเลือกได้ในกระบะทราย ให้น้ำตามสภาพความชื้นของดิน เพาะในกระบะจนอายุ 2 เดือน บันทึกอาการต้นที่งอก คัดเลือกเฉพาะต้นที่ไม่มีอาการใบขาว จำนวนไม่ต่ำกว่า 50 ต้น ต่อ พันธุ์ ตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์ตามวิธีการของ Sakuanrungsirikul *et al.* (2013) และ realtime PCR ตามรายงานของ

กรมวิชาการเกษตร

ศุจิรัตน์ และคณะ (2557ข) ตรวจปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดออกซิเดชั่นและการต่อต้านภาวะการติดเชื้อ ตามรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2557ก) นำตัวอย่างมาทดสอบสภาวะแล้งในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต โดยควบคุมอุณหภูมิ (39 ^{o}C) ความชื้นสัมพัทธ์ (60%) ความเข้มแสง (20,000 LUX) และเวลาส่องสว่าง:มืด (14:10 ชม.) ไม่ให้น้ำระหว่างทดสอบเป็นเวลา 4 วัน บันทึกอาการของต้น ทำการฟื้นต้นหลังการทดสอบในตู้เป็นเวลา 14 วัน ด้วยการให้น้ำ และบันทึกจำนวนต้นที่แสดงอาการใบขาว ตรวจปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค PCR ในกลุ่มต้นที่แสดงอาการใบขาว และปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดออกซิเดชั่นและการต่อต้านภาวะการติดเชื้อตามวิธีการในข้อ 2) และ 3)

ขั้นตอนที่ 2 : การสำรวจปริมาณเชื้อโรคใบขาวในต้นอ้อยในแปลงเกษตรกรสภาพดินต่างๆ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ต้นอ้อยพันธุ์ต่างๆ ในแปลงเกษตรกร (เก็บตัวอย่างอ้อยและข้อมูลสภาพแวดล้อมจากชุดโครงการวิจัยการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อยโดยการจัดการน้ำ ธาตุอาหารและการใช้พันธุ์ที่เหมาะสมกับพื้นที่)

แบบและวิธีการทดลอง: -

วิธีปฏิบัติการทดลอง :

สำรวจอ้อยตอในแหล่งปลูกที่มีการระบาดของโรคใบขาวอย่างรุนแรงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคเหนือตอนล่าง เก็บตัวอย่างลำและใบ ทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ บันทึกข้อมูลสภาพดิน สภาพแวดล้อมอื่น เช่น ฝน / แล้ง น้ำในช่วงเวลาที่สำรวจตัวอย่างและบันทึกพิกัดแปลง ตรวจปริมาณเชื้อและการติดเชื้ออื่นด้วย PCR ในใบก่อนการเพาะและชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาตามวิธีการของ Sakuanrungsirikul *et al.* (2013) และ realtime PCR ตามรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2557ข) และตรวจชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลสากล นำลำที่สำรวจได้ มาเพาะข้อ (แยกลำ) และบันทึกจำนวนต้นที่แสดงอาการใบขาวในต้นที่งอกใหม่เพื่อยืนยันการติดเชื้อและปริมาณเชื้อใบขาว

ขั้นตอนที่ 3: เปรียบเทียบผลระหว่างการศึกษาปริมาณเชื้อในห้องปฏิบัติการและตัวอย่างจากแปลงเกษตรกร

ขั้นตอนที่ 4 : วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

การบันทึกข้อมูล :

1. จำนวนต้นที่แสดงอาการใบขาวหลังการทดสอบในตู้ควบคุม ระดับความรุนแรงของอาการใบขาว และปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาจากใบ

2. ข้อมูลผลการตรวจปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดออกซิเดชั่นและการต่อต้านภาวะการติดเชื้อในต้นที่ทดสอบ

3. ข้อมูลสภาพแวดล้อมของตัวอย่างที่สำรวจได้ ประวัติการนำท่อนพันธุ์มาปลูก อาการต้นที่เพาะจากอ้อยที่ได้จากแหล่งปลูกต่างๆ และปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2558 - กันยายน 2562

การทดลองที่ 5.2 ผลของการติดเชื้อโรคอื่นซ้ำซ้อนต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยในสภาพไร่

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : สำรวจและแยกและเพาะเชื้อสาเหตุโรคอื่นในอ้อยสำหรับการทดสอบ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการโรคอื่น เช่น โรคใบลวก โรคเหี่ยว โรคใบจุด โรคราสนิมจากการสำรวจจากแปลงปลูกของเกษตรกรในแหล่งปลูกต่างๆ

แบบและวิธีการทดลอง: สำรวจและรวบรวมตัวอย่างอ้อยเป็นโรคจากไร่เกษตรกรและแปลงทดลอง

วิธีปฏิบัติการทดลอง :

สำรวจและเก็บตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการโรคอื่น เช่น โรคใบลวก โรคเหี่ยว โรคใบจุด โรคราสนิม จากแปลงปลูกของเกษตรกรในแหล่งปลูกต่างๆ เพาะแยกเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อในห้องปฏิบัติการตามวิธีการจำแนกเชื้อแต่ละ ชนิดและเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อการศึกษาในขั้นต่อไป ตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวและการติดเชื้ออื่นด้วยเทคนิค Nested-PCR ตามวิธีการ Sakuanrungsirikul*et al.* (2013) และ realtime PCR ตามรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2557ข) ตรวจยืนยันการติดเชื้อโรคใบขาวและปริมาณเชื้อด้วย SecA gene ตามวิธีการ Sakuanrungsirikul *et al.* (2013) จำแนกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยการตรวจและวิเคราะห์ลำดับเบสเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลลำดับเบสสากล บันทึกผลการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาร่วมกับการพบเชื้ออื่นในตัวอย่างเดียวกัน

กรมวิชาการเกษตร

ขั้นตอนที่ 2 : ศึกษาผลของการติดโรคอื่นต่อปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยการปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ต้นอ้อยอายุประมาณ 2 เดือน ที่ได้จากการเพาะอ้อยที่มีอาการยอดขาว หรือหน่อขาวและจากลำที่ไม่มีอาการใบขาว

แบบและวิธีการทดลอง : -

วิธีปฏิบัติการทดลอง :

เตรียมตัวอย่างโดยนำอ้อยลำที่มีอาการยอดขาว หรือหน่อขาวและลำที่มาจากกอที่ไม่มีอาการใบขาว ตัดข้อ ระบุตำแหน่งข้อ ระบุพันธุ์ที่ใช้ แช่ข้อในน้ำร้อน 52 องศาเซลเซียส 30 นาที นำมาเพาะในกระถาง บันทึก ตำแหน่งข้อที่ปลูก ดูแลรักษา และเพาะเลี้ยงจนได้ต้นอายุประมาณ 2 เดือน บันทึกข้อมูลอาการใบขาว ตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วย nested-PCR, secAตามวิธีการของ Sakuanrungsirikul*et al.* (2013) และ realtime PCR ตามรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2557ข) ในต้นที่คัดเลือกก่อนการปลูกเชื้อ นำไปปลูกเชื้อสาเหตุโรคอื่น เช่นโรคใบลวก โรคเหี่ยว โรคใบจุด โรคราสนิม (ที่สำรวจได้จากผลการทดลองในข้อ 1) ในห้องปฏิบัติการตามวิธีการมาตรฐาน (ดำเนินการที่ สถาบันวิจัยพืชไร่)จำนวน 50 ซ้ำ/เชื้อ 1 ชนิด บันทึกพัฒนาการของอาการของเชื้อชนิดต่างๆ ที่เกิดขึ้นบนใบ ตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาตามวิธีในข้อ 3) เมื่อเริ่มตรวจพบการแสดงอาการจากการปลูกเชื้อต่างๆ และเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจเชื้อเพิ่มอีกทุก 14 วัน หลังการแสดงอาการ จนถึง 3 เดือนหลังการปลูกเชื้อ

บันทึก วิเคราะห์ และสรุปผล

การบันทึกข้อมูล:

1. ในตัวอย่างที่สำรวจจากแปลง: บันทึกลักษณะอาการโรคอื่นที่พบในต้นที่สำรวจได้และชนิดของเชื้อจากการตรวจด้วยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสหรือจากการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อในห้องปฏิบัติการตามวิธีการจำแนกเชื้อทางกายภาพและทางชีวเคมี

2. ในตัวอย่างที่ทดสอบการปลูกเชื้อ : บันทึกระยะเวลาที่พืชเริ่มแสดงอาการของโรคที่เกิดจากการปลูกเชื้อ และบันทึกปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวก่อนและหลังทดสอบปลูกเชื้อชนิดต่างๆ ในกลุ่มตัวอย่างอาการระดับต่างๆ

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2558 - กันยายน 2563

การทดลองที่ 5.3 ผลของการฉายรังสีแกมมาต่อการแสดงอาการใบขาวและการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในอ้อยที่ติดเชื้อโรคใบขาว

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : การทดสอบหาความไว (Survival rate) ต่อการฉายรังสี

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3อายุ 1 เดือนที่ไม่มีอาการใบขาว

แบบและวิธีการทดลอง: แบบ CRD จำนวน 50 ซ้ำจำนวน 6 กรรมวิธี คือ ระดับการฉายรังสีแกมม่าที่ 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 เกรย์ (Gy)

วิธีปฏิบัติการทดลอง :

นำอ้อยที่ไม่มีอาการใบขาว ตัดข้อ นำไปแช่น้ำร้อนที่ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วนำมาเพาะในถุงใส่ทรายอบฆ่าเชื้อ ดูแลรักษาจนอายุได้ 1 เดือน นำตัวอย่างอ้อยที่ได้ไปฉายรังสีแบบเฉียบพลันที่ระดับ 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 เกรย์ (Gy) ระดับละ 50 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ได้มาเพาะเลี้ยงในวัสดุปลูกใหม่ แล้วดูแลรักษา ให้น้ำ บันทึกอัตราการรอดชีวิตหลังการเพาะเลี้ยงต่อ 15 วัน ในแต่ละระดับของการฉายรังสี วิเคราะห์ค่าความไวต่อการฉายรังสีด้วยการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของการฉายรังสีแต่ละระดับ และคำนวณหาค่า LD_{50} (50% lethality) ของตัวอย่าง บันทึกข้อมูล

ขั้นตอนที่ 2 : ทดสอบปฏิกิริยาตอบสนองต่อการฉายรังสีแกมม่าในระดับต่ำกว่า LD_{50}

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง : อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3อายุ 1 เดือนที่ไม่มีอาการใบขาว

แบบและวิธีการทดลอง : แบบ CRD จำนวน 50 ซ้ำ กรรมวิธี:มี 6 กรรมวิธี คือ ระดับการฉายรังสีแกมม่าที่ระดับ $LD_{0,}$, LD_{10} , LD_{20}, LD_{30} , LD_{40} , LD_{50}

วิธีปฏิบัติการทดลอง :

นำอ้อยที่ไม่มีอาการใบขาว ตัดข้อ นำไปแช่น้ำร้อนที่ 52 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พักไว้สำหรับนำไปทดสอบในขั้นต่อไป นำตัวอย่างอ้อยที่ได้ ไปฉายรังสีแบบเฉียบพลันในระดับที่ $LD_{0,}$, LD_{10} , LD_{20}, LD_{30} , LD_{40} , LD_{50} ตามผลการทดลองที่ได้จากขั้นตอนที่ 1ระดับละ 50 ตัวอย่าง เพาะเลี้ยงข้ออ้อยที่ผ่านการฉายรังสีแล้วในกระถาง แล้วดูแลรักษา ให้น้ำ บันทึกอัตราการ

กรมวิชาการเกษตร

รอดชีวิตหลังการเพาะเลี้ยงต่อ 15 วัน ตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างด้วยเทคนิคพีซีอาร์ตามวิธีการ Sakuanrungsirikul *et al.* (2013) และ realtime PCR ตามรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2557ข) หลังการฉายรังสีแต่ละระดับ ตรวจการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในปฏิกิริยาออกซิเดชั่นตามรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2557ก) หลังการฉายรังสีแต่ละระดับ บันทึกข้อมูล วิเคราะห์และสรุปผล

การบันทึกข้อมูล :

1. ระดับรังสีที่ LD_{50} และจำนวนต้นที่รอดจากการฉายรังสีแต่ละระดับ
2. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างหลังการฉายรังสี
3. ค่าของกิจกรรมเอ็นไซม์เอ็นไซม์ในกลุ่มปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในตัวอย่างหลังการฉายรังสี
4. อาการใบขาวในต้นที่ผ่านการฉายรังสี

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และศูนย์ปฏิบัติการนิวเคลียร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลา ตุลาคม 2558 - กันยายน 2562

การทดลองที่ 5.4 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่และวิธีการตรวจเชื้อโรคใบขาวด้วยเทคนิค M13-tagged two steps-PCR ที่แม่นยำและมีความไวสูง

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ต้นอ้อยที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการโรคใบขาว

แบบและวิธีการทดลอง : -

วิธีปฏิบัติการทดลอง : ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่ที่สามารถตรวจจับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยได้

วิธีดำเนินการทดลอง :

สืบค้นข้อมูลลำดับเบสของยีน imp ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยและพืชอื่น ที่มีรายงานในฐานข้อมูลสากล (NCBI) เปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบส ออกแบบชุดไพร์เมอร์สำหรับการตรวจจับยีน imp สังเคราะห์ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อการตรวจจับยีน imp เก็บตัวอย่างต้นอ้อยที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการโรคใบขาวที่มีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทดสอบไพร์เมอร์ ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน imp ด้วยชุดไพร์เมอร์ที่ออกแบบ ปรับเปลี่ยนองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และโปรแกรมในการเพิ่มปริมารดีเอ็นเอ ตรวจผลการทดสอบด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซีส วิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ไพร์เมอร์ที่ออกแบบ ด้วยเทคนิค Sanger sequencing โดยใช้เครื่องถอดรหัสพันธุกรรม (Sequencer) ตรวจเปรียบเทียบผลลำดับเบสกับฐานข้อมูล NCBI ตรวจยีน imp ตามวิธีที่พัฒนาขึ้น กับดีเอ็นเอของตัวอย่างใบอ้อยที่มีอาการ SCWL, SCGS และ SCGGS วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน imp ที่ได้จากโรคอ้อยทั้ง 3 อาการ จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์หาตำแหน่งความแปรปรวนของ นิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 โรค ออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่งที่นิวคลีโอไทด์เกิดความแปรปรวน ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยไพรเมอร์จากข้อ 11)ด้วยเทคนิค conventional PCR ทดสอบความถูกต้อง แม่นยำ ของไพร์เมอร์ที่ได้ในตัวอย่างเพิ่ม ตรวจปริมาณยีนได้โดยการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของยีน imp ที่มีการตรวจวัดความเข้มข้นแล้ว วิเคราะห์และสรุปผลประสิทธิภาพของไพร์เมอร์ imp ในการแยกความแตกต่างของเชื้อทั้ง 3 ชนิด

ขั้นตอนที่ 2 : พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโรคใบขาวด้วยเทคนิค M13-tagged two steps- PCR

วิธีการดำเนินการทดลอง :

สำรวจต้นอ้อยและเก็บตัวอย่างลำที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการใบขาวเก็บตัวอย่างใบ สกัดดีเอ็นเอ ออกแบบไพรเมอร์ใหม่ โดยให้มีส่วนปลายของไพร์เมอร์ในการตรวจ M13 ติดอยู่กับปลาย 5’ ของไพร์เมอร์ imp ที่ได้จากขั้นตอนที่ 1, ไพร์เมอร์ P1/P7, ไพร์เมอร์ secA ทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค two steps PCR ด้วยไพร์เมอร์ แต่ละชุด วิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ได้ ทดสอบปริมาณความเข้มข้นของยีนที่ต่ำที่สุดที่สามารถตรวจได้ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น ตรวจผลการทดสอบด้วยเทคนิคอิเลคโตรโฟริซีส วิเคราะห์และสรุปผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค two steps PCR ด้วยไพร์เมอร์ชุดใหม่ที่ได้

การบันทึกข้อมูล

ขั้นตอนที่ 1 การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่ที่สามารถตรวจจับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยได้ บันทึก ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน imp ที่ตรวจพบในเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยในเชื้อ SCWL, SCGS และ SCGGS และตำแหน่งที่แสดง

กรมวิชาการเกษตร

ความแตกต่างของเชื้อทั้ง 3 ชนิด ขนาดความยาวของชิ้นดีเอเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้ ลำดับนิวคลิโอไทด์ของไพร์เมอร์ที่ใช้ในการตรวจยีน imp สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน imp ในตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรค

ขั้นตอนที่ 2 การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโรคใบขาวด้วยเทคนิค M13-tagged two steps- PCR บันทึกสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สามารถตรวจยีน 3 ชนิดได้ ด้วย M13-tailed primer 5' ขนาดความยาวของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพร์เมอร์ที่ออกแบบได้ ประสิทธิภาพของไพร์เมอร์ในการแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้นต่ำสุดของปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นที่สามารถตรวจพบได้ด้วยวิธีการที่พัฒนาขึ้น

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2561 - กันยายน 2564

การทดลองที่ 5.5 การถ่ายทอดปริมาณเชื้อโรคใบขาวในอ้อยสู่อ้อยตอและการแสดงอาการของโรคในสภาพไร่

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง : ต้นอ้อยที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการโรคใบขาว

แบบและวิธีการทดลอง : -

วิธีปฏิบัติการทดลอง :

ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : ตรวจติดตามปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในอ้อยรุ่นที่ 1 และในรุ่นอ้อยตอในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

วิธีดำเนินการทดลอง :

สำรวจและคัดเลือกต้นอ้อยในแปลงทดลองใน ศวร.ขก. (ในการทดลองการทดสอบการจัดการน้ำอย่างต่อเนื่องในอ้อย) รวมประมาณ 50-100 กอที่มีอาการและไม่มีอาการใบขาว นับจำนวนลำ/หน่อในกอ ติดเครื่องหมายทุกลำ บันทึกอาการสีใบ เก็บใบตำแหน่งที่ 3 จากยอด บันทึกอาการสีใบ ตรวจปริมาณเชื้อใบขาวด้วยเทคนิค PCR ทำการตรวจปริมาณเชื้อใบขาวทั้งสิ้น 3 อายุ : 3 เดือน,6 เดือน, 9 เดือน ในอ้อยรุ่นที่ 1 และรุ่นอ้อยตอจำนวน 2-3 รุ่น บันทึกอาการสีใบ วันที่เก็บตัวอย่าง สภาพอากาศ และการจัดการแปลงในช่วงที่เก็บตัวอย่าง

ขั้นตอนที่ 2 ตรวจติดตามปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในอ้อยที่ได้จากการชำข้อตาและปลูกในสภาพแปลง

วิธีดำเนินการทดลอง :

สำรวจและคัดเลือกลำอ้อยจากกอที่มีอาการใบขาว ตัดข้อตา และชำในถุงเพาะจำนวน 200 ข้อ ปลูกในแปลงทดลองในไร่เกษตรกร ระยะห่าง 1.5x1 เมตร ดูแลแปลงตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร คัดเลือกกอจำนวน 50-100 กอที่มีอาการและไม่มีอาการใบขาว นับจำนวนลำ/หน่อในกอ ติดเครื่องหมายทุกลำ บันทึกอาการสีใบ เก็บใบตำแหน่งที่ 3 จากยอด บันทึกอาการสีใบ ตรวจปริมาณเชื้อใบขาวด้วยเทคนิค PCR) ทำการตรวจปริมาณเชื้อใบขาวทั้งสิ้น 3 อายุ : 3 เดือน,6 เดือน, 9 เดือน ในอ้อยรุ่นที่ 1 และรุ่นอ้อยตอจำนวน 2-3 รุ่น บันทึกอาการสีใบ วันที่เก็บตัวอย่าง สภาพอากาศ และการจัดการแปลงในช่วงที่เก็บตัวอย่าง

การบันทึกข้อมูล : จำนวนหน่อ/ ลำต่อกอ อาการสีใบ ปริมาณเชื้อใบขาวสภาพดิน สภาพภูมิอากาศ และการจัดการธาตุอาหารในแปลง

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2561 - กันยายน 2564

การทดลองที่ 5.6 การใช้เทคนิค HRM ในการตรวจชนิดเชื้อแบคทีเรียที่เกิดร่วมกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ต้นอ้อยที่แสดงอาการโรคเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และ/หรือเกิดร่วมกับโรคใบขาว

แบบและวิธีการทดลอง : -

วิธีปฏิบัติการทดลอง : แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : การสำรวจ รวบรวม จำแนกอาการโรคใบขาวและโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย และการแยกเชื้อเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

1. **การสำรวจเก็บตัวอย่างอ้อยและแยกเชื้อแบคทีเรีย**

สำรวจโรค เก็บตัวอย่างอาการโรคอ้อยจากแหล่งปลูกของเกษตรกร จังหวัดขอนแก่น นครราชสีมา และกำแพงเพชร การแยกเชื้อแบคทีเรีย เลือกตัดชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการ โดยตัดบริเวณที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค ขนาดชิ้นส่วนพืชประมาณ 0.5 x 0.5

กรมวิชาการเกษตร

มิลลิเมตร 1-2 ชิ้น จุ่มแช่ในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ นาน 1-2 นาที ใช้ปากคีบฆ่าเชื้อหยิบชิ้นส่วนพืชดังกล่าว วางบนหยดน้ำ 10-20 ไมโครลิตร ตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ทิ้งไว้ 3-5 นาทีแล้วใช้ลูปที่ฆ่าเชื้อ จุ่มในหยดน้ำ นำมาลาก (streak) บน อาหารเลี้ยงเชื้อ วางจานเลี้ยงเชื้อใส่ในถุงพลาสติก คว่ำจานลง บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) 1-2 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญมีเลือกแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาเลี้ยงบนอาหารจนได้เชื้อบริสุทธิ์ เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24-48 ชั่วโมงเขี่ยเชื้อ 1 ลูปเต็มละลายในน้ำกรองนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง เก็บเชื้อบนอาหารเอียงเททับด้วยพาราฟินเหลว ย้อมแกรมศึกษาแบคทีเรียย้อมสี สีจะติดตามผนังเซลล์ทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างเซลล์แบคทีเรียชนิดต่างๆได้ โดยนำแบคทีเรียมาเกลี่ยบนแผ่นสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง เพื่อตรึงแบคทีเรียให้ติดกับแผ่นสไลด์ หยดสี Crystal violet ลงให้ท่วมทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ล้างสีออกด้วยแอลกอฮอล์ 95เปอร์เซนต์ประมาณ 20 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ย้อมด้วยสี Safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ซับสไลด์ให้แห้ง นำไปส่องดูแกรมแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรีย แกรมบวกจะย้อมติดสีน้ำเงินของ Crystal violet และแบคทีเรียแกรมลบจะย้อมติดสีแดง Safranin O

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอแบคทีเรีย : สกัดดีเอ็นเอจากโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างอ้อยด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป NucleoSpin Tissue (MACHEREY-NAGEL, Germany) ตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อในตัวอย่างแต่ละอาการด้วยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 16S-23S rDNA

2.2 การสกัดดีเอ็นเอพืช : ตัวอย่างใบสดจากอ้อยที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการที่สำรวจได้จากแหล่งระบาดของโรคในจังหวัดขอนแก่น นครราชสีมา และกำแพงเพชร สกัดดีเอ็นเอจากใบด้วยการประยุกต์ CTAB method ตามวิธีของ Li and Midmore (1999) ตรวจวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอพืชด้วย Nano drop (Nano Drop Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA) ตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อในตัวอย่างแต่ละอาการด้วยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 16S-23S rDNA

3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยแต่ละปฏิกิริยามีปริมาตรสุทธิ 15 µl มีความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนผสมดังนี้ 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase, 0.34 µM Primer และ 25 ng/µl สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Veriti Thermal Cycler, USA) มีขั้นตอนดังนี้ Pre-denaturing 94 °C นาน 5 นาที, denaturing 94 °C นาน 1 นาที, annealing 50 °C นาน 1 นาที, extension 72 °C นาน 1 นาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 35 รอบ) และ final extension 72 °C นาน 7 นาที นำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และนำมาทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GF-1 AmpbiClean Kit (Vivantis) ส่งผลผลิต PCR บริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดย Solegent (Korea)

4. การโคลนยีน

เตรียมตัวอย่าง DNA ยีนเป้าหมายบริเวณ 16S-rDNA มาทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้ คู่ Primer p210 /p1370 และตรวจสอบผลผลิตที่ได้ โดยวิธี electrophoresis สกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เทคนิค gel elution ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (Promega, USA) นำชิ้นยีนที่ทำบริสุทธิ์มาเชื่อมกับ เวคเตอร์ pGEM-T และเคลื่อนย้ายพลาสมิดที่มียีน p210 /p1370 เข้าสู่ component cells เชื้อ *E.coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธี Heat shock transformation ทำการ คัดเลือกเชื้อที่มียีนในอาหารแข็ง LB ที่มี X-gal และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมพิซิลลิน โดยวิธี spread plate เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อที่มีโคโลนีสีขาวมา steak ในอาหาร แข็ง LB ที่มี 50 มิลลิกรัมต่อลิตร แอมพิซิลลิน และ เขี่ยเชื้อส่วนที่เหลือมาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ ได้ รับยีนเข้าไปตรวจสอบยีนโดยวิธี PCR ที่ใช้ คู่ primer p210 /p1370 แล้วนำผลผลิต PCR ตรวจสอบโดยวิธี electrophoresis นำเชื้อไปเลี้ยงเพิ่มจำนวน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับใช้เป็นตัวอย่าง ควบคุมต่อไป

5. การทดสอบหาปริมาณดีเอ็นที่น้อยที่สุดของยีน p210 /p1370 ที่สามารถตรวจพบได้อย่างน่าเชื่อถือ

เตรียมดีเอ็นเอ 16S-rDNA ยีน p210 /p1370 ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ(deionized water) ในระดับต่าง ๆ ตั้งแต่ 10^1 - 10^{10} โดยใช้ความเข้มข้นดีเอ็นเอตัวอย่าง 20 นาโนกรัม/ ไมโครลิตร ปริมาณ 3 ไมโครลิตร ทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR จำนวน 3 ซ้ำ ตามกรรมวิธีการ ทดสอบ แล้วนำไปเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค real-time PCR หาค่าระดับต่ำที่สุดของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถตรวจพบสัญญาณฟลูออเรสเซนต์ได้ และนำเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนระดับต่ำที่สุดนั้นมาหา จำนวนสำเนาดีเอ็นเอที่น้อยที่สุดที่สามารถตรวจ พบได้ตามวิธีการของ Broeder et al. (2014)

6. การสร้าง Phylogenetic tree

ทำการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้องด้วยโปรแกรม BioEdit v 7.1 และ Clustal W จากนั้นทำการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA ver. 5.05 ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้โมเดล Kimura 2- parameter ด้วยการสุ่มข้อมูล (bootstrap) จำนวน 1,000 ครั้ง

7. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี Real-time PCR และการวิเคราะห์ HRM

นำสารละลายดีเอ็นเอ (25 ng/µl) ที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 16S-23S ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามข้อ 2 จากนั้น นำผลผลิตที่ได้มาเจือจางอัตราส่วน 1:200 สำหรับเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในทำ PCR ปริมาตรสุทธิ 15 µl ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้ 1X PCR buffer, 2.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase 0.2 µM p210-R (5'GAGGAAIGIGGAIGACGT3')/p1370 F(5'AGICCCGIGAACGTATTCAC3') และ 3.34 µM Syto9 dye วิเคราะห์ค่าการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (melting temperature; Tm) ที่ติดตั้งอยู่ในเครื่องเพิ่ม ปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (Light Cycler® 480 Real-time PCR, Roche, Germany) มีขั้นตอนดังนี้ initial-denaturing 94 °C นาน 5 นาที, denaturing 94 °C นาน 30 วินาที, annealing 50 °C นาน 30 วินาที, extension 72 °C นาน 40 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 40 รอบ) จากนั้นทำการ เพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 65 °C ถึง 95 °C โดยเพิ่ม 0.03 °C ต่อวินาที เมื่อสิ้นสุดให้ลดอุณหภูมิลงที่ 40° C นาน 30 วินาที วิเคราะห์ melting peak ด้วยโปรแกรม Tm calling และสร้าง Normalized melting curves โดยโปรแกรม Gene Scanning 1.5.0 (Roche Diagnostics, Germany)

การบันทึกข้อมูล :

ระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียสาเหตุของโรคอ้อยร่วมกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว บันทึกข้อมูลการตรวจพบโรคและการระบาดของในแต่ละพื้นที่ที่สำรวจ ข้อมูลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยสัณฐานและการทดสอบทางชีวเคมี ลำดับเบสของยีนเป้าหมายที่ใช้ตรวจสอบและชนิดของเชื้อ ค่า Tm ของยีนเป้าหมายในแบคทีเรียที่ตรวจสอบ

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2562 - กันยายน 2564

การทดลองที่ 5.7 การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการขยายพันธุ์หลายรุ่นในอาหารสังเคราะห์

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: อ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3

แบบและวิธีการทดลอง: -

วิธีปฏิบัติการทดลอง :

แบ่งเป็น (1) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น 2 วิธีการ จำนวนตัวอย่างเริ่มต้น 5 กอต่อวิธีการ แยกขยายจำนวน 5-8 รุ่นๆ ละ 2 กอ (1 กอต่อขวด) (2) ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา 2 วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยโดยการชักนำผ่านคัลลัส

เพาะตาอ้อยในกระบะทรายที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ เมื่ออ้อยงอกนำไปตรวจคัดกรองโรค ใช้ต้นที่ผ่านการตรวจโรคระดับสีฟ้า (มีเชื้อน้อยกว่า 5 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม จำนวน 5 ตัวอย่าง เมื่ออ้อยอายุได้ประมาณ 1 เดือน ความสูงอ้อยประมาณ 20 ซม. นำต้นอ้อยมาล้างด้วยน้ำยาล้างจาน ก่อนนำไปฟอกฆ่าเชื้อด้วย Clorox (6% w/w) ความเข้มข้น 30% ที่เติม Tween20 ประมาณ 2-3 หยดเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 3-4 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นลอกเปลือกหุ้มออกประมาณ 2-3 ชั้น และหั่นเป็นชิ้นเล็กก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารสูตร Murashige and Skoog's (MSC) ที่เติมฮอร์โมนที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 1 mg/l และ casein ความเข้มข้น 300 mg/l เพื่อชักนำให้เจริญไปเป็นแคลลัส โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อได้แคลลัสในปริมาณมากพอจึงย้ายลงอาหารสูตร MSS II ที่มีฮอร์โมน BA 1 mg/l และ NAA 0.25 mg/l เพื่อขยายแคลลัส นำแคลลัสที่ได้มาชักนำให้เป็นต้น ในอาหาร MSS I ที่เติมฮอร์โมนที่เติมฮอร์โมน NAA ความเข้มข้น 0.25 mg/l และ BA ความเข้มข้น 1 mg/l เมื่อแคลลัสเจริญเป็นต้นแล้ว นำต้นมาเพิ่มจำนวนในอาหาร MSS II ที่เติมฮอร์โมนที่เติมฮอร์โมน 2,4-D ความเข้มข้น 0.5 mg/l และ kinetin ความเข้มข้น 2 mg/l เมื่อต้นอ้อยมีการเจริญแตกกอมากขึ้น ทำการแยกต้นออกมาเป็นต้นเดียว นำไปเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ นับเป็นรุ่นที่ 1 และเมื่อรุ่นที่ 1 ขยายเพิ่มจำนวนอีก จะทำการแยกต้นออกมาเป็นต้นเดียว นำไปเลี้ยงในอาหารขวดใหม่ นับเป็นรุ่นที่ 2 แล้วทำการแยกขยายในรุ่นต่อไปอีกจนถึงรุ่นที่ 10 การแยกขยายดำเนินการโดยจาก 1 กอ นำมาแยกเป็น 2 กอ ในทุกรุ่น สุ่มเก็บตัวอย่างใบจากทุกขวดในแต่ละรุ่นที่ได้ นำไปตรวจปริมาณเชื้อเชื้อไฟโตพลาสมาโดยวิธี Nested PCR, secA PCR และ realtime PCR แยก 1 กอจาก 1 ขวด เป็น 1 ตัวอย่าง

ขั้นตอนที่ 2 : เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยโดยการชักนำต้นจากยอดเจริญ

กรมวิชาการเกษตร

ใช้ตัวอย่างอ้อยจากขั้นตอนที่ 1 เพาะในอาหารชักนำต้น และทำการขยายเพิ่มปริมาณตาม และสุ่มเก็บตัวอย่างตามขั้นตอนที่ 1

ขั้นตอนที่ 3 : การตรวจเชื้อโรคใบขาว

ด้วยวิธี PCR 3 วิธีการ ได้แก่ Nested-PCR ยีนเป้าหมาย 16S-23S rDNA, ยีน secA ด้วยวิธี PCR ตามวิธีของ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และคณะ (2558ข) และ LAMP ยีนเป้าหมาย 16S-23S rDNA ตามวิธีของ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และ วีรกรณ์ แสงไสย์ (2562)

การบันทึกข้อมูล:

บันทึกข้อมูลต้นเนื้อเยื่อประกอบด้วย รุ่นที่แยกขยาย และปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาตรวจด้วย PCR ทั้ง 2 วิธีการ

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2563 - กันยายน 2564

การทดลองที่ 5.8 การศึกษาอุบัติการณ์การตรวจพบเชื้อโรคใบขาวอ้อยที่มีอาการร่วมกับเส้นกลางใบเหลืองและการจำแนกชนิดของเชื้อด้วยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์

สิ่งที่ใช้ในการทดลอง: ตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการโรคเส้นกลางใบเหลืองและใบขาว จากการสำรวจจากแปลงปลูกของเกษตรกรในแหล่งปลูกต่างๆ

แบบและวิธีการทดลอง:

สำรวจและรวบรวมตัวอย่างอ้อยเป็นโรคจากไร่เกษตรกรและแปลงทดลองที่มีอาการเส้นกลางใบเหลืองและ/หรือร่วมกับอาการใบขาว ตามพื้นที่ปลูกอ้อยใน จังหวัดนครสวรรค์ กำแพงเพชร กาญจนบุรี สระแก้ว อุดรธานี และขอนแก่น

วิธีปฏิบัติการทดลอง :

1. **การสำรวจเก็บตัวอย่างใบอ้อยและตัวอย่างดิน**

สำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างอ้อยในปี 2564 บริเวณจังหวัดขอนแก่น อุดรธานี นครราชสีมา นครสวรรค์ สระแก้ว สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี เก็บเฉพาะตัวอย่างที่แสดงอาการที่สงสัยว่าเป็นโรค โดยเดินสำรวจในแปลงหากอที่เป็นโรค โดยจำแนกตามลักษณะอาการ สังเกตลักษณะเส้นกลางมีลักษณะเหลืองแต่ใบมีสีเขียว โดยเก็บตัวอย่างใบอ้อยไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และสุ่มเก็บตัวอย่างดินสามจุดภายในแปลงอ้อย โดยขุดเจาะที่ระดับความลึก 30 เซนติเมตรพร้อมระบุพิกัด

2. **การวิเคราะห์คุณสมบัติของดินและธาตุอาหารตัวอย่างใบอ้อย**

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างอ้อยและตัวอย่างดินจากแปลงอ้อยตามจังหวัดต่างๆ นำตัวอย่างส่งห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ดิน ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น เพื่อวิเคราะห์หาค่า pH ค่าการนำไฟฟ้า (EC) เปอร์เซ็นต์อินทรียวัตถุ ปริมาณธาตุฟอสฟอรัส โพแทสเซียม และเหล็กในดิน ส่วนตัวอย่างใบอ้อยวิเคราะห์ปริมาณธาตุไนโตรเจน โพแทสเซียม และเหล็ก โดยมุ่งวิเคราะห์สาเหตุที่เกี่ยวข้องทำให้เกิดอาการเส้นกลางใบเหลืองในอ้อย

3. **ตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอ**

ตัวอย่างใบสดจากอ้อยที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการที่สำรวจได้จากแหล่งระบาดของโรค

สกัดดีเอ็นเอจากใบด้วยการประยุกต์ CTAB method ตามวิธีของ Li and Midmore (1999) ตัดใบอ้อย ประมาณ 1 กรัม บดในโกร่งพร้อมกับไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผงแป้ง นำใบพืชที่บดแล้ว ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม extraction buffer [(เตรียม 500 มิลลิลิตร : CTAB (hexadecyltrimetyl ammonium bromide) 10 กรัม, NaCl 40.9 กรัม, 0.5M EDTA (pH 8.0) 20 มิลลิลิตร, 2M Tris-HCl (pH 8.0) 25 มิลลิลิตร, PVP-40T 5 กรัม)] 700 ไมโครลิตร และเติม mercaptoethanol 2 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เขย่าทุกๆ 10 นาที เติม chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1) 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการกลับหลอดไปมาเบาๆ หรือใช้เครื่อง shaker เบาๆ นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบน 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 300 ไมโครลิตร (0.6 เท่าของสารละลาย DNA) และ 3M sodium acetate 50 ไมโครลิตร (0.1 เท่าของสารละลาย DNA) กลับหลอดไปมาเบาๆ บ่มที่ –20 องศาเซลเซียส หรือแช่ในน้ำแข็ง 30 นาที ระยะนี้จะเห็นตะกอน DNA เป็นเส้นใยสีขาวใส ปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอน DNA เทน้ำใสทิ้ง ล้างตะกอน DNA ด้วย 70% ethanol 500 ไมโครลิตร (2 ครั้ง) โดยเขย่าเบาๆ 2 – 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทน้ำใสทิ้ง ปล่อยตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องละลายตะกอนด้วย TE 100 ไมโครลิตร และเติม RNase A (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) 2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60

กรมวิชาการเกษตร

องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หรือ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำดีเอ็นเอที่ไปวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วเก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ -20 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการศึกษาวิจัยต่อไปตรวจวัดปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอพืชด้วย Nanodrop (NanoDrop Lite Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA) ตรวจพิสูจน์ชนิดของเชื้อในตัวอย่างแต่ละอาการด้วยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 16S-23S rDNA

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชเป็นโรคด้วย Nested-PCR: นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากอ้อยและหญ้าเป็นโรคใบขาวมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR มี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณ 16S RNA ซึ่งเป็นบริเวณที่มีตำแหน่งอนุรักษ์ทางพันธุกรรมสูง (Deng and Hinki 1991; Schneider et al., 1995) ซึ่งในปริมาตร 15 ml ประกอบด้วย 1xbuffer, 1.5 mM Mg_2Cl, 0.2 mM dNTP, 0.5 mM Forward primer (MLO-X), 0.5 mM Reverse primer (MLO-Y), 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, EU)และ DNA template 3 ml (100 ng) ขั้นตอนที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจากบริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบขาวโดยมีปฏิกิริยาสุทธิ 15 ml ประกอบด้วย 1x buffer,1 mM Mg_2Cl, 0.2 mM dNTP, 0.5 mM Forward primer (P1), 0.5 mM Reverse primer (P2), 0.1 U Taq polymerase and DNA template (1st-PCR product) 3 ml โปรแกรมที่ใช้ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 95°C นาน 1 นาที, 55°C นาน 30 วินาที (ขั้นตอนที่ 2 ใช้ 60°C) และ 72°C นาน 1 นาที จำนวนรอบ 24 รอบ (ขั้นตอนที่ 2 ใช้จำนวนรอบ 25 รอบ) ตรวจผลโดยนำผลผลิตที่ได้จากทั้ง 2 ขั้นตอนมาผสมกับ loading dye ที่มี SYBER GREEN จำนวน 1.5 ml และแยกขนาดด้วยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส บนอะการ์โรสเจลความเข้มข้น 1% ตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต Primer Sequence (5'->3') (Hanboonsong et al., 2005)

MLO-X: GTT-AGG-TTA-AGT-CCT-AAA-ACG-AGC;
MLO-Y: GTG-CCA-AGG-CAT-CCA-CTG-TAT-GCC
P1: GTC-GTA-ACA-AGG-TAT-CCC-TAC-CGG ;
P2: GGT-GGG-CCT-AAA-TGG-ACT-TGA-ACC

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์: สกัดชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้น้ำยาสำเร็จรูป GF-1 AmpbiClean Kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเทียบผลกับฐานข้อมูลใน NCBI จัดเรียงและสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Molecular Evolutionary Genetics Analysis; MEGA ver. 5.0 software ในรูปแบบ neighbor-joining method

5. การสร้าง Phylogenetic tree

ทำการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้องด้วยโปรแกรม BioEdit v 7.1 และ Clustal W จากนั้นทำการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA ver. 5.05 ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้โมเดล Kimura 2- parameter ด้วยการสุ่มข้อมูล (bootstrap) จำนวน 1,000 ครั้ง

การบันทึกข้อมูล :

ในตัวอย่างที่สำรวจจากแปลง: บันทึกลักษณะอาการโรคอื่นที่พบในต้นที่สำรวจได้และชนิดของเชื้อจากการตรวจด้วยการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสหรือจากการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อในห้องปฏิบัติการ

สถานที่ทดลอง ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

ระยะเวลา ตุลาคม 2563 - กันยายน 2564

3. การปรับแผนงบประมาณระหว่างปี

☑ ไม่มี ☐ มี ได้รับอนุมัติเมื่อวันที่..... (โปรดแสดงหลักฐานในภาคผนวก)

☐ เปลี่ยนแปลงงบประมาณ โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

☐ เปลี่ยนแปลงวัตถุประสงค์/ผลผลิต โปรดอธิบายการเปลี่ยนแปลง.....

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 3 ผลการศึกษา

3.1 ผลการดำเนินงานของโครงการ

ในการศึกษาเพื่อหาแนวทางจัดการโรคใบขาวในสภาพไร่ ได้องค์ความรู้เรื่องธาตุอาหาร สมดุลธาตุอาหารหลักและรองในการจัดทำคำแนะนำการใช้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการป้องกันกำจัดโรคใบขาวเฉพาะพื้นที่ ดังนี้

1. ศึกษาปริมาณธาตุอาหารรองในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในระดับต่างๆ

1.1. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย

ผลการทดลองพบว่า ท่อนพันธุ์กลุ่มรหัสสีฟ้าที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาน้อยมาก เมื่อนำไปปลูกจะได้ต้นที่มีเชื้อไฟโตพลาสมา 3 ระดับ โดยส่วนโคนจะได้ต้นอ้อยที่มีปริมาณเชื้อฯ รหัสสีเขียว และสีส้ม ใกล้เคียงกันร้อยละ 43 และ 57 ตามลำดับ ท่อนพันธุ์จากส่วนกลางลำจะได้ต้นที่มีปริมาณเชื้อรหัสสีฟ้า สีเขียว และสีส้ม โดยจะได้ต้นอ้อยที่มีปริมาณเชื้อรหัสสีเขียวมากที่สุดร้อยละ 50 และท่อนพันธุ์จากส่วนปลายลำจะได้ต้นที่มีปริมาณเชื้อรหัสสีฟ้า สีเขียว และสีส้ม โดยจะได้ต้นอ้อยที่มีปริมาณเชื้อรหัสสีส้มมากที่สุดร้อยละ 43 เมื่อพิจารณาในภาพรวมทั้ง 7 ลำแล้วพบว่าแม้นำท่อนพันธุ์ที่มีเชื้อน้อยไปปลูกต้นอ้อยที่ได้จะมีเชื้ออยู่ในระดับสีส้มมากที่สุดเฉลี่ยร้อยละ 44 รองลงมาเป็นรหัสสีเขียวร้อยละ 41 และ สีฟ้าร้อยละ 15 เมื่อดูจากปริมาณเชื้อในท่อนพันธุ์อ้อยในระดับที่สามารถนำไปทำพันธุ์ได้ คือรหัสสีฟ้าและสีเขียว มีสัดส่วนร้อยละ 56 :ซึ่งการพบเชื้อในระดับสีฟ้าและสีเขียวในต้นอ้อย ดังกล่าว สามารถนำท่อนไปขยายพันธุ์ต่อได้ ท่อนพันธุ์กลุ่มรหัสสีเขียวมีเชื้อในระดับต่ำ เมื่อนำไปปลูกพบเชื้อรหัสสีฟ้า สีเขียว และสีส้ม ท่อนพันธุ์จากส่วนกลางลำดีที่สุดเนื่องจากมีการตรวจพบเชื้อรหัสสีฟ้า และรหัสสีเขียว ไม่พบเชื้อรหัสสีส้มและสีแดง ส่วนโคนพบเชื้อรหัสสีเขียวและส้ม ส่วนปลายลำพบแต่เชื้อระดับสีเขียวเท่านั้น ซึ่งเชื้อที่พบในระดับสีส้มอาจเกิดใบขาวได้ภายใน crop นี้ และอาจพบใบขาวในอ้อยตอหากผ่านสภาวะเครียด ดังนั้นหากท่อนพันธุ์มีเชื้อในระดับสีส้มควรหลีกเลี่ยงการนำส่วนโคนไปทำพันธุ์เนื่องจากพบเชื้อในระดับสีส้มเมื่อนำไปปลูกและเกิดสภาวะเครียดขึ้นอาจเกิดใบขาวได้ภายใน crop นี้ เมื่อพิจารณาในภาพรวมทั้ง 4 ลำแล้วพบว่าหากนำท่อนพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อระดับสีเขียวนี้ไปทำพันธุ์ก็มีโอกาสจะเกิดโรคและไม่เกิดโรคใบขาวร้อยละ 11 และ89 ตามลำดับ และท่อนพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อกลุ่มรหัสสีส้ม มีเชื้อระดับปานกลาง เมื่อนำไปปลูกจะพบเชื้อในต้นอ้อยทั้งสีฟ้า สีเขียว และสีส้ม โดยส่วนโคนและส่วนกลางลำจะพบเชื้อในระดับสีเขียวและสีส้ม ส่วนปลายลำจะพบเชื้อระดับสีฟ้า สีเขียว และสีส้ม จากผลการทดลองเป็นที่ยืนยันได้ว่าหากพบเชื้อในท่อนพันธุ์อ้อยในระดับสีส้มนั้นไม่ควรนำไปทำพันธุ์เนื่องจากมีโอกาสเกิดโรคร้อยละ 63 ซึ่งระดับของเชื้อที่จะนำไปทำพันธุ์ต่อได้คือสีฟ้าและสีเขียวซึ่งพบร้อยละ 6 และ 32 ตามลำดับ ท่อนพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อกลุ่มรหัสสีแดง เมื่อนำไปปลูกจะพบเชื้อในต้นอ้อยทั้งสีฟ้า สีเขียว และสีส้ม โดยพบร้อยละ 11 18 และ 70 ตามลำดับ ซึ่งไม่ควรนำไปทำพันธุ์เพราะมีโอกาสแพร่กระจายโรคออกไปได้มากที่สุดถึงร้อยละ 70 โดยสรุปแล้วพบว่าท่อนพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อกลุ่มรหัสสีฟ้าและสีเขียวซึ่งจัดว่าเป็นท่อนพันธุ์คุณภาพดีเมื่อนำไปปลูกจะได้ต้นที่มีเชื้อกลุ่มรหัสสีฟ้าและสีเขียว ในสัดส่วนมากกว่าท่อนพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อกลุ่มรหัสสีส้มและสีแดง

1.2. ปริมาณธาตุอาหารในท่อนพันธุ์อ้อยที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาระดับต่างๆ

ท่อนพันธุ์อ้อยที่มีการติดเชื้อไฟโตพลาสมาน้อยมากรหัสสีฟ้า คือมีการติดเชื้อน้อยกว่า 0.5 copy/ul ใน 25 ng ของ DNA พืช มีผลวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในท่อนพันธุ์ทุกตัวสูงกว่าท่อนพันธุ์อ้อยที่มีการติดเชื้อต่ำรหัสสีเขียว ติดเชื้อปานกลางระดับสีส้ม และติดเชื้อสูงระดับสีแดง โดยท่อนพันธุ์รหัสสีฟ้ามีปริมาณธาตุอาหารในท่อนพันธุ์ ดังนี้มีธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี 0.83% 0.45% 1.136% 0.094% 0.093% 0.0077% และ 0.0009% ตามลำดับ ท่อนพันธุ์รหัสสีเขียวมีปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี 0.72% 0.36% 1.016% 0.078% 0.083% 0.0066% และ 0.0008% ตามลำดับ ท่อนพันธุ์รหัสสีส้มมีปริมาณธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี 0.72% 0.28% 0.824% 0.0066% 0.074% 0.0057% และ 0.0007% ตามลำดับ และท่อนพันธุ์รหัสสีแดงมีปริมาณธาตุอาหารทุกตัวน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับท่อนพันธุ์รหัสสีอื่นๆโดยมีธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี 0.39% 0.13% 0.097% 0.029% 0.034% 0.0038% และ 0.0006% ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณธาตุอาหารในแต่ละส่วนของลำอ้อยพบว่า 1) ท่อนพันธุ์ที่มีการติดเชื้อน้อย(สีฟ้า) มีปริมาณธาตุอาหารในส่วนโคน กลาง ปลายลำใกล้เคียงกัน ยกเว้นธาตุโพแทสเซียมจะพบในส่วนปลายมากกว่าส่วนโคนและกลางลำ โดยปริมาณธาตุโพแทสเซียมที่พบในส่วนปลายมากกว่าส่วนโคนร้อยละ 32 แต่ธาตุแมกนีเซียมกับพบในส่วนโคนมากที่สุดและพบใน

กรมวิชาการเกษตร

ส่วนกลางน้อยที่สุด โดยปริมาณธาตุแมกนีเซียมที่พบในส่วนโคนมากกว่าส่วนกลางลำร้อยละ 22 2)ท่อนพันธุ์ที่มีการติดเชื้อต่ำ(สีเขียว) มีธาตุไนโตรเจนมากที่สุดส่วนกลางลำ มีธาตุฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสี มากที่สุดส่วนโคนลำ 3) ท่อนพันธุ์ที่มีการติดเชื้อปานกลาง(สีส้ม)ส่วนกลางลำจะมีปริมาณธาตุอาหารน้อยกว่าส่วนอื่นยกเว้นธาตุแมกนีเซียมกับสังกะสีจะพบที่ส่วนกลางลำมากที่สุด และ 4) ท่อนพันธุ์ที่มีการติดเชื้อสูง(สีแดง)ธาตุอาหารส่วนใหญ่อยู่ส่วนกลางลำ ได้แก่ธาตุไนโตรเจน แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก ส่วนธาตุฟอสฟอรัสและโปแทสเซียมอยู่ที่กลางลำมากกว่าส่วนอื่น และธาตุสังกะสีอยู่ที่ปลายลำมากกว่าส่วนอื่นๆ

1.3. สมดุลของธาตุอาหารในท่อนพันธุ์อ้อย

ท่อนพันธุ์อ้อยมีระดับการติดเชื้อน้อยมาก ต่ำ ปานกลาง และสูง มีสมดุลของธาตุไนโตรเจนและแมกนีเซียม 8.96 8.81 9.84 และ 11.44 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเมื่ออ้อยมีการติดเชื้อมากขึ้นในระดับสีส้มและสีแดงค่าสมดุลของธาตุไนโตรเจนและแมกนีเซียมเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากในท่อนพันธุ์มีปริมาณแมกนีเซียมลดลงมาก ทำให้เกิดภาวะไม่สมดุลระหว่างธาตุไนโตรเจนและแมกนีเซียมขึ้น สำหรับสมดุลของธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัส ของท่อนพันธุ์อ้อยมีระดับการติดเชื้อน้อยมาก ต่ำ ปานกลาง และสูง มีค่า 2.50 2.79 2.93 และ 0.76 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสมดุลของธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสในการติดเชื้อน้อยมากกับต่ำมีค่าใกล้เคียงกัน ค่าเริ่มลดลงเมื่อมีการติดเชื้อปานกลาง และลดลงมากเมื่อมีการติดเชื้อสูง แสดงให้เห็นว่าอ้อยที่มีการติดเชื้อสูงมีโพแทสเซียมลดลงมาก จึงเกิดภาวะไม่สมดุลระหว่างธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัส

1.4. การจัดการธาตุอาหารของอ้อยตอ

หลังจากตัดลำหลักไปวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารและดูการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางท่อนพันธุ์แล้ว ดำเนินการตัดลำอ้อยออกจากกอให้หมด เพื่อให้อ้อยตอมีการแตกหน่อขึ้นมาใหม่ แล้วทำการติดตามการติดเชื้อโรคใบขาวของอ้อยตอจากกอที่มีระดับการติดเชื้อทั้ง 4 กลุ่ม ทำการเก็บตัวอย่างดินจากกอที่มีการติดเชื้อรหัสสีฟ้า เขียว ส้ม แดง โดยเก็บดินจากทุกกอที่มีผลรหัสสีเดียวกันมารวมกันเป็น composite sample ส่งดินวิเคราะห์รหัสสีละ 1 ตัวอย่าง เพื่อนำมาคำณวนปุ๋ยที่ใส่ให้กับอ้อยตอในแต่ละรหัสสีตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยมีผลวิเคราะห์ดินที่ระดับความลึก 30 ซม.แสดงใน การจัดการธาตุอาหารบริเวณกออ้อยตอ นำการจัดการสมดุลธาตุอาหารเพื่อลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเป็นโรคใบขาวมาใช้ ดังนี้ การปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างของดินให้เหมาะสม ถ้าดินมีพีเอช 4.5-5.0 ปรับปรุงโดยการหว่านปูนขาวอัตรา 100 กิโลกรัมต่อไร่ หรือใส่ฟิลเตอร์เค้ก 1 ตันต่อไร่ ดินมีพีเอชน้อยกว่า 4.5 ปรับปรุงโดยการหว่านปูนขาวอัตรา 200 กิโลกรัมต่อไร่ หรือใส่ฟิลเตอร์เค้ก 2 ตันต่อไร่ การจัดการธาตุอาหารถ้าดินมีอินทรียวัตถุต่ำมาก (%OM < 0.5%) จะใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มขึ้น 0.5 เท่าของคำแนะนำ ในที่นี้คำแนะนำการใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินของอ้อยปกติถ้า%OM < 0.5% แนะนำให้ใส่ไนโตรเจน 18 กิโลกรัมต่อไร่ ในอ้อยตอจะใส่ปุ๋ยไนโตรเจนเพิ่มเป็น 27 กิโลกรัมต่อไร่ นอกจากนี้ยังได้นำสัดส่วนของธาตุโพแทสเซียมกับธาตุฟอสฟอรัสมาพิจารณาร่วมด้วย ถ้าสัดส่วนของK/P มากกว่า 4.55 ทำการเพิ่มปุ๋ยฟอสฟอรัสให้มากกว่าเดิม 0.3 เท่า เนื่องจากดินมีค่า K/P เกินปกติ (กอบเกียรติ, 2553) โดยการจัดการธาตุอาหารบริเวณกออ้อยตอ เนื่องจากค่าวิเคราะห์ดินจากกอรหัสสีฟ้า สีเขียว สีส้ม และสีแดงมีค่าอินทรียวัตถุต่ำ มีค่าฟอสฟอรัสที่เป็นประโยชน์สูง และมีค่าโพแทสเซียมที่แลกเปลี่ยนได้ในระดับปานกลาง จึงทำการใส่ปุ๋ยไนโตรเจน ฟอสเฟต และโพแทส อัตรา 27-3-12 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ สำหรับธาตุสังกะสีนั้นกออ้อยรหัสสีฟ้า สีเขียว และสีส้มมีค่า Zn ที่เป็นประโยชน์สูง จึงไม่ได้ใส่ธาตุสังกะสี ส่วนกออ้อยรหัสสีแดงมีค่า Zn ที่เป็นประโยชน์ต่ำจึงใส่ธาตุสังกะสีในรูป $ZnSO_4$ ในอัตรา 7.6 กิโลกรัมต่อไร่

1.5. ปริมาณธาตุอาหารและปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในใบอ้อยตอ

การจัดการธาตุอาหารให้กับอ้อยในระดับกอของอ้อยตอกลุ่มรหัสสีทั้ง 4 ระดับของการติดเชื้อโรคใบขาวเพื่อที่จะไม่ให้มีการติดเชื้อมากขึ้น อ้อยในกลุ่มรหัสสีฟ้าที่มีตัวเชื้อน้อยอยู่แล้ว เมื่อมีการจัดการสมดุลธาตุอาหารโดยใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินอัตรา 27-3-12 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ โดยไม่มีการใส่ธาตุสังกะสีเพิ่มเติมเนื่องจากในดินมีสังกะสีที่เป็นประโยชน์สูงถึง 2.12 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เมื่อพิจารณาปริมาณธาตุอาหารในใบก่อนและหลังการใส่ปุ๋ย 1 เดือนพบว่าการดูดใช้ธาตุอาหารของอ้อยในกลุ่มนี้ไม่ดีนักปริมาณธาตุอาหารหลังใส่ปุ๋ยลดลงจากตอนก่อนใส่ปุ๋ยทุกธาตุ ทำให้หลังใส่ปุ๋ยอ้อยมีการติดเชื้อเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากรหัสสีฟ้าเป็นสีเขียว ซึ่งก็อยู่ในระดับที่สามารถนำไปขยายพันธุ์ต่อได้ สำหรับอ้อยตอในกลุ่มสีเขียวการจัดการสมดุลธาตุอาหารโดยใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินอัตรา 27-3-12 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ ไม่มีการใส่ธาตุสังกะสีเพิ่ม อ้อยในกลุ่มนี้สามารถดูดใช้ธาตุอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยค่าวิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารในใบเพิ่มขึ้นเกือบทุกค่า ยกเว้นธาตุสังกะสี ทำให้หลังใส่ปุ๋ยยังคงรักษาระดับการติดเชื้ออยู่ที่รหัสสีเขียวเหมือนเดิม ส่วนกลุ่มรหัสสีส้มซึ่งมีการจัดการธาตุอาหารเช่นเดียวกับสีฟ้าและสีเขียว แต่หลังใส่ปุ๋ยกลับมีปริมาณเชื้อใบขาวลดลงจากสีส้มเป็นสีฟ้า จะเห็นได้ว่ากลุ่มรหัสสีส้มมีการดูดใช้ธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสได้ดีขึ้น ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การติดเชื้อโรคใบขาวลดลง และกลุ่มสีแดงมีการจัดการสมดุลธาตุอาหารโดยใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินอัตรา

กรมวิชาการเกษตร

27-3-12 กิโลกรัม N-P_2O_5-K_2O ต่อไร่ ร่วมกับการใส่ธาตุสังกะสีในรูป $ZnSO_4$ ในอัตรา 7.6 กิโลกรัมต่อไร่ พบว่ากลุ่มรหัสสีแดงมีการดูดใช้ธาตุอาหารลดลงทุกธาตุยกเว้นธาตุเหล็กและธาตุสังกะสีมีการดูดใช้มากขึ้นจะเห็นได้ว่าเกิดความไม่สมดุลของธาตุเหล็กและธาตุสังกะสี แต่กลับมีสมดุลของธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสเพิ่มขึ้นทำให้หลังจากใส่ปุ๋ยแล้วการติดเชื้อโรคใบขาวลดลงจากสีแดงเป็นสีเขียว จากผลการทดลองสมดุลของธาตุอาหารในใบที่เหมาะสมที่จะไม่ทำให้เกิดโรคใบขาว นั้นพบว่าสมดุลไนโตรเจนและแมกนีเซียมในใบควรอยู่ในช่วง 15-25 สมดุลของธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสควรอยู่ในช่วง 2.36-3.61 สมดุลของธาตุเหล็กและสังกะสีควรอยู่ในช่วง 11-25 หากน้อยกว่าหรือมากกว่านี้ก็จะไม่เหมาะสม

2. ศึกษาการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสีเพื่อลดการแสดงอาการ โรคใบขาวของท่อนพันธุ์

ความเข้มข้นของสารละลายเกลือสังกะสีที่เหมาะสมในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อย ที่ทำให้เชื้อไฟโตพลาสมาลดลง คือการแช่สารละลาย $ZnSO_4$ ที่เข้มข้น 1% การใช้ความเข้มข้นที่มากกว่านี้มีผลให้อ้อยไม่งอกเนื่องจาก $ZnSO_4$ ไปทำลายตาอ้อยทำให้ตาอ้อยตาย ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสี คือการแช่ที่ระยะเวลา 15 และ 20 นาที ตามลำดับ โดยให้คุณภาพท่อนพันธุ์ดีที่สุดเนื่องจากเมื่ออ้อยอายุ 11 สัปดาห์ ปริมาณเชื้อภายในต้นอ้อยยังอยู่ในระดับต่ำถึงระดับน้อยมาก คือตรวจพบเชื้อที่ระดับ 0-0.5, 0.5-1.0 และ 1-10 copy/µl in 25 ng plant DNA และปริมาณธาตุสังกะสีจะมากที่สุดหลังการแช่สารละลาย $ZnSO_4$ และจะลดลงไปเรื่อย ๆ เมื่ออ้อยอายุมากขึ้น สำหรับการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสีโดยใช้ความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสม พบว่าท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดมีสมดุลของธาตุไนโตรเจนกับแมกนีเซียม โพแทสเซียมกับฟอสฟอรัส เหล็กกับสังกะสี 10.0 3.71 4.83 ตามลำดับ ท่อนพันธุ์จากแปลงเป็นโรคใบขาวมีสมดุลของธาตุอาหารต่ำกว่าท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดโดยมีสมดุลของธาตุอาหาร 9.1 2.3 และ 3.0 ตามลำดับ ถ้าใช้ท่อนพันธุ์สะอาดไม่จำเป็นต้องแช่สารละลาย $ZnSO_4$ เนื่องจากสามารถให้ผลผลิตอ้อยปลูกและให้ผลผลิตน้ำตาลสูงที่สุด 19.1 และ 2.48 ตันซีซีเอสต่อไร่ตามลำดับ แต่การแช่สารละลาย $ZnSO_4$ 0.5 % กลับมีผลต่อความหวานของอ้อย โดยให้ค่าความหวานสูงที่สุด 16.0 ซีซีเอส ในทำนองเดียวกับการใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยเป็นโรคใบขาว วิธีการที่ไม่แช่ท่อนพันธุ์ให้ผลผลิตอ้อยปลูกสูงที่สุด 16.4 ตันต่อไร่ แต่การแช่ท่อนพันธุ์ด้วยสารละลาย $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 0.5 % เป็นวิธีที่ให้ผลผลิตน้ำตาลสูงที่สุด 2.18 ตันซีซีเอสต่อไร่ สำหรับการเป็นโรคใบขาวแปลงที่ใช้ท่อนพันธุ์อ้อยสะอาดไม่พบกอเป็นโรคใบขาว แต่พบกอเป็นโรคใบขาวจากแปลงที่ใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงเป็นโรคใบขาว ในวิธีการที่ไม่แช่ท่อนพันธุ์ แช่น้ำสะอาด และ แช่สารละลาย $ZnSO_4$ 0.5% โดยพบโรคใบขาวร้อยละ 0.78 0.49 และ 3.12 ตามลำดับ และไม่พบกอเป็นโรคใบขาวในแปลงที่ใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงเป็นโรคใบขาวที่มีการแช่สารละลาย $ZnSO_4$ 0.75% และ 1.0%

3. การจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาว

การลดความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีการระบาดของโรครุนแรงเนื่องจากมีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม แนะนำให้ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใส่ไนโตรเจนอัตรา 27 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ฟอสเฟตอัตราปานกลางถึงสูงระหว่าง 6-9 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ใส่โพแทส อัตราปานกลางถึงสูงระหว่าง 12-18 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ควรเพิ่มธาตุแมกนีเซียมในรูปโดโลไมท์ อัตราระหว่าง 25-75 กิโลกรัมต่อไร่ และเพิ่มธาตุสังกะสีในรูป $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 3.8 - 7.6 กิโลกรัมต่อไร่ ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ และอุดรธานี ส่วนจังหวัดสกลนครไม่จำเป็นต้องใส่ธาตุสังกะสี สำหรับพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันตกซึ่งมีการระบาดของโรคใบขาวต่ำกว่าภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แนะนำให้ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใส่ไนโตรเจนอัตรา 18-27 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ฟอสเฟตอัตราต่ำถึงปานกลางระหว่าง 3-6 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ในพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี อุทัยธานี และนครสวรรค์ ยกเว้นจังหวัดสุพรรณบุรีใส่ฟอสเฟตอัตราสูง 9 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ใส่โพแทส อัตราปานกลางถึงสูงระหว่าง 12-18 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ควรเพิ่มธาตุแมกนีเซียมในรูปโดโลไมท์ อัตราระหว่าง 25-30 กิโลกรัมต่อไร่ และเพิ่มธาตุสังกะสี ในพื้นที่จังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรี ใส่ $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 3.8 กิโลกรัมต่อไร่ ในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี และอุทัยธานีใส่ $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 7.6 กิโลกรัมต่อไร่ ส่วนจังหวัดนครสวรรค์ไม่จำเป็นต้องใส่ธาตุสังกะสี และการจัดการสมดุลธาตุอาหารอ้อยเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถลดความรุนแรงของการเกิดโรคใบขาวอ้อยได้ โดยมีผลทำให้อ้อยมีความแข็งแรงมากขึ้น ทำให้ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาลดลง อ้อยจึงไม่แสดงอาการโรคใบขาว

4. การจัดการโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยการระบาดโรคใบขาวอ้อย

4.1. การจัดทำแผนที่ความเสี่ยงการระบาดของโรคใบขาวอ้อย

โดยใช้ข้อมูลชนิดของเนื้อดิน ความลึกของชั้นดินบน ความแน่นของดิน จากชุดดิน 294 ชุดดินนำมาวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สมการ ความรุนแรงใบขาวของอ้อย (Y) = 78.7**+27.0(A) **-19.8(B)**-1.6(C) + 0.68(G)** ร่วมกับปริมาณน้ำฝนแล้ววิเคราะห์ข้อมูลเป็นเชิงพื้นที่และเชิงเวลาพบว่าอาการใบขาวอ้อยมีความสัมพันธ์กับการเกิดในพื้นที่สำรวจเมื่อเทียบกับแผนที่ความ

กรมวิชาการเกษตร

เสี่ยงการเกิดอาการใบขาวในอ้อย จากการวิเคราะห์ความแม่นยำ พบว่าความถูกต้องแผนที่ความเสี่ยงระดับ ที่ 1 หรือมีความเสี่ยงต่อการเกิดใบขาวน้อยที่สุดหรือไม่เกิดใบขาว มีความแม่นยำ ถูกต้อง 60.98 % ชั้นความเสี่ยงในการเกิดใบขาวระดับที่ 3 มีความแม่นยำถูกต้องต้อง 100% และระดับที่ 4 มีความแม่นยำถูกต้อง 50% ตามลำดับ ส่วนระดับที่ 2 และระดับที่ 5 คือเล็กน้อย และความเสี่ยงรุนแรง มีค่าเป็น 0 โดยมีระดับความแม่นยำถูกต้องรวมอยู่ที่ 59.57 % หากมีการใช้ข้อมูลสภาพแวดล้อมอื่นๆ มาร่วมวิเคราะห์ประกอบจะยิ่งเป็นแนวทางการจัดการอ้อยใบขาวได้ดียิ่งขึ้น ในพื้นที่ ๆมีความเสี่ยงการเกิดใบขาวหากเพิ่มการจัดการน้ำ การจัดการธาตุอาหาร หรืออาจเปลี่ยนไปปลูกพืชอื่นก็จะสามารถลดการระบาดของโรคใบขาวลงได้ (ภาคผนวก ตารางที่ 4.1.1, ภาพที่ 4.1.1)

4.2. เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยต่อการเป็นโรคใบขาว

4.2.1. การปลูกพืชหมุนเวียนตัดวงจรโรคใบขาว พืชที่มีคุณสมบัติในการใช้เป็นพืชหมุนเวียนเพื่อตัดวงจรโรคใบขาว เมื่อพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์โรคใบขาวและผลผลิตแล้วพบว่า การปลูกอ้อยตามถั่วลิสงพบโรคใบขาวเฉลี่ยต่ำที่สุดร้อยละ 0.6 โดยพบโรคใบขาวในอ้อยปลูกเฉลี่ยร้อยละ 1.19 และ ไม่พบโรคใบขาวในอ้อยตอ โดยให้ผลผลิตอ้อยปลูกและอ้อยตอเฉลี่ย 17.5 และ 8.0 ตันต่อไร่ ตามลำดับ พืชที่มีคุณสมบัติในการใช้เป็นพืชหมุนเวียนเพื่อลดการระบาดของโรคใบขาวอีกชนิดหนึ่งคือถั่วมะแฮะ เนื่องจากพบโรคใบขาวในระดับต่ำเฉลี่ยร้อยละ 1.28 โดยพบโรคใบขาวในอ้อยปลูกและอ้อยตอร้อยละ 1.04 และ 1.51 ตามลำดับ และให้ผลผลิตอ้อยปลูกและอ้อยตอเฉลี่ย 14.3 และ 13.21 ตันต่อไร่ ตามลำดับ ผลผลิตน้ำตาลสูงที่สุด 13.21 และ 1.65 ตันต่อไร่ ตามลำดับ โดยหากพบกอเป็นโรคใบขาวควรขุดกออ้อยใบขาวทิ้งออกจากแปลง จึงจะสามารถลดการเป็นโรคใบขาวลงและสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตอ้อยได้

4.2.2. การใช้พันธุ์สะอาดร่วมกับการจัดสมดุลธาตุอาหาร ในพื้นที่ที่มีโรคใบขาวระบาดน้อย ควรปลูกอ้อยโดยใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดและใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินโดยพบว่าในพื้นที่จังหวัดขอนแก่นควรใส่ปุ๋ย N-P-K+Mg+Zn โดยใส่ Zn ในรูป $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 3.8 กิโลกรัมต่อไร่ ในพื้นที่จังหวัดกาฬสินธุ์ควรใส่ปุ๋ย N-P-K+Mg+Zn โดยใส่ Zn ในรูป $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 7.6 กิโลกรัมต่อไร่ จึงจะเพียงพอสำหรับการลดความรุนแรงของโรคใบขาวได้ และพื้นที่ที่มีโรคใบขาวระบาดมาก ควรปลูกอ้อยโดยใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดและใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินโดยพบว่า ทั้งในพื้นที่จังหวัดขอนแก่นและจังหวัดกาฬสินธุ์ควรใส่ปุ๋ย N-P-K+Mg+Zn โดยใส่ Zn ในรูป $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 7.6 กิโลกรัมต่อไร่ จึงจะสามารถลดความรุนแรงของโรคใบขาวได้

4.2.3. การขยายผลเทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาว ในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคใบขาวน้อยจากแผนที่เสี่ยงต่อการระบาดของโรคขาวสามารถคัดเลือกพื้นที่เพื่อนำไปจัดทำแปลงพันธุ์สะอาดโดยนำเทคโนโลยีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่แม่นยำมาตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาวและประยุกต์วิธีการจัดทำแปลงที่มีขอบแปลงเกินระยะการบินของแมลงพาหะ โดยการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area พบว่าอ้อยที่นำมาปลูกเป็นแม่พันธุ์เป็นอ้อยสะอาดร้อยละ 84 เนื่องจากตรวจพบเชื้อรหัสสีฟ้า(มีระดับเชื้อ 0-0.5 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 52.6 และสีเขียว(มีระดับเชื้อ 0.5-1 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 31.4 ตามลำดับ และเป็นอ้อยที่ไม่ควรนำไปทำพันธุ์ร้อยละ 16 เนื่องจากตรวจพบเชื้อรหัสสีเหลือง(มีระดับเชื้อ1-10 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 15.4 และสีส้ม(มีระดับเชื้อ 10-100 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 0.3 ที่เหลือเป็นกออ้อยตาย ในอ้อยตอมีกอเป็นโรคใบขาว 2 กอคิดเป็นร้อยละ 0.85 เมื่อติดตามการถ่ายทอดเชื้อในอ้อยตอจากกอตั้งต้นที่มีเชื้อน้อยมากและกอตั้งต้นที่มีการตรวจพบเชื้อในระดับต่ำเมื่ออ้อยดังกล่าวอยู่ในแปลงปลูกอ้อยเป็นเวลา 1 ปี จากอ้อยปลูกกอตั้งต้นรหัสสีฟ้า ในอ้อยตอ 1 พบเชื้อรหัสสีฟ้าร้อยละ 4 สีเขียวร้อยละ 4 สีเหลืองร้อยละ 92 สำหรับอ้อยปลูกกอตั้งต้นรหัสสีเขียว ในอ้อยตอ 1 พบเชื้อรหัสสีเขียวร้อยละ 10 สีเหลืองร้อยละ 90 ดังนั้นแม้ว่าในอ้อยปลูกจะมีปริมาณเชื้อระดับสีฟ้าซึ่งถือว่าเป็นแปลงอ้อยที่มีสุขภาพดี เมื่อเป็นอ้อยตอ 1 ก็สามารถตรวจพบเชื้อในระดับสีเหลืองและสีส้มได้มากถึงร้อยละ 92 ขาว สำหรับการถ่ายทอดเชื้อไปยังแปลงอ้อยปลูกใหม่ โดยการใช้ท่อนพันธุ์อ้อยสะอาดจากลำที่มีผลตรวจโรครหัสสีฟ้ามีระดับเชื้อน้อยมาก (0-0.5 copy/ul in 25 ng plant DNA) และรหัสสีเขียวที่ตรวจพบเชื้อในระดับต่ำ (0.5-1 copy/ul in 25 ng plant DNA) ซึ่งเป็นระดับที่สามารถนำไปทำพันธุ์ได้ เมื่อนำไปทำพันธุ์ปลูกให้ผลวิเคราะห์เชื้อในระดับปลอดภัยต่อการเกิดโรคใบขาวเป็นรหัสสีฟ้าและสีเขียวเฉลี่ยร้อยละ 37 ให้ผลวิเคราะห์เชื้อในระดับเฝ้าระวังไม่ให้เกิดสภาวะเครียดเป็นรหัสสีเหลือง(มีระดับเชื้อ 1-10 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 49 และ ให้ผลวิเคราะห์เชื้อในระดับไม่ปลอดภัยต่อการเกิดโรคใบขาวรหัสสีส้ม(มีระดับเชื้อ 10-100 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 14 ในส่วนของการขยายผลได้นำท่อนพันธุ์อ้อยตอ 1 ไปขยายผลการจัดทำแปลงผลิตพันธุ์อ้อยสะอาดโดยการปลูกแบบวางลำในไร่เกษตรกร โดยให้เกษตรกรนำไปปลูกในพื้นที่อำเภอน้ำพองเพื่อใช้เป็นแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดของศูนย์เรียนรู้การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสินค้าเกษตรหนองหารจาง ตำบลน้ำพอง อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น ได้ติดตามแปลงเกษตรกรยังไม่พบโรคใบขาว และเกษตรกรนำไปปลูกขยายในฤดูปลูกปี 2564 ไม่พบโรคใบขาว (ภาคผนวก ภาพที่ 4.2.1 และ 4.2.2)

กรมวิชาการเกษตร

5. การกำจัดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อย

ในการศึกษาตัวแปรการเกิดโรคเพื่อจัดการควบคุมกำจัดเชื้อโรคใบขาวในระดับเนื้อเยื่อพืช ทำให้สามารถกำหนดระดับปริมาณเชื้อที่ไม่ส่งผลเสียหายต่อผลผลิตได้เป็นครั้งแรก สำหรับใช้ในการคัดกรองและควบคุมการแพร่ระบาดของโรคใบขาวทั้งระบบ ได้แนวทางในการกำจัดเชื้อที่มีปริมาณน้อยในเนื้อเยื่อ รวมทั้งแนวทางในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคที่มีประสิทธิภาพ ได้วิธีการตรวจคัดกรองโรควิธีการใหม่ ที่ใช้เทคโนโลยีแบบใหม่ เพื่อแก้ปัญหาวิธีการตรวจแบบเดิม ซึ่งจะทำให้มีหน่วยตรวจโรคมากขึ้นเพื่อการควบคุมโรคที่ทันการณ์และทั่วถึง โดยมีผลสรุป ดังต่อไปนี้

การศึกษาผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว : การแสดงอาการใบขาวในอ้อยพบว่าเกิดจากปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ความแข็งแรงของต้น และสภาพแวดล้อม จากการศึกษาผลของปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวระดับต่างๆ ในสภาพควบคุมด้วยการใช้ภาวะร้อนและแล้งในตู้ควบคุมการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ (33-39°C) ความชื้นสัมพัทธ์ (60%) ความเข้มแสง (20,000 LUX) และเวลาส่องสว่าง:มืด (14:10 ชม.) ไม่ให้น้ำระหว่างทดสอบเป็นเวลา 4 วัน แล้วทำการฟื้นต้น พบว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาตั้งแต่ 100 copy/ul ในดีเอ็นเออ้อย 25 ng สามารถชักนำอาการใบขาวในอ้อยได้ ส่วนปริมาณเชื้อ 10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng หรือน้อยกว่า ไม่แสดงอาการใบขาว ในกลุ่มต้นที่มีเชื้อน้อยกว่า 1 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng พบว่าหน่อใหม่ที่งอกมีสีเขียว ส่วนกลุ่มที่มีเชื้อระดับมากกว่า 1 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng จะให้หน่อเป็นต้นใบขาว อ้อยที่ติดเชื้อใบขาวระดับสูงพบว่ามีสภาวะเครียดออกซิเดชั่นสูง และความแตกต่างของชุดดินมีผลต่อสภาวะเครียดและปริมาณเชื้อใบขาวในอ้อย โดยพบว่ากลุ่มต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินวาริน มีปริมาณเชื้อสูงกว่ากลุ่มต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินกำแพงแสน การทดสอบในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีเชื้อใบขาวในระดับต่ำกว่า 0.5-10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng ในสภาพแวดล้อมต่างๆ 5 แหล่ง ได้แก่ ศวพ. บุรีรัมย์ แปลงเกษตรกรในอำเภอลำปลายมาศ ศวพ.สุรินทร์ ศวพ.โนนสูง และ ศวพ. ศรีษะเกษ ไม่พบอาการใบขาวในอ้อยปลูก ดังนั้นระดับปริมาณเชื้อที่ควรใช้ในการคัดกรองต้นแม่พันธุ์ควรอยู่ที่ระดับต่ำกว่า 1 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng สำหรับการขยายพันธุ์สะอาด รวมทั้งเป็นระดับที่ใช้ควบคุมการระบาดของโรคใบขาวได้ (ภาคผนวก ตารางที่ 5.1.1)

การศึกษาถึงการเพิ่มของปริมาณเชื้อใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อยทำการศึกษาใน 2 สภาวะ ได้แก่ (1) ในสภาพไร่ จากการวิเคราะห์ตัวอย่างอ้อยที่ปลูกในแปลง ศวร.ขก. ที่ไม่ได้ใส่ปัจจัยอื่นนอกจากให้น้ำในช่วงหน้าแล้ง และอ้อยแสดงภาวะเครียดจากการขาดน้ำ พบว่าเชื้อใบขาวมีการเพิ่มปริมาณสูงขึ้นภายในต้นเมื่อเข้าสู่หน้าแล้งและเพิ่มปริมาณมากขึ้นเมื่อเข้าสู่หน้าฝน โดยในช่วงเริ่มต้น (พ.ย. ถึง ธ.ค.) มีต้นที่มีเชื้อระดับปลอดภัย (สีฟ้าและสีเขียว) เป็นจำนวนร้อยละ 65 และ 72 ตามลำดับ และสีเหลืองร้อยละ 35 และ 28 ตามลำดับ ในช่วงฤดูร้อน (มี.ค.) มีปริมาณเชื้อระดับสีเหลืองเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 74 และเมื่อเข้าสู่หน้าฝนมีต้นที่มีต้นที่มีปริมาณเชื้อเข้าสู่ระดับสีส้มร้อยละ 16 ส่วนต้นที่มีเชื้อในระดับปลอดภัยลดลงเหลือเพียงร้อยละ 10 แสดงให้เห็นว่าเชื้อใบขาวมีการเพิ่มปริมาณภายในต้นตามการเจริญเติบโตของพืช ซึ่งเมื่อนำต้นระดับปริมาณเชื้อสีส้มนี้ไปปลูกขยาย จะได้เป็นต้นใบขาว (ภาคผนวก ภาพที่ 5.5.1) (2) ในสภาพการขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ผลการตรวจปริมาณเชื้อใบขาวในต้นอ่อนอ้อยที่ขยายพันธุ์ในรุ่น 1 ถึง 7 พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมามีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นตามจำนวนรุ่นที่ขยาย โดยพบว่าในรุ่นที่ 1-3 มีต้นที่มีเชื้ออยู่ในระดับรหัสสีเขียวร้อยละ 50-94 ส่วนในรุ่นการขยายที่ 4- 6 พบว่าเชื้อมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นภายในต้น โดยมีมีสัดส่วนของต้นที่มีปริมาณเชื้อในระดับสีเหลืองร้อยละ 60-94 จากการตรวจวิเคราะห์พบว่าเชื้อมีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอภายในเนื้อเยื่อทำให้ประชากรต้นอ่อนที่ได้จากการขยายเพิ่มปริมาณจากต้นแม่ มีปริมาณเชื้อภายในประชากรแปรปรวนสูง ดังนั้นในการขยายพันธุ์อ้อยปลอดเชื้อด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำเป็นต้องมีการตรวจเชื้อเพื่อคัดเลือกต้นแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อสำหรับการขยายในรุ่นต่อมาโดยเฉพาะอย่างยิ่งในรุ่นที่ 2 และไม่ควรขยายพันธุ์เกิน 3 -4 รุ่น ซึ่งพบว่าต้นที่ขยายในรุ่นที่ 5 มีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์แคระแกร็น ไม่เหมาะสมต่อการนำไปปลูกขยาย (ภาคผนวก ตารางที่ 5.7.1, ภาพที่ 5.7.1 และ 5.7.2)

โรคใบขาวอ้อยนอกจากแสดงอาการใบขาวแล้ว ยังพบว่าอาการเส้นกลางใบเหลืองเป็นอาการหนึ่งของโรคใบขาว ซึ่งถูกเข้าใจว่าเป็นการขาดธาตุอาหารและนำต้นที่มีอาการเหล่านี้ไปขยายพันธุ์ ในสภาพปลูกที่ไม่เหมาะสม จะแสดงอาการใบขาวได้ ผลจากการศึกษาอุบัติการณ์การตรวจพบเชื้อโรคใบขาวอ้อยที่มีอาการร่วมกับเส้นกลางใบเหลือง จากการสำรวจในแหล่งปลูกอ้อย 7 จังหวัด ทั้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกของไทย สามารถสำรวจและรวบรวมตัวอย่างอ้อยที่มีอาการคล้ายโรคนี้ได้ทั้งสิ้น 240 ตัวอย่าง และตัวอย่างดินจำนวนทั้ง 7 จังหวัด ผลการตรวจวิเคราะห์ดินจากแปลงที่สำรวจ พบว่า จังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี และนครสวรรค์ ระดับ pH ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียมที่สูงส่วนจังหวัดกาญจนบุรีมีปริมาณเหล็กที่ต่ำ ส่วนปริมาณธาตุอาหารในใบอ้อยของแต่ละจังหวัดอยู่ที่ระดับปกติ การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาจากตัวอย่างใบด้วยเทคนิค Nested-PCR มีตัวอย่างที่ให้ผลบวก คิดเป็นร้อยละ 95 ซึ่งส่วนใหญ่มีการติดเชื้อไฟโตพลาสมาในปริมาณที่สูง ตั้งแต่ระดับสีแดง (>1,000 copies/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม) จนถึงระดับสีเหลือง ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าทั้งหมดเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Sugarcane green grassy shoot (SCGGS), Sugarcane grassy shoot (SCGS)

และ Sugarcane white leaf (SCWL) ดังนั้นอาการเส้นกลางใบเหลืองนี้จึงเป็นอาการหนึ่งของโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งไม่ควรนำไปขยายพันธุ์ (ภาคผนวก ตารางที่ 5.8.1, ภาพที่ 5.8.1, 5.8.2)

การหาแนวทางกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อย ทำการศึกษาใน 2 แนวทาง ได้แก่ (1) การหาเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อใบขาว พบว่าเชื้อกลุ่ม Xanthomonas สาเหตุโรคใบลวก ทำให้มีต้นที่แสดงอาการใบขาวลดลง จากการปลูกเชื้อ Xanthomonas sp สาเหตุโรคใบลวก 5 ไอโซเลต ในต้นกล้าพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีการติดโรคใบขาว พบว่า isolate B และ D มีแนวโน้มของเชื้อใบขาวลดลงหรือคงตัว ซึ่งอาจนำไปพัฒนาต่อเป็นสารกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อได้ (ภาคผนวก ภาพที่ 5.2.1, ตารางที่ 5.2.1) แนวทางที่ (2) การฉายรังสีแกมม่าแบบเฉียบพลัน พบค่า LD_{50} ของระดับปริมาณรังสีในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ที่ 47 Gy โดยระดับรังสีที่ 90 Gy ขึ้นไป ต้นตายทั้งหมด และที่ 30 Gy มีการเจริญเติบโตปกติ การทดสอบในอ้อยที่ติดโรคใบขาวพบว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ฉายรังสีมีการแสดงอาการใบขาวมากกว่ากลุ่มฉายรังสี (60.8% และ 14.3% ตามลำดับ) และที่ 5 เดือนหลังปลูกพบว่ากลุ่มควบคุมมีต้นที่มีเชื้อสูงและแสดงอาการใบขาวมากกว่าในกลุ่มฉายรังสี จากการศึกษาพบว่าระดับปริมาณเชื้อในเนื้อเยื่ออาจมีผลต่อประสิทธิภาพของการใช้รังสี รังสีที่ระดับ 20-60 Gy อาจสามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีปริมาณในระดับ 1 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng หรือน้อยกว่าได้ ในขณะที่เชื้อในระดับ 1-10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 ng ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ฉายและไม่ฉายรังสี (ภาคผนวก ตารางที่ 5.3.1, 5.3.2)

วิธีการตรวจเชื้อใบขาวในปัจจุบันยังมีปัญหาความล่าช้า ความไว ความแม่นยำของวิธีการและราคาแพง ในงานวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีการใหม่ 4 วิธีการ เป็นวิธีการในการตรวจโรคใบขาว 3 วิธีการ และวิธีการในการตรวจการติดเชื้อซ้ำซ้อนอีก 1 วิธีการ การพัฒนาเทคนิคใหม่ M13-tagged two-steps-PCR เพื่อทดแทนวิธี nested-PCR ที่ใช้เวลานานและราคาสูงในการตรวจโรคใบขาว พบว่าวิธีใหม่มีความไวสูงขึ้นกว่า PCR ทั่วไปแต่น้อยกว่าวิธี nested-PCR ใช้เวลาและค่าใช้จ่ายลดลงเท่าตัว การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจยีน Immunodominant protein (IMP) สำหรับการตรวจระดับปริมาณเชื้อใบขาวด้วย qPCR เพื่อทดแทนเครื่องหมายโมเลกุลเดิมที่มีปัญหา พบว่ามีความจำเพาะต่อชนิดของเชื้อใบขาวสูง ทำให้ตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วย qPCR ได้อย่างแม่นยำยิ่งขึ้น การพัฒนาเทคนิคตรวจโรคใบขาวที่ง่ายและรวดเร็ว ด้วยเทคนิค LAMP พบว่าเป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ใช้เวลาในการตรวจเพียง 2 ชั่วโมง ประหยัด ใช้เครื่องมือจำนวนน้อย และง่ายต่อการปฏิบัติ สามารถนำไปใช้ในการตรวจโรคใบขาวได้ในห้องปฏิบัติทั่วไป (ภาคผนวก ตารางที่ 5.4.1, ภาพที่ 5.4.1, 5.4.2, 5.4.3, 5.4.4) ในตัวอย่างอ้อยที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียอื่นซ้ำซ้อนบางชนิดพบว่ารบกวนผลการตรวจหาเชื้อโรคใบขาว ทำให้แปลผลผิดหรือไม่สามารถอ่านผลได้ การตรวจแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีดั้งเดิมใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 14 วัน การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแบบใหม่ด้วยเทคนิค High-Resolution Melting (HRM) พบว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจจำแนกชนิดของเชื้อที่ซ้ำซ้อนอยู่กับโรคใบขาวได้อย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 วัน ผลการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลจากยีน 16S-23S rDNA (p210/p1370) พบว่าสามารถตรวจเชื้อและจำแนกเชื้อจากตัวอย่างอ้อยได้อย่างน้อย 8 ชนิด สามารถตรวจวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างต่อครั้ง โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียต่ำที่สุดที่สามารถตรวจสอบได้คือ 0.1% ทำให้สามารถวิเคราะห์ผลตัวอย่างอ้อยที่มีการติดเชื้อซ้ำซ้อนได้ง่ายและรวดเร็ว (ภาคผนวก ภาพที่ 5.6.1, 5.6.2, 5.6.3)

กรมวิชาการเกษตร

3.2 ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง (Output)

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
1. องค์ความรู้	2	เรื่อง	**1. องค์ความรู้**	2	เรื่อง	1. การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อในอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการศึกษาถ่ายทอดเชื้อในอ้อยตอ 2. การพัฒนาวิธีการตรวจโรคใบขาวแบบใหม่ด้วยเทคนิค LAMP, M13-tagged two-steps PCR, multiplex PCR, IMP และ เทคนิคการตรวจเชื้อแบคทีเรียในอ้อยด้วย HRM	1. ได้เทคโนโลยีการกำจัดโรคใบขาวในระดับเนื้อเยื่อ 2. ได้วิธีการตรวจโรคใบขาววิธีการใหม่ที่รวดเร็วและมีความแม่นยำ
2. ต้นแบบเทคโนโลยี			**2. ต้นแบบเทคโนโลยี**				
2.1 ระดับห้องปฏิบัติการ	1	ต้นแบบ	2.1 ระดับห้องปฏิบัติการ	1	ต้นแบบ	วิธีการจำแนกชนิดของเชื้อโรคในอ้อยด้วยเทคนิค HRM	3.ระดับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่สามารถทำให้แสดงอาการใบขาวได้ (Tolerance threshold) สำหรับนำไปใช้ในการคัดเลือกแปลงแม่พันธุ์เพื่อขยายพันธุ์ 4. ได้เทคโนโลยีในการลดการแพร่ระบาดและความรุนแรงของโรคใบขาวในสภาพไร่
2.2 ระดับภาคสนาม	3	ต้นแบบ	2.2 ระดับภาคสนาม	3	ต้นแบบ	1.การพัฒนาเทคนิคการตรวจโรคใบขาวด้วยวิธี M13 tagged two-steps PCR, 2.การจำแนกชนิดของเชื้อใบขาวด้วย multiplex PCR 3.การตรวจโรคใบขาวอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค LAMP	
4. กระบวนการใหม่			**4. กระบวนการใหม่**				
4.1 ระดับห้องปฏิบัติการ	2	กระบวนการ	4.1 ระดับห้องปฏิบัติการ	4	กระบวนการ	1. การกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อส่งกรมวิชาการเกษตร ปี 2562 2. การตรวจโรคใบขาวด้วยเทคนิคใหม่ M13 tagged two-steps PCR 3.การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อในอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 4. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอ้อยด้วยเทคนิค HRM	5. ได้เทคนิควิธีการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคที่มีคุณภาพ 6. ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา - วิธี HRM มีประสิทธิภาพในการจำแนกเชื้อสูงสามารถจำแนกได้หลายเชื้อ - วิธี Multiplex มีความไว และมีความจำเพาะในการตรวจ มีต้นทุนการตรวจต่ำ - วิธี Lamp มีความไวในการวิเคราะห์มาก ต้นทุนต่ำ ทั้งสามวิธีมีข้อดีกว่า Nested PCR ที่ตรวจในปัจจุบันคือ ใช้ระยะเวลาน้อยกว่าและมีต้นทุนต่ำกว่า

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
5. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับชาติ			**5. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับชาติ**				
5.1 นำเสนอแบบปากเปล่า	1	เรื่อง	5.1 นำเสนอแบบปากเปล่า	1	เรื่อง	1. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยยีน Immunodominant membrane protein (Imp) ในประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 22 จัดที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทางออนไลน์ วันที่ 25 มกราคม 2564	
5.2 นำเสนอแบบโปสเตอร์	4	เรื่อง	5.2 นำเสนอแบบโปสเตอร์	4	เรื่อง	1. รหัสลับ...รหัสสีบ่งชี้ระดับโรคใบขาวอ้อย ในงาน SIMA Asean Thailand 2017 ระหว่าง 7-9 กันยายน 2560 ที่ อิมแพค เมืองทองธานี จัดโดย กรมวิชาการเกษตร ร่วมกับบริษัท อิมแพ็ค เอ็กซิบิชั่น เมเนจเม้นท์ จำกัด 2. โรคใบขาวอ้อยนำเสนอผลงานวิจัยและแสดงนิทรรศการ ในงานประชุมอ้อยและน้ำตาลแห่งชาติ ประจำปี 2561 ระหว่างวันที่ 21-23 สิงหาคม 2561 ณ จังหวัดขอนแก่น 3. Detection and Identification of sugarcane expressing yellow leaf midrib symptoms in Sra Kaew province ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The International Sugar and Sugarcane Conference วันที่ 31 กรกฎาคม – 2 สิงหาคม 2562 ณ โรงแรม ดุสิตธานี พัทยา ชลบุรี จัดโดย สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย 4. นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน ใน การจัดงานแถลงผลงานด้านการวิจัยพัฒนาและประกาศเกียรติคุณผู้เกษียณอายุราชการ กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2564 วันที่ 29-30 กันยายน 2564	
6. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับนานาชาติ			**6. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนาระดับนานาชาติ**				
6.1 นำเสนอแบบปากเปล่า	-	เรื่อง	6.1 นำเสนอแบบปากเปล่า	4	เรื่อง	1. Sugarcane white leaf disease in Asia ใน การประชุมกลุ่มพันธมิตรน้ำตาลอาเซียนครั้งที่ 3 วันที่ 12-14 เม.ย. 2561 ณ เมืองพัทยา จัดโดยสมาคมโรงงานน้ำตาล TSMC 2. Detection techniques on sugarcane white leaf disease ใน “Second International Workshop	

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
						on Network development and Information Sharing for the Management of Sugarcane White Leaf Disease in Asia" ระหว่างวันที่ 19-20 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 3. Sugarcane White Leaf Disease and the Sustainable Disease Management ในงานประชุมนานาชาติ 4th Meeting of ASEAN Sugar Alliance 1 ในระหว่างวันที่ 17-18 มิถุนายน 2562 ณ เมือง Ho Chi Minh City, Vietnam จัดโดยสมาคมโรงงานน้ำตาล TSMC 4. A new efficient and rapid method for detection of the phytoplasma associated with sugarcane disease based on groEL gene and the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The International Sugar and Sugarcane Conference วันที่ 31 กรกฎาคม – 2 สิงหาคม 2562 ณ โรงแรม ดุสิตธานี พัทยา ชลบุรี จัดโดยสมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย	
7. การพัฒนากำลังคน นักวิจัยภาคเอกชน	2	คน	**7. การพัฒนากำลังคน** นักวิจัยภาคเอกชน	3	คน	การพัฒนากำลังคน นักวิจัยภาคเอกชน ได้แก่ 1. ดร.สุภาพร แก้วนุ่ม ผู้จัดการฝ่ายวิจัยและพัฒนา บริษัท ES วิจัยและพัฒนาจำกัด ในเครือโรงงานน้ำตาลภาคตะวันออก และคณะนักวิชาการ 2. นางสาวศิริพร รัตนภักดี ผู้จัดการส่วนวิจัยและพัฒนาวัตถุดิบ บริษัท เกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นเนลชูการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัดมหาชน (สาขา3) และคณะนักวิชาการ 3. นางสาวทิวาพร ป้องแก้ว และนางสาวศิริวรรณ โนนศรี นักวิชาการโรงงานน้ำตาลเกษตรผล	ผู้ที่ได้รับการพัฒนาสามารถนำความรู้เรื่องโรคใบขาวของอ้อยและวิธีตรวจคัดกรองโรค ไปใช้พัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์เชื้อสาเหตุโรคใบขาว และการจัดการท่อนพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาวในหน่วยงานของตนเอง

กรมวิชาการเกษตร

ผลผลิตตามคำรับรอง	จำนวน	หน่วยนับ	ผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง	จำนวน	หน่วยนับ	รายละเอียดผลผลิต (พร้อมแนบหลักฐาน)	เชิงคุณภาพ
8. ผลงานตีพิมพ์			**8. ผลงานตีพิมพ์**				
8.1 ระดับชาติ	6	เรื่อง	8.1 ระดับชาติ	6	เรื่อง	1. นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน ตีพิมพ์ใน การประชุมวิชาการพืชไร่และพืชทดแทนพลังงานประจำปี 2564 “พืชไร่ยุคใหม่ สไตล์ New Normal” วันที่ 30 –31 สิงหาคม 2564 หน้า 128-155. 2. วิธีตรวจคัดกรองโรค และแผ่นรายงานผล ใช้ประโยชน์ในการตรวจโรคใบขาวอ้อยในโครงการวิจัยปี 2559-2564 และโครงการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว 3. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยด้วยยีน Immunodominant membrane protein (Imp) ตีพิมพ์ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 49 ฉบับเพิ่มเติม 1 2564 หน้า 43 (1-2) 4. การหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมากับระดับการแสดงอาการของโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธีกราฟมาตรฐาน absolute qPCR ตีพิมพ์ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 49 ฉบับเพิ่มเติม 1 2564 หน้า 146 (1-3) 5.วิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วโดยการตรวจยีน groEL ด้วยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ตีพิมพ์ในเอกสารประกอบการประชุมมหกรรมงานวิจัยแห่งชาติ 2563 (Thailand Research Expo 2020) วันที่ 2-6 สิงหาคม 2563 เผยแพร่ทางออนไลน์เมื่อมกราคม 2564 6. การใช้เทคนิค HRM ตรวจสอบชนิดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย ดำเนินการเสร็จแล้ว อยู่ระหว่างการส่งตีพิมพ์	

กรมวิชาการเกษตร

3.3 ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง (Outcome) (ถ้ามี)

ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลลัพธ์
<u>ผลงานตีพิมพ์</u> 1- บทความเรื่อง “การตรวจโรคใบขาวอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค LAMP” ตีพิมพ์ใน เอกสารประกอบการประชุมมหกรรมงานวิจัยแห่งชาติ 2563 เผยแพร่ทางออนไลน์เมื่อมกราคม 2564 จำนวน 1 เรื่อง	2564
2. บทความเรื่อง “การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยยีน Imp” ตีพิมพ์ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 49 ฉบับเพิ่มเติม 1 2564 หน้า 43 (1-2)	2564
3. บทความเรื่อง “การหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมากับระดับการแสดงอาการของโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธีกราฟมาตรฐาน absolute qPCR ตีพิมพ์ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 49 ฉบับเพิ่มเติม 1 2564 หน้า 146 (1-3)	2564
4. นำเสนอผลงานวิจัยภาคนิทรรศการและโปสเตอร์เรื่อง “รหัสลับ...รหัสสีบ่งชี้ระดับโรคใบขาวอ้อย” ในงาน SIMA Asean Thailand 2017 ระหว่าง 7-9 ก.ย. 60 ที่ อิมแพค เมืองทองธานี จัดโดย กรมวิชาการเกษตร ร่วมกับบริษัท อิมแพ็ค เอ็กซิบิชั่น เมเนจเม้นท์ จำกัด	2560
5 นำเสนอผลงานวิจัยและแสดงนิทรรศการผลงานวิจัยเรื่อง “โรคใบขาวอ้อย” ในงานประชุมอ้อยและน้ำตาลแห่งชาติ ประจำปี 2561 ระหว่างวันที่ 21-23 ส.ค. 2561 ณ จังหวัดขอนแก่น	2561
<u>ฐานข้อมูลและแบบจำลองวิจัย</u> (Research databases and models) ข้อมูลลำดับเบสและชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอ้อยที่พบในอ้อย 8 ฐานข้อมูล ในเอกสารคู่มือการจัดการโรคใบขาวอ้อย :นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน	2564
<u>ความก้าวหน้าในวิชาชีพของบุคลากรด้านวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (Next destination)</u> ความเชี่ยวชาญด้านโรคอ้อยของไทย ได้แก่นักวิชาการเกษตร จำนวน 1 คน ได้แก่ นายวีรกรณ์ แสงไสย์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น	2565
<u>ผลิตภัณฑ์ใหม่ (New products)</u> ผลิตภัณฑ์ด้านเทคนิคและเทคโนโลยี ได้แก่ เทคโนโลยีการตรวจโรคใบขาวที่รวดเร็วและประสิทธิภาพสูง จำนวน 5 ผลิตภัณฑ์ M13 two step PCR, LAMP, IMP, HRM ในการตรวจวินิจฉัยโรคใบขาวและแบคทีเรียก่อโรคในอ้อยที่รวดเร็ว แม่นยำ	2565

*ผลลัพธ์ : ผลสำเร็จที่เกิดจากการนำผลผลิต (Output)ไปต่อยอด การเปลี่ยนรูปของผลผลิตไปสู่รูปแบบที่ใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง หรือการเคลื่อนผลผลิตไปสู่กิจกรรมที่ต่อเนื่อง ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (Change) ที่ปรากฏชัด และมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม

3.4 ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง (Impact) (ถ้ามี)

ผลกระทบที่เกิดขึ้นจริง	ปีที่เกิดผลกระทบ
ด้านเศรษฐกิจ : - ผลผลิตอ้อยเพิ่มขึ้น ไว้ตอได้นานขึ้น - ลดต้นทุนการปลูกอ้อย จากสามารถไว้ตอได้มากขึ้น เกษตรกรมีรายได้เพิ่มขึ้น - สามารถคัดเลือกแปลงแม่พันธุ์ปลอดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพจากวิธีการที่แม่นยำ	2570
ด้านสังคม : -เกษตรกรความเป็นอยู่ที่ดี มั่นคงและยั่งยืนในอาชีพปลูกอ้อย	2570
ด้านสิ่งแวดล้อม : -ลดพื้นที่ระบาดของโรคใบขาว -การปรับปรุงสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงโรคใบขาว	2570

กรมวิชาการเกษตร

* ผลกระทบ : ผลประโยชน์ที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงตามผลลัพธ์ (Results of the change) ซึ่งวัดได้อย่างชัดเจนและมีหลักฐานปรากฏชัด (Evidence-based) ทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และสิ่งแวดล้อม ทั้งที่วัดในเชิงปริมาณได้และไม่ได้ ผลกระทบอาจเป็นได้ทั้งทางบวกและทางลบ

3.5 การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

วิธีการ/กระบวนการผลักดันงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (โปรดแนบหลักฐานเชิงประจักษ์การนำผลงานไปใช้ประโยชน์)

กระบวนการการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ เช่น การถ่ายทอดเทคโนโลยี การจัด Field day โดยแนบหลักฐาน

1) การถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับเกษตรกรเรื่องลดความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ในแปลงเกษตรกร บ้านบ้านทุ่งพัฒนา ตำบลไผ่เขียว อำเภอสว่างอารมณ์ จังหวัดอุทัยธานี หลักฐาน ข่าวหนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ฉบับวันที่ 27 มกราคม 2560
2) วิดีโอถ่ายทอดเทคโนโลยี เรื่อง วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวอ้อย : เทคนิคพีซีอาร์ เผยแพร่โดยกลุ่มประชาสัมพันธ์ กรมวิชาการเกษตร ปี2559
3) แผ่นพับเรื่อง โรคใบขาวอ้อยและการป้องกันกำจัด ในงานถ่ายทอดเทคโนโลยี “ร่วมแรง ร่วมใจ ขจัดภัยโรคใบขาวอ้อย” ณ สมาคมชาวไร่อ้อยสุรนารี

ด้านนโยบาย :

สำนักงานอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรม เป็นผู้ดำเนินงานในระดับนโยบาย นำเสนอสู่กระทรวง และรัฐบาล โดยกำหนดให้การควบคุมกาแพร่ระบาดเป็นโรคติดต่อร้ายแรง และต้องมีการกำกับดูแล ควบคุม ดังนี้

1. ลงทะเบียน จัดทำข้อมูลผู้ประกอบการด้านการค้าพันธุ์อ้อย
2. จัดทำมาตรฐานแปลงพันธุ์สะอาด ตรงตามพันธุ์ โดยมีการสุ่มตรวจโรค และจัดทำมาตรฐานระดับการยอมรับเป็นแปลงพันธุ์สะอาด และพันธุ์อ้อย
3. จัดตั้งมาตรฐานและรับรองผู้ตรวจรับรองแปลงพันธุ์สะอาด
4. จัดตั้งศูนย์รับรองผลการตรวจโรคที่เป็นมาตรฐานเดียวกันทั้งระบบ
5. จัดตั้งงบประมาณเพื่อการตรวจเฝ้าระวังการแพร่ระบาดของโรค เพื่อการควบคุมและกำจัดโรคใบขาวทั้งระบบ

ด้านเศรษฐกิจ :

1. เกษตรกรในระดับรากหญ้าโดย สามารถผลผลิตอ้อยได้อย่างยั่งยืน ลดต้นทุนการผลิต
2. ผู้ประกอบการ โรงงานน้ำตาล มีผลผลิตป้อนโรงงานที่สม่ำเสมอ พอเพียงต่อกำลังการผลิต สร้างความยั่งยืนต่ออุตสาหกรรมอ้อยที่เป็นอุตสาหกรรมสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ
3. ผู้ประกอบการค้าพันธุ์อ้อย มีท่อนพันธุ์ที่มีคุณภาพเพื่อการจำหน่ายแก่เกษตรกรผู้ปลูกอ้อย

ด้านวิชาการ โดยเกษตรกรผู้ปลูกอ้อย โรงงานน้ำตาล และ นักวิจัยในหน่วยงานวิจัยด้านอ้อย

1. การฝึกอบรมแนวทางในการจัดการเพื่อผลิตท่อนพันธุ์แข็งแรงในการขยายพันธุ์ ลดต้นทุนการผลิต
2. การวิจัยต่อยอดเทคโนโลยีการผลิตอ้อยปลอดโรคใบขาวที่มีคุณภาพ
3. องค์ความรู้ในการเกิดโรคใบขาวและคำแนะนำในการขยายพันธุ์อ้อยเพื่อลดความเสี่ยงจากโรคใบขาว
4. วิธีการผลิตต้นพันธุ์อ้อยปลอดโรคจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างมีคุณภาพ
5. วิธีการตรวจคัดกรองโรคในห้องปฏิบัติที่แม่นยำ รวดเร็ว ใช้งานง่าย เพื่อลดการแพร่ระบาดและความรุนแรงของโรคอย่างมีประสิทธิภาพ ทันการณ์
6. องค์ความรู้เรื่องโรคใบขาวเพื่อความเข้าใจ และนำไปปรับใช้แก้ปัญหาในพื้นที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ
7. การต่อยอดการพัฒนาสารชีวภาพในการกำจัดเชื้อโรคใบขาวในระดับเนื้อเยื่อ

กรมวิชาการเกษตร

*** คำจำกัดความการนำใช้ประโยชน์ในแต่ละด้าน**

1. **ด้านนโยบายและสาธารณะ** การนำความรู้จากงานวิจัยไปใช้ในกระบวนการกำหนดนโยบาย อาจเป็นนโยบายระดับประเทศ ระดับภูมิภาค ระดับจังหวัด ระดับท้องถิ่นการใช้ประโยชน์ด้านนโยบายจะรวมทั้งการนำองค์ความรู้ไปสังเคราะห์เป็นนโยบายหรือทางเลือกเชิงนโยบาย (Policy options) แล้วนำนโยบายนั้นไปสู่ผู้ใช้ประโยชน์ในวงกว้างเพื่อประโยชน์ของสังคม และประชาชนทั่วไป เพื่อเพิ่มคุณภาพชีวิตของประชาชน สร้างสังคมคุณภาพ และส่งเสริมคุณภาพสิ่งแวดล้อม

2. **ด้านพาณิชย์/เศรษฐกิจ** เป็นผลงานวิจัยที่เน้นสร้างนวัตกรรม เทคโนโลยี ผลิตภัณฑ์ใหม่ หรือการพัฒนาจากสิ่งที่มีอยู่เดิม โดยเป็นการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์หรือลดการนำเข้าเทคโนโลยีจากต่างประเทศ หรือนำไปสู่การพัฒนารูปแบบธุรกิจใหม่ โดยมีเป้าหมายเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่ม เพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและบริการ

3. **ด้านสังคมและชุมชน** การนำกระบวนการ วิธีการ องค์ความรู้ การเปลี่ยนแปลงการเสริมพลัง อันเป็นผลกระทบ ที่เกิดจากการวิจัยและพัฒนาชุมชน ท้องถิ่นพื้นที่ ไปใช้ให้เกิดประโยชน์การขยายผลต่อชุมชน ท้องถิ่น หรือรวมถึงสังคมอื่น

4. **ด้านวิชาการ** เป็นผลงานตีพิมพ์ทางวิชาการ การนำองค์ความรู้จากผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในรูปแบบต่าง ๆ เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ ระดับชาติหนังสือ ตำรา บทเรียน ไปเป็นประโยชน์ด้านวิชาการ การเรียนรู้ การเรียนการสอนในวงนักวิชาการและผู้สนใจด้านวิชาการ รวมถึงการนำผลงานวิจัยไปวิจัยต่อยอดสื่อสาธารณะ การเผยแพร่ความรู้จากผลงานวิจัยที่ได้ต่อสาธารณะ ผ่านทางหนังสือพิมพ์ / วารสาร / โทรทัศน์ / วิทยุ / คู่มือ / แผ่นพับ การฝึกอบรม และสื่อสังคมออนไลน์ต่าง ๆ เป็นต้น

กรมวิชาการเกษตร

บทที่ 4 สรุปผลและอภิปรายผล

สรุปผลและอภิปรายผล

กิจกรรมที่ 1 ศึกษาปริมาณธาตุอาหารรองในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในระดับต่างๆ พบว่าปริมาณธาตุที่เหมาะสมทำให้อ้อยไม่เป็นโรคใบขาว ในท่อนพันธุ์อ้อยควรมีธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก และสังกะสีร้อยละ 0.83 0.45 1.136 0.094 0.093 0.0077 และ 0.0009 ตามลำดับ และในท่อนพันธุ์อ้อยควรมีสมดุลของธาตุไนโตรเจนและแมกนีเซียมระหว่าง 8.81-8.96 และมีสมดุลของธาตุโพแทสเซียมและฟอสฟอรัสระหว่าง 2.50-2.79 จึงจะทำให้ท่อนพันธุ์นั้นสามารถนำไปทำพันธุ์ได้

กิจกรรมที่ 2 ศึกษาการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสีเพื่อลดการแสดงอาการโรคใบขาวของท่อนพันธุ์ การแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสี ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อย คือการแช่สารละลาย $ZnSO_4$ เข้มข้น 1% ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการแช่ท่อนพันธุ์อ้อย คือการแช่ที่ระยะเวลา 15 และ 20 นาที ตามลำดับ สำหรับการแช่ท่อนพันธุ์อ้อยด้วยสารละลายเกลือสังกะสีโดยใช้ความเข้มข้นและช่วงเวลาที่เหมาะสม พบว่าท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดมีสมดุลของธาตุไนโตรเจนกับแมกนีเซียม โพแทสเซียมกับฟอสฟอรัส เหล็กกับสังกะสี 10.0 3.71 4.83 ตามลำดับ ท่อนพันธุ์จากแปลงเป็นโรคใบขาวมีสมดุลของธาตุอาหารต่ำกว่าท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดโดยมีสมดุลของธาตุอาหาร 9.1 2.3 และ 3.0 ตามลำดับ

กิจกรรมที่ 3 การจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาว ดำเนินการทดลอง 9 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ อุดรธานี สกลนคร ราชบุรี กาญจนบุรี สุพรรณบุรี อุทัยธานี และนครสวรรค์ ในแต่ละจังหวัดทำการคัดเลือกแปลงทดลองที่เป็นตัวแทนพื้นที่ปลูกอ้อยที่มีการระบาดของโรคใบขาวน้อยและปานกลางอย่างละ 1 แปลงรวมจังหวัดละ 2 แปลงๆ ละ 2 ไร่ รวม 18 แปลง 36 ไร่ ผลการดำเนินงานการจัดการธาตุอาหารเพื่อลดความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยในพื้นที่ปลูกอ้อยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ควรใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใส่ไนโตรเจนอัตรา 27 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ฟอสเฟตระหว่าง 6-9 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ใส่โพแทสระหว่าง 12-18 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ควรเพิ่มธาตุแมกนีเซียมในรูปโดโลไมท์ อัตราระหว่าง 25-75 กิโลกรัมต่อไร่ และเพิ่มธาตุสังกะสีในรูป $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 3.8 - 7.6 กิโลกรัมต่อไร่ ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ และอุดรธานี ส่วนจังหวัดสกลนครไม่จำเป็นต้องใส่ธาตุสังกะสี สำหรับพื้นที่ภาคกลางและภาคตะวันตก แนะนำให้ใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดิน โดยใส่ไนโตรเจนอัตรา 18-27 กิโลกรัมต่อไร่ ใส่ฟอสเฟตระหว่าง 3-6 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ในพื้นที่ปลูกอ้อยจังหวัดราชบุรี กาญจนบุรี อุทัยธานี และนครสวรรค์ ยกเว้นจังหวัดสุพรรณบุรีใส่ฟอสเฟตอัตราสูง 9 กิโลกรัม P_2O_5 ต่อไร่ ใส่โพแทส อัตราปานกลางถึงสูงระหว่าง 12-18 กิโลกรัม K_2O ต่อไร่ ควรเพิ่มธาตุแมกนีเซียมในรูปโดโลไมท์ อัตราระหว่าง 25-30 กิโลกรัมต่อไร่ และเพิ่มธาตุสังกะสี ในพื้นที่จังหวัดราชบุรีและกาญจนบุรี ใส่ $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 3.8 กิโลกรัมต่อไร่ ในพื้นที่จังหวัดสุพรรณบุรี และอุทัยธานีใส่ $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 7.6 กิโลกรัมต่อไร่ ส่วนจังหวัดนครสวรรค์ไม่จำเป็นต้องใส่ธาตุสังกะสี

กิจกรรมที่ 4 การจัดการโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยการระบาดโรคใบขาวอ้อย เทคโนโลยีการป้องกันกำจัดโรคใบขาวในพื้นที่เสี่ยงภัยต่อการเป็นโรคใบขาว ได้แก่ การปลูกพืชหมุนเวียนตัดวงจรโรคใบขาว พืชที่มีคุณสมบัติในการใช้เป็นพืชหมุนเวียนเพื่อตัดวงจรโรคใบขาว ได้แก่ การปลูกอ้อยตามถั่วลิสง และ ถั่วมะแฮะ การใช้พันธุ์สะอาดร่วมกับการจัดสมดุลธาตุอาหาร พื้นที่ที่มีโรคใบขาวระบาดในเขตจังหวัดขอนแก่นและกาฬสินธุ์ ควรปลูกอ้อยโดยใช้ท่อนพันธุ์จากแปลงอ้อยสะอาดและใส่ปุ๋ยตามค่าวิเคราะห์ดินโดยใส่ปุ๋ย N-P-K+Mg+Zn โดยใส่ Zn ในรูป $ZnSO_4.7H_2O$ อัตรา 3.8-7.6 กิโลกรัมต่อไร่ จึงจะเพียงพอสำหรับการลดความรุนแรงของโรคใบขาวได้ สำหรับการจัดทำแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดควรดำเนินการในพื้นที่ที่มีการระบาดของโรคใบขาวน้อยโดยนำเทคโนโลยีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่แม่นยำมาตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาว และการประยุกต์วิธีการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area ผลการดำเนินงาน ได้ปลูกอ้อยชำข้อจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 400 ต้น และปลูกอ้อย border area วิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาในใบทุกกอ นำตัวอย่างที่มีผลวิเคราะห์รหัสสีฟ้าและรหัสสีเขียวแบ่งอ้อยเป็น 2 ส่วนๆที่ 1 นำไปปลูกขยายพันธุ์แบบวางลำ ส่วนที่ 2 นำลำไปชำข้อแล้วนำอ้อยชำข้อกลับเข้าการปลูกแบบมี border area ใหม่ โดยปลูกเมื่อวันที่ 28 มีนาคม 2562 ใส่ปุ๋ย 2 ครั้งตามค่าวิเคราะห์ดิน ได้ดูแลรักษาแปลงอ้อยตอ 1 ที่ปลูกแบบมี border area เก็บตัวอย่างส่งวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อติดตามการติดเชื้อในอ้อยตอ จำนวน 160 ตัวอย่าง ผลการทดลองพบว่าการถ่ายทอดเชื้อโรคใบขาวไปยังอ้อยตอ 1 จากแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดฯที่ตรวจพบเชื้อโรคใบขาวรหัสสีฟ้า(มีระดับเชื้อ 0-0.5 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 52.6 และรหัสสีเขียว (มีระดับเชื้อ 0.5-1 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 31.4 ทั้งสองรหัสสีดังกล่าวมีเชื้อโรคใบขาวอยู่ในระดับปลอดภัยที่จะนำไปทำพันธุ์รวมกันร้อยละ 84 ซึ่งถือว่าเป็นแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดที่มีสุขภาพดีตามผลการตรวจคัดกรองเชื้อ

โรคใบขาว เมื่อมีการตรวจเชื้อโรคใบขาวใหม่ในรุ่นที่เป็นอ้อยตอ 1 จากรหัสสีฟ้าและสีเขียวให้ผลวิเคราะห์เชื้อในระดับปลอดภัยต่อการเกิดโรคใบขาวเป็นรหัสสีฟ้าและสีเขียวเฉลี่ยร้อยละ 9 ให้ผลวิเคราะห์เชื้อในระดับเฝ้าระวังไม่ให้เกิดสภาวะเครียดเป็นรหัสสีเหลือง (มีระดับเชื้อ1-10 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 91 ไม่พบเชื้อโรคใบขาวในระดับไม่ปลอดภัยต่อการเกิดโรคใบขาว สำหรับการถ่ายทอดเชื้อไปยังแปลงอ้อยปลูกใหม่ โดยการใช้ท่อนพันธุ์อ้อยสะอาดจากลำที่มีผลตรวจโรครหัสสีฟ้ามีระดับเชื้อน้อยมาก (0-0.5 copy/ul in 25 ng plant DNA) และรหัสสีเขียวที่ตรวจพบเชื้อในระดับต่ำ (0.5-1 copy/ul in 25 ng plant DNA) ซึ่งเป็นระดับที่สามารถนำไปทำพันธุ์ได้ เมื่อนำไปทำพันธุ์ปลูกให้ผลวิเคราะห์เชื้อในระดับปลอดภัยต่อการเกิดโรคใบขาวเป็นรหัสสีฟ้าและสีเขียวเฉลี่ยร้อยละ 37 ให้ผลวิเคราะห์เชื้อในระดับเฝ้าระวังไม่ให้เกิดสภาวะเครียดเป็นรหัสสีเหลือง(มีระดับเชื้อ1-10 copy/ul in 25 ng plant DNA) ร้อยละ 49 และ ให้ผลวิเคราะห์เชื้อในระดับไม่ปลอดภัยต่อการเกิดโรคใบขาวรหัสสีส้มร้อยละ 14 โดยสามารถขยายผลในแปลงพันธุ์อ้อยสะอาดของศูนย์เรียนรู้การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสินค้าเกษตรหนองหารจาง ตำบลน้ำพอง อำเภอน้ำพอง จังหวัดขอนแก่น จากการติดตามแปลงเกษตรกรยังไม่พบโรคใบขาว

กิจกรรมที่ 5 การกำจัดเชื้อสาเหตุโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อย

การศึกษาปริมาณเชื้อและสภาวะแวดล้อมต่อการแสดงอาการใบขาวในอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว ทำการศึกษาใน 2 วิธีการ คือ (1) การชักนำอาการใบขาวด้วยภาวะร้อนและแล้ง เพื่อศึกษาระดับปริมาณเชื้อที่สามารถชักนำอาการใบขาวได้ และ (2) การชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของหน้าดิน การทดสอบในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในปริมาณสูง ตั้งแต่ 100 copy/ul ในดีเอ็นเออ้อย 25 ng หลังการทดสอบด้วยสภาวะแล้ง และฟื้นสภาพต้นด้วยการให้น้ำ เป็นเวลา 3 วัน สามารถตรวจพบการเปลี่ยนสีของใบจากเขียวเป็นขาว แสดงให้เห็นว่าสภาวะแล้งสามารถชักนำอาการใบขาวในอ้อยที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาระดับนี้ได้ การทดสอบในต้นที่มีเชื้ออยู่ในน้อยกว่า 10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม และระดับปริมาณเชื้อที่ 10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัมหรือน้อยกว่า (รหัสสีส้มระดับ 1) พบว่าไม่สามารถชักนำอาการใบขาว พบว่าไม่แสดงอาการใบขาวหลังต้นฟื้น การทดสอบในต้นที่มีเชื้อ <0.5 copy/ul ใน DNA พืช 25 ng) ถึง <10 copy/ul ใน DNA พืช 25 ng พบว่าหน่อใหม่ที่งอกมีสีเขียวและมีเชื้อในระดับสีฟ้า (<0.5 copy/ul ใน DNA พืช 25 ng) ถึงสีเขียวระดับ 3 (<1 copy/ul ใน DNA พืช 25 ng) ผลการตรวจปริมาณเชื้อในหน่อใหม่พบว่ากลุ่มที่มีสีฟ้าและสีเขียวในระดับ 1-2 จะมีปริมาณเชื้อในหน่อใหม่ในระดับสีฟ้า ส่วนในต้นที่มีเชื้อในระดับสีเขียวระดับ 3 หน่อใหม่ที่ได้จะมีในระดับสีฟ้าและสีเหลืองระดับ 1 (1 copy/ul ใน DNA พืช 25 ng) แสดงให้เห็นว่าหน่อใหม่ของกลุ่มที่มีเชื้อสีเขียวระดับ 3 อาจมีการเพิ่มปริมาณเชื้อในรุ่นหน่อ ซึ่งจากการทดลองเพิ่มพบว่าในสีเหลืองระดับ 1 นี้ จะให้หน่อเป็นต้นใบขาว การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีในกลุ่มที่ติดเชื้อใบขาวระดับสูง พบว่า กิจกรรมเอ็นไซม์ APX, ปริมาณสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และโปรตีนรวม พบว่ามีค่าแตกต่างกันขึ้นกับกลุ่มตัวอย่างและช่วงอายุ แต่ยังขาดข้อมูลแป้งและน้ำตาลรวม ซึ่งต้องใช้ประกอบการวิเคราะห์ และต้องทำการตรวจเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่มีอาการใบขาว การทดสอบการชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของหน้าดินที่ได้จากชุดดินวารินและกำแพงแสนโดยใช้ต้นที่มีปริมาณใบขาวสูง พบว่าต้นที่มาจากลำใบขาวพัฒนาเป็นใบขาวได้ แต่ต้นใบขาวที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินกำแพงแสน มีการตายช้ากว่า ผลการตรวจปริมาณเชื้อช่วงวันที่ 67 หลังการย้ายปลูกพบว่าต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินวาริน. มีปริมาณเชื้อสูงกว่ากลุ่มต้นที่ปลูกในหน้าดินจากชุดดินกำแพงแสน แสดงให้เห็นว่าสภาวะเครียดอาจมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นได้ ในการทดสอบการชักนำอาการใบขาวด้วยความแตกต่างของดิน ได้ทำการเพาะอ้อยพันธุ์ขอนแก่น3 ที่ปลูกในแหล่งดินชนิดอื่น เพื่อทดสอบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ โดยการปลูกเปรียบเทียบในชุดดินเดิมและชุดดินวาริน ทำการปลูก 5 แหล่ง ได้แก่ ศวพ. บุรีรัมย์ แปลงเกษตรกรที่ลำปลายมาศ ศวพ.สุรินทร์ ศวพ.โนนสูง และ ศวพ. ศรีษะเกษ ผลการตรวจปริมาณเชื้อใบขาวจากใบของลำที่นำมาจากแหล่งต่างๆ นั้นพบว่ามีเชื้อใบขาวตั้งแต่ 0.5-10 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม พบว่าไม่แสดงอาการใบขาวในอ้อยปลูก

การศึกษาผลของการติดเชื้อโรคอื่นซ้ำซ้อนต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยในสภาพไร่ ในการสำรวจเชื้อสาเหตุโรคในอ้อยในสภาพไร่เพื่อการทดสอบผลของการติดเชื้อโรคอื่นซ้ำซ้อนต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยมีการทำการสำรวจทั้งสิ้นจำนวน 9 ครั้ง โดยเชื้อที่สำรวจได้ทั้งหมด 4 ชนิด เป็นเชื้อราบนใบ ซึ่งอาจไม่มีผลต่อเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งอยู่ในท่ออาหารของพืช การทดลองปลูกเชื้อราสาเหตุโรคเส้นกลางใบแดงบนใบของต้นอ้อยที่มีเชื้อไฟโตพลาสมา แม้เชื้อสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อได้แต่ไม่มีการขยายขนาด การเก็บตัวอย่างอ้อยที่มีลักษณะอาการที่พบได้แก่ ก้านใบแดง, ใบขีดแดง, ใบแถบเหลืองและกลางใบเหลือง จากการนำแบคทีเรียที่เพาะแยกเชื้อได้ มาทดสอบจำนวน 20 ไอโซเลต พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จำนวน 18 ไอโซเลต และแบคทีเรียแกรมบวก 2 ไอโซเลต ผลการทดลองปลูกเชื้อที่สำรวจได้จำนวน 20 ชนิดในต้นอ้อยที่มีเชื้อใบขาวซ้ำ 2 ครั้ง พบว่าต้นอ้อยยังไม่แสดงอาการของโรคที่เด่นชัดรุนแรง ทดสอบการปลูกเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคอ้อย 5 ไอโซเลตโดยใช้ต้นอ้อยจำนวน 72 ต้น พันธุ์ : TPJO4-768 อายุ 2 เดือน ทำการปลูกเชื้อโดยการฉีดใส่ลำต้นอ้อยบันทึกผลทุก 1 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ

เป็นระยะเวลา 1 เดือนจากนั้นนำการปลูกเชื้อซ้ำอีกสองรอบ พบว่าเชื้อทั้ง 5 isolates สามารถเพิ่มระดับความรุนแรงได้ถึงระดับ 2 และเริ่มแสดงอาการตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 หลังการปลูกเชื้อ การปลูกเชื้อในกลุ่มต้นที่มีอาการใบขาว พบว่า isolate 4 และ 5 ซึ่งเป็นกลุ่ม Xanthomonas มีต้นที่แสดงอาการใบขาวลดลง ส่วนการทดลองในกลุ่มที่ไม่แสดงอาการใบขาว หลังการปลูกเชื้อสัปดาห์ที่ 7 ไม่มีต้นแสดงอาการใบขาว การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อโรคใบขาวก่อนการปลูกเชื้อพบเชื้อใบขาวตั้งแต่ 0.5 ถึง 100,000 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม สำรวจตัวอย่างเชื้อใบลวกจากอ้อยที่ติดเชื้อในเขตจังหวัดนครสวรรค์เพาะแยกเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่ออ้อยได้จำนวน 4 isolates การวิเคราะห์การติดเชื้อซ้ำซ้อนกับโรคใบขาว การสำรวจอ้อย 20 ตัวอย่างในแปลงทดลองศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ตรวจเป็นโรคแส้ดำ ผลการตรวจวิเคราะห์พบติดเชื้อโรคใบขาวในระดับสีเหลือง (10 เซลล์/ ไมโครลิตร) จำนวน 15 ตัวอย่าง แสดงว่าเชื้อนี้ไม่มีผลต่อการติดโรคใบขาว การปลูกเชื้อ Xanthomonas sp สาเหตุโรคใบลวก 5 ไอโซเลต ในต้นกล้าพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีการติดโรคใบขาวจำนวน 60 ต้น มีปริมาณเชื้อใบขาวก่อนปลูกเชื้อพบปริมาณเชื้อตั้งแต่ <0.5- 10 copy/ul in 25 ng plant DNA ด้วยวิธีตัดใบ พบว่าเชื้อ Xanthomonas มีการเข้าทำลายมากขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า isolate A และ B มีความรุนแรงกว่าอีก 3 isolates โดยสามารถทำลายเนื้อเยื่อใบอ้อยได้ถึงระดับที่ 7 ส่วน isolate C, D และ E ทำลายได้ถึงระดับ 5 ผลการตรวจเชื้อโรคใบขาวในต้นที่ทดสอบพบว่าในกลุ่มควบคุม มีเชื้ออยู่ในระดับน้อยกว่า 10 copies/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ที่ 4 สัปดาห์หลังการปลูก ส่วนกลุ่มทดสอบที่พบว่ามีปริมาณเชื้อใบขาวเพิ่มขึ้น ได้แก่ กลุ่ม A, C และ E แต่กลุ่มที่ทดสอบกับ isolate B และ D มีแนวโน้มของเชื้อลดลงหรือคงตัว ทั้งนี้อาจเกิดจากผลของเชื้อใบลวกที่มีต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อใบขาว หรือการเกิดเชื้อซ้ำซ้อนของทั้งสองเชื้อทำให้พืชแสดงอาการใบขาวได้มากขึ้น การปลูกเชื้อแบคทีเรีย Xanthomonas sp. สาเหตุโรคใบลวก 6 ไอโซเลต บนต้นอ้อยที่มีเชื้อโรคใบขาวซ้ำ โดยคัดเลือกต้นอ้อยที่ปลูกแล้วเวลา 2 เดือน จำนวน 70 ต้น พบว่าในสัปดาห์ที่ 1 isolate B, C, และ F บางต้นแสดงความรุนแรงของเชื้ออยู่ในระดับ 5 จากผลการทดลองนี้พบว่าเชื้อกลุ่ม Xanthomonas sp. Vk0มีผลต่อการลดลงของเชื้อโรคใบขาวอ้อย อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ใช้ในการปลูกเชื้อมีจำนวนจำกัดเนื่องจากต้องใช้ท่อนพันธุ์ที่มีโรคใบขาว นอกจากนี้ในการเก็บรักษาเชื้อในกลุ่ม Xanthomonas มักพบว่าเพาะแยกได้ยาก การเพาะด้วยอาหาร PDA ทำให้เชื้อไม่เติบโต แต่มีเชื้อในกลุ่ม *Panthoea* spp. เกิดขึ้นแทนที่ ทำให้การทดลองมีความผิดพลาด การทดสอบโดยการใช้การปลูกเชื้อในห้องปฏิบัติการ การใช้เทคนิค detach leaf, leaf disc รวมถึงการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จะทำให้ได้ผลที่แม่นยำมากยิ่งขึ้น

การศึกษาผลของการฉายรังสีแกมม่าต่อการตอบสนองและการแสดงอาการโรคใบขาวในอ้อย ผลการทดสอบความไว (Survival rate) ของอ้อยพันธุ์ KK3 ที่ต่อการฉายแกมม่าแบบเฉียบพลัน โดยใช้รังสีขนาด 0, 30, 60, 90, 120 และ 150 Gy ในตัวอย่างอ้อยที่ได้จากกอที่ไม่แสดงอาการใบขาว พบค่า LD_{50}ของระดับปริมาณรังสีที่ทำให้อ้อยพันธุ์ KK3 งอกได้ 50% ของจำนวนต้นทั้งหมดได้คือที่ 47 Gy โดยระดับรังสีที่ 90 Gy ขึ้นไป ไม่มีต้นอ้อยงอกได้ ในระดับ 60 Gy มีอ้อยงอกได้ 30% แต่มีการเติบโตที่ช้าในระยะแรก และที่ 30 Gy มีการเจริญเติบโตปกติ การแสดงอาการใบขาวพบว่าเริ่มแสดงออกหลังการฉายรังสีได้ประมาณ 2 เดือน ในกลุ่ม control พบในปริมาณ 60.8% จากจำนวนต้นที่งอก กลุ่มที่ผ่านการฉายรังสีพบในปริมาณ 14.3% ผลการตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี PCR เมื่อต้นอายุประมาณ 5 เดือนหลังปลูก ในกลุ่ม control ตรวจพบเชื้อได้ในระดับสูงในระดับ 1000-10,000 เซลล์ต่อไมโครลิตรในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ในหลายตัวอย่างและมีต้นแสดงอาการใบขาวมากกว่า ในกลุ่มฉายรังสีส่วนใหญ่ตรวจพบเชื้อในระดับน้อยกว่า 10 -100 เซลล์ต่อไมโครลิตรในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม และมีจำนวนต้นที่มีอาการใบขาวน้อยกว่า ผลการตรวจการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี เมื่อต้นอายุได้ประมาณ 3 เดือนหลังงอก พบว่าสารในกลุ่มความเครียดออกซิเดชั่น ได้แก่ กิจกรรมเอ็นไซม์ ascorbate peroxidase (APX), guaicol peroxidase (GPX), hydrogen peroxide (H_2O_2) ปริมาณโปรตีนรวม ปริมาณสาร malondialdehyde (MDA) โดยรวมแล้วมีแนวโน้มไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม control และกลุ่มที่ผ่านการฉายรังสี แต่พบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกส์ คลอโรฟิลล์ โพรลีน โดยรวมแล้วมีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่ม control ผลของการฉายรังสีต่อการเกิดอาการใบขาวในอ้อยที่ได้จากการลำและกอที่แสดงอาการใบขาว ในระดับ 20, 40, 60 และ 80 เกรย์ เมื่ออายุ 3 เดือนหลังปลูก พบว่ากลุ่มที่ฉายรังสีมีต้นที่มีอาการใบขาว 18.5-64.7% ส่วนกลุ่มควบคุมมีจำนวน 24.3-80.0% และพบว่ารังสีในระดับ 80 Gy ทำให้ต้นตายทั้งหมด ผลของการฉายรังสีต่อการเกิดอาการใบขาวในอ้อยที่ได้จากลำที่มีเชื้อใบขาวสูงแต่ไม่แสดงอาการ พบว่ากลุ่มที่ฉายรังสีมีต้นที่มีอาการใบขาว 4.5-15.6% ส่วนกลุ่มควบคุมมีจำนวน 5.9-21.4% และพบว่ารังสีในระดับ 80 Gy ยังมีต้นที่สามารถงอกได้ ที่ระดับรังสี 20-40 Gy มีต้นตายน้อยกว่าระดับรังสี 60-80 Gy แสดงให้เห็นว่าอ้อยที่ติดเชื้อใบขาวในระดับสูงมีความอ่อนแอต่อการฉายรังสีมากกว่าต้นที่ติดเชื้อในระดับต่ำกว่า จากการวิเคราะห์ผลการทดสอบในอ้อยที่ได้จากลำที่มีเชื้อใบขาวสูงแต่ไม่แสดงอาการ พบว่าระดับปริมาณเชื้อในเนื้อเยื่ออาจมีผลต่อประสิทธิภาพของการใช้รังสีระดับ 20-60 Gy ในการกำจัด อาจสามารถกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีปริมาณระดับไม่สูงมากได้ ระดับรังสีตั้งแต่ 60 ขึ้นไปพบว่าต้นที่มีอาการใบขาวตายทั้งหมด แต่อ้อยที่ไม่มีอาการใบขาวยังเจริญเติบโตได้ และมีจำนวนต้นที่แสดงอาการใบขาวมากขึ้นเมื่ออายุได้ 7 เดือนหลังปลูก แสดงให้เห็นว่าการฉายรังสีน่าจะสามารถลดปริมาณเชื้อใบขาวได้ในระยะเริ่มต้นได้ การทดลองฉายรังสีระดับ 20-60 Gy ในตัวอย่างที่ได้จากลำจากกอใบขาวที่ไม่แสดงอาการโรค พบความงอกเพียง 50% ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ เกิดจากท่อนพันธุ์อ่อนแอจากโรคใบขาว ผลการตรวจปริมาณเชื้อใบขาวในตัวอย่างทั้งหมดพบเชื้อในระดับ น้อยกว่า 0.5 ถึง 100,000 เซลล์ต่อ

ไมโครลิตรในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ส่วนใหญ่มีเชื้อในระดับน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ในกลุ่มที่มีเชื้อในระดับสีส้ม (10-100 เซลล์ต่อไมโครลิตรในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม) และสีเหลืองน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม สามารถแสดงอาการใบขาวได้ใน 4 -10 เดือนต่อมา ซึ่งพบได้ทั้งในกลุ่มฉายรังสีในระดับ 20-60 Gy และกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการฉายรังสี แสดงให้เห็นว่าระดับรังสีดังกล่าว ไม่สามารถกำจัดเชื้อในระดับสีเหลืองขึ้นไปได้ หรือ มีเชื้อน้อยกว่า 10 เซลล์ต่อดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ดังนั้นในกรณีที่พืชยังแข็งแรง ไม่แสดงอาการใบขาวในระยะเริ่มต้น อาจต้องใช้รังสีที่สูงขึ้นกว่า 60 Gy ในการทดสอบหรือต้องใช้ตัวอย่างที่มีเชื้อในระดับสีเขียว (1 เซลล์ต่อดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม) หรือสีฟ้าที่ต่ำกว่า 1 เซลล์ต่อไมโครลิตรในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม หรือระดับที่น้อยกว่า

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่และวิธีการตรวจเชื้อโรคใบขาวด้วยเทคนิค M13-tagged two steps- PCR ที่แม่นยำและมีความไวสูง ในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโรคใบขาวแบบใหม่ด้วยเทคนิค M13-tagged two-steps-PCR ได้ทำการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลแบบใหม่โดยการประยุกต์เทคนิคการตรวจลำดับเบสและการใช้ Tag เป็น M13 ซึ่งทำให้ได้วิธีการใหม่ที่สามารถทดแทนวิธี nested-PCR และแก้ปัญหาของวิธีการนี้ได้ แต่เนื่องจาก M13 เป็นส่วนหนึ่งของ phage DNA จึงทำให้ได้ตำแหน่งดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ใช่เป้าหมายติดมาด้วย และในการทดสอบในตัวอย่างที่มีการติดเชื้อหลายชนิด จะตรวจพบดีเอ็นเอมากกว่า 2 ตำแหน่ง ซึ่งต้องทำการแก้ปัญหานี้ ในส่วนของการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลด้วยการใช้ยีน Imp พบว่าเป็นตำแหน่งยีนที่ยังไม่มีการรายงานมาก่อนในอ้อย ดังนั้นจึงทำให้การออกแบบไพร์เมอร์ทำได้ค่อนข้างยาก แต่ในการทดลองนี้สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการตรวจยีนนี้ในอ้อยได้สำเร็จ แต่พบปัญหาความจำเพาะของเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้ เนื่องจากตรวจพบตำแหน่งที่ไม่ใช่ดีเอ็นเอเป้าหมายเช่นกัน ซึ่งต้องพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลตำแหน่งใหม่ หรือพัฒนาสภาวะในการตรวจให้มีความเข้มสูงขึ้น เพื่อให้มีความจำเพาะมากขึ้น ในการวิจัยเบื้องต้นของการพัฒนาเทคนิค LAMP พบว่ามีศักยภาพสูงในการนำไปใช้งาน ส่วน multiplex PCR นั้น ต้องทำการตรวจความไวของวิธีการในการตรวจชนิดของเชื้อ

การใช้เทคนิค HRM ในการตรวจชนิดเชื้อแบคทีเรียที่เกิดร่วมกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เชื้อแบคทีเรียและเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย จากการสร้างกราฟ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA พบว่าสามารถจัดกลุ่มเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งระดับความเหมือนกันที่ 95-99% 2) เชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว มีระดับระดับความเหมือนกันที่ 98-99% ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมามีวิวัฒนาการมาจากแบคทีเรีย บรรพบุรุษเป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ใน คลาสเดียวกับเชื้อ *Bacillus* sp. ทำให้เชื้อทั้งสองมีความคล้ายคลึงกัน ผลการจำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์ ของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี HRM ทำให้สามารถแยกเชื้อสาเหตุโรคและเชื้ออื่นๆที่อยู่ในตัวอย่างอ้อยที่มีอาการและยังระบุชนิดของเชื้อในตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการได้อีกด้วย วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว แม่นยำ ทำได้ครั้งละจำนวนมาก

การถ่ายทอดปริมาณเชื้อโรคใบขาวในอ้อยสู่อ้อยตอและการแสดงอาการของโรคในสภาพไร่ จากการตรวจการประจายปริมาณเชื้อภายในลำอ้อยโดยการตรวจใบจากลำแม่ ก่อนนำมาข้อมาเพาะขยาย พบว่าระดับของเชื้อในข้อต่างๆ มีการกระจายที่สอดคล้องกับระดับปริมาณเชื้อจากลำแม่ ในกรณีที่เชื้อมีปริมาณที่ต่ำ การตรวจหาตำแหน่งสะสมของเชื้อทำได้ไม่ชัดเจน ต้องใช้ตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อในลำมาก จะทำให้เห็นการสะสมของเชื้อชัดเจนยิ่งขึ้น การตรวจพัฒนาการของการเพิ่มปิมาณเชื้อภายในลำอ้อยที่ปลูกในสภาพไร่ พบว่ามีการเพิ่มปริมาณขึ้นสูงขึ้นอีก 1 ระดับ โดยพบการเพิ่มปริมาณในช่วงที่มีภาวะแล้ง จากนั้นเชื้อจะมีการสะสมมากขึ้นเมื่อเข้าสู่หน้าฝน ทั้งนี้การดำเนินงานไม่สามารถติดตามต่อได้เนื่องจากแปลงทดลองที่ใช้ประสบปัญหาแล้งจัดและปลวก ทำให้ต้นอ้อยตาย จึงทำให้ไม่สามารถติดตามการเพิ่มปริมาณเชื้อในอ้อยตอรุ่นต่อไปได้

การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในเนื้อเยื่ออ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการขยายพันธุ์หลายรุ่นในอาหารสังเคราะห์ ผลการทดลองการตรวจวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ่อนอ้อยที่เพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ในรุ่นที่ 1-7 พบว่าเชื้อมีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอภายในเนื้อเยื่อทำให้ประชากรที่ได้รับการเพาะขยายปริมาณ มีความแปรปรวนปริมาณเชื้อในกลุ่มประชากรสูง ดังนั้นจำเป็นต้องมีการคัดเลือกต้นแม่พันธุ์สำหรับการขยายในรุ่นต่อมาเพื่อหลีกเลี่ยงการนำต้นที่มีปริมาณเชื้อสูงมาเพิ่มขยาย นอกจากนี้พบว่าเชื้อมีการเพิ่มปริมาณมากขึ้นในการขยายพันธุ์ในรุ่นที่มากขึ้น ดังนั้นการจำกัดจำนวนรุ่นในการขยายจึงเป็นข้อควรระวังเนื่องจากโอกาสที่จะได้ต้นปลอดเชื้อน้อยลง นอกจากนี้ในการขยายที่จำนวนรุ่นมากขึ้นพบว่าต้นที่ได้มีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ แคระแกร็น ทั้งนี้ในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเพื่อเสริมความสมบูรณ์ของต้น ดังนั้นการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณจึงไม่ควรเกินรุ่นที่ 5 เพื่อลดการเกิดความแปรปรวนของต้นรวมทั้งปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่เพิ่มขึ้น

กรมวิชาการเกษตร

ข้อเสนอแนะต่อผู้เกี่ยวข้องสำหรับการดำเนินงานในระยะต่อไป

1. การทดสอบเพื่อการพัฒนาวิธีการในการควบคุมโรคใบขาวนั้น จำเป็นต้องใช้ตัวอย่างที่มีความสม่ำเสมอ ใกล้เคียงกันมากที่สุด เพื่อให้แปลผลได้ง่าย และถูกต้อง การรวมตัวอย่างลำอ้อย โดยไม่มีการคัดแยก ไม่แนะนำ เนื่องจากเชื้อใบขาวมีการกระจายตัวที่ไม่สม่ำเสมอในลำ ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการทดสอบ อาจไม่ใช่ผลจากการทดลอง แต่เป็นสิ่งที่มีอยู่แล้วในตัวอย่าง

2. การทดสอบการแสดงอาการใบขาวในอ้อย ด้วยการใช้วิธีการต่างๆ นั้น ต้องคำนึงถึงระดับปริมาณเชื้อใบขาวและความแข็งแรงของพืช การเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อใบขาวภายในพืชนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ทั้งความแข็งแรงของพืช สภาพแวดล้อม และพันธุกรรมของพืช ดังนั้นการตรวจปริมาณเชื้อในแต่ละตัวอย่างจึงเป็นสิ่งจำเป็นอย่างยิ่ง และต้องมีตัวอย่างควบคุมที่มีจำนวนที่ยอมรับได้

3. เนื่องจากอ้อยเป็นพืชที่ซับซ้อนในการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์โรค เนื่องมักษณะเป็นกอ ลำ และใบตามลำดับข้อ ดังนั้นต้องทำการหาข้อมูลตำแหน่งที่มีความแปรปรวนน้อยที่สุด เพื่อใช้เป็นตัวแทนในการทดลองต่อไป

4. การรวมตัวอย่างเพื่อการคัดกรองโรค เป็นวิธีการที่จะทำให้การตรวจคัดกรองโรคใบขาวเป็นที่ยอมรับ และมีการใช้งานอย่างทั่วถึง แต่ทั้งนี้การรวมตัวอย่าง นำไปสู่ผลลบปลอม และแปลผลผิด ซึ่สามารถส่งผลเสียหายได้อย่างรวดเร็ว พร้อมๆ กัน ดังนั้นควรมีการวิจัยด้านนี้ เพื่อให้ลดค่าใช้จ่ายในการตรวจลงได้ ซึ่งจะทำให้สามารถควบคุมการแพร่ระบาดทั้งระบบได้

5. การขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรค เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการลดการแพร่ระบาดของโรคใบขาว แต่พบว่าวิธีการนี้สามารถทำให้โรคใบขาวแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว จากการใช้แม่พันธุ์คัดกรองไม่ทั่วถึง ดังนั้นต้องหาแนวทางในการจัดการเพื่อให้ได้ต้นแม่พันธุ์สะอาด สำหรับใช้ในการขยายพันธุ์

ปัญหาและอุปสรรคในการทำงาน

1. ภัยแล้ง ปลวก และโรคแมลง ทำให้ผลผลิต และตัวอย่างอ้อยเสียหาย ทำให้ได้ข้อมูลไม่ครบถ้วน
2. งบประมาณในการวิจัยที่ไม่เพียงพอ ทำให้ต้องลดรายละเอียดของงานลง

กรมวิชาการเกษตร

เอกสารอ้างอิง

กนกพร เมาลานนท์ ณัฐกฤต พิทักษ์ วิภาวรรณ กิติวัชระเจริญ ดุจลดา พิมรัตน์ และ สุรีรัตน์ ทองคำ. 2552. ความสูญเสียของผลผลิตอ้อยเนื่องจากโรคใบขาวอ้อย. หน้า 52. *ใน :บทคัดย่อรายงานผลงานวิจัยและพัฒนาด้านพืชและเทคโนโลยีการเกษตร การทดลองสิ้นสุด ปีงบประมาณ* 2552. กรมวิชาการเกษตร.

กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ ธงชัย ตั้งเปรมศรี ศุภกาญจน์ ล้วนมณี ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล วันทนา ตั้งเปรมศรี นิลุบล ทวีกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย และ เกษม ชูสอน. 2553. การจัดการสมดุลธาตุอาหารพืชเพื่อเพิ่มความทนทานของอ้อยที่มีต่อโรคใบขาวในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. หน้า 302-304. *ใน รายงานผลงานวิจัยศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น* ประจำปี 2553. ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กาญจนา กิระศักดิ์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ วีระพล พลรักดี นิลุบล ทวีกุล. 2554. การจัดการธาตุอาหารเพื่อฟื้นฟูอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและสภาพไร่. หน้า 182-186. *ใน : รายงานผลการวิจัย ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น* ปี 2554. ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

ชมรมสถาบันชาวไร่อ้อยภาคอีสาน . 2556. พื้นที่ที่มีการระบาดของโรคใบขาวอ้อย ปี 2554. ติดต่อส่วนตัว.

ทักษิณา ศันสยะวิชัย. 2549. รายงานการระบาดโรคใบขาว.*ใน* : *การประชุมเครือข่ายป้องกันกำจัดโรคใบขาว* วันที่ 18 กันยายน 2549 ณ ห้องประชุมศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น.

ทักษิณา ศันสยะวิชัย. 2556. การจัดการไร่อ้อย. เอกสารประกอบการบรรยายการฝึกอบรมหลักสูตร การปลูกอ้อยและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในพื้นที่ปลูกใหม่. วันที่ 16 สิงหาคม 2556 ณ ห้องประชุม ที่ว่าการอำเภอภูสิงห์ จังหวัดศรีสะเกษ.

ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์และศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล. 2558. การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธี Absolute และ Relative quantification real-time PCR. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 53 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ และ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล. 2560. การแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคอ้อยด้วยวิธี High-Resolution Melting. แหล่งที่มา: https://www.lib.ku.ac.th/kuconf/2560/KC5401020. pdf, 31 มีนาคม 2564.

นฤทัย วรสถิตย์ วีระพล พลรักดี ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล กาญจนา กิระศักดิ์ นิลุบล ทวีกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย ปรีชา กาเพ็ชร รังษี เจริญสถาพร อิสระ พุทธสิมมา สุนี ศรีสิงห์ สุพัตรา ดลโสภณ กนกพร เมาลานนท์ วิภาวรรณ กิตติวัชระเจริญ ณัฐกฤต พิทักษ์ อมรา ไตรศิริ สุพจน์ กิตติปัญญา และ ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์. 2553. การวิจัยและพัฒนาเพื่อแก้ปัญหาโรคใบขาวของอ้อย. หน้า 5051-5073. *ใน :ผลงานแผนงานฉบับสมบูรณ์ ปี 2549-2553*. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

นิลุบล ทวีกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุพัตรา ดลโสภณ นฤทัย วรสถิตย์ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และ เทวา เมาลานนท์. 2552. หยุดโรคใบขาวด้วยเทคโนโลยีการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรค. *ใน :36 ปี ผลงานวิจัยสำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3* . เอกสารประกอบการสัมมนาร่วม สำนักวิจัยและพัฒนาเขต 3-5 วันที่ 10-12 มีนาคม 2552 ณ โรงแรมขอนแก่นโฮเต็ล อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น.

นิลุบล ทวีกุล กาญจนา กิระศักดิ์ สุพัตรา ดลโสภณ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย นฤทัย วรสถิตย์ และ เพียงเพ็ญ ศรวัต. 2554. การวิจัยและพัฒนาการผลิตท่อนพันธุ์สะอาดจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อลดโรคใบขาว. *ใน* : เอกสารประกอบการประชุมเสวนาวิชาการอ้อย วิกฤติและโอกาสอ้อยไทยในเวทีโลก. วันที่ 30-31 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร.

ปรางทิพย์ อุทัยวตัร, อาภาพรรณ ภูมิกอง, สุขุมาลย สวางวารี, เยาวลักษณ์ ธีระเจตกูล, ดวงฤดี จังตระกูล และ จุรีรัตน ดาดวง. 2558. การตรวจจำแนกสายพันธุเชื้อ Human Papillomavirus ชนิดเสี่ยงสูงตอการเกิดมะเร็งปากมดลูกดวยเทคนิค High Resolution Melting Analysis. วารสารวิทยาศาสตร มข. ปที่ 42 ฉบับ ที่ 1. หน้าที่ 60-68.

ปรีชา พราหมณีย์ ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ เฉลิมพล ไหลรุ่งเรือง ชัยโรจน์ วงศ์วิวัฒนไชย ทักษิณา ศันสยะวิชัย อรรถชัย จินตเวช และ กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ. 2543. *คู่มือวินิจฉัยการขาดธาตุอาหารของอ้อย*. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัดกรุงเทพฯ . 42 หน้า.

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. *การจัดการโรคใบขาวของอ้อย*. โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ฝ่ายวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการผลิตและการบริการ. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนาจำกัด ขอนแก่น. 228 หน้า.

พรนภา คำกองแก้ว, วิทยา เจียมวุฒิศักดิ์, สุพจน์ กาเซ็ม และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2555.การตรวจและจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ปนเปื้อนจากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดหวาน. หน้า621-630. ในเรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 50, 30 มกราคม-2กุมภาพันธ์ 2555,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

ยุพา หาญบุญทรง และ ทนุธรรม บุญฉิม. 2559. พฤติกรรมการเคลื่อนที่ของเพลี้ยจักจั่นพาหะนำโรคใบขาวอ้อย. แก่นเกษตร 44 ฉบับพิเศษ 1 :2559 73-79.

ยุพา หาญบุญทรง วรรณภา ฤทธิสนธิ์ และ ชุตินันท์ ชูสาย. 2548. การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเพลี้ยจักจั่นและการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. วารสารวิจัย มข. 10(1): 13-21.

รังษี เจริญสถาพร อมรรัชฎ์ คิดใจเดียว ดารารัตน์ มณีจันทร์ และ ธรรมรัตน์ ทองมี . 2552. การกำจัดโรคใบขาวในท่อนพันธุ์อ้อย โดยใช้ความร้อน ความเย็นและสารไคโตซาน. หน้า 10. *ใน : รายงานฉบับเต็มผลการทดลองสิ้นสุดปี 2552.*

วัฒนะ วัฒนานนท์ เสาวรี ตังสกุล เมธี คำหุ่ง จำลอง กกรัมย์ สมพงษ์ ชมพูนุกูลรัตน์ สุกิจ รัตนศรีวงษ์ สุวพันธ์ รัตนะรัต และ ปรีชา เพชรประไพ. 2547. การตอบสนองต่อปุ๋ย ธาตุอาหารเสริมที่มีต่อผลผลิตมันสำปะหลังพันธุ์ระยอง 72 และเกษตรศาสตร์ 50. *วารสารวิชาการเกษตร* ปีที่ 22 ฉบับที่ 1.

วันทนีย์ อู่วาณิชย์ อนุสรณ์ กุศลวงศ์ วารี หงษ์พฤกษ์ สุรศักดิ์ เสระพันธ์ และสมเกียรติ ฐิตะฐาน. 2532. ความสัมพันธ์ของเดือนปลูก ประชากรเพลี้ยจักจั่น *Matsumaratettix hiroglyphicus* (Mat.) และการเกิดโรคใบขาวในไร่อ้อยเขต จ. ชลบุรี และ จ.ระยอง. *ใน :รายงานประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา* กรมวิชาการเกษตร.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์รังสี เจริญสถาพร ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ และกอบเกียรติ ไพศาลเจริญ. 2558. วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. ผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 69-89.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ สุรศักดิ์ แสนโคตร ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์ SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูง. 2556. ผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2555. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-15.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ สุนี ศรีสิงห์ ปิยะดา ธีรกะกุลพิสุทธิ์. 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้าบางชนิดของประเทศไทย จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region. ว. แก่นเกษตร ปีที่ 40 ฉบับพิเศษ 3 หน้า 231-240.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์ รังสี เจริญสถาพร ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ และกอบเกียรติ ไพศาลเจริญ. 2558. วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557 กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 69-89.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย และ สุนี ศรีสิงห์. 2557ก. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีบางชนิดในอ้อยที่เป็นโรคใบขาว. *ใน :รายงานไตรมาส 2 ประจำปี 2557. สถาบันวิจัยพืชไร่* กรมวิชาการเกษตร

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย และ สุนี ศรีสิงห์. 2558ก. การศึกษาประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยด้วย Cryotherapy และสารต้านจุลินทรีย์บางชนิด *ใน :รายงานเรื่องเต็ม ประจำปี 2558 สถาบันวิจัยพืชไร่* กรมวิชาการเกษตร

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย และ สุนี ศรีสิงห์. 2557.การศึกษาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วย reverse transcriptase และการหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยด้วย real time PCR. ใน : รายงานไตรมาส 2 ประจำปี 2557. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย และ สุนี ศรีสิงห์. 2557ข.การศึกษาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วย reverse transcriptase และการหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยด้วย real time PCR. ใน : รายงานไตรมาส 2 ประจำปี 2557. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ทักษิณา ศันสยะวิชัย และ สุนี ศรีสิงห์. 2558ก. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีบางชนิดในอ้อยที่เป็นโรคใบขาว. ใน : รายงานเรื่องเต็มประจำปี 2558. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และ วีรกรณ์ แสงไสย์. 2562. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่และวิธีการตรวจเชื้อโรคใบขาวด้วยเทคนิค M13-tagged two steps- PCR ที่แม่นยำและมีความไวสูง *ในรายงานความก้าวหน้าไตรมาส 2- 2562 สถาบันวิจัยพืชไร่* กรมวิชาการเกษตร

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และ วีรกรณ์ แสงไสย์. 2562. การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลใหม่และวิธีการตรวจเชื้อโรคใบขาวด้วยเทคนิค M13-tagged two steps- PCR ที่แม่นยำและมีความไวสูง ในรายงานความก้าวหน้าไตรมาส 2- 2562 สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล. 2561. องค์ความรู้ในการป้องกันกำจัดโรคใบขาวอ้อย. เอกสารประกอบการประชุมหลักสูตร “การสร้างอัจฉริยะภาพของนักวิจัยด้านอ้อย” ของสำนักงานอ้อยและน้ำตาลทราย จัดโดยคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วันที่ ๒๔ ก.พ. ๒๕๖๑ ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น

กรมวิชาการเกษตร

ศุภชัย อติชาติ นฤทัย วรสถิตย์ รพีพร ศรีสถิต และ กุศล ถมมา . 2555. การศึกษาและวิเคราะห์ความเสี่ยงและหาพื้นที่อ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพภูมิอากาศของจังหวัดต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด กรมวิชาการเกษตร 2555:

ศุภชัย อติชาติ .2558 การประเมินความเหมาะสมที่ดินและจัดทำฐานข้อมูลเชิงพื้นที่สำหรับยางพารา อ้อย และมันสำปะหลังพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน รายงานโครงการวิจัยสิ้นสุด กรมวิชาการเกษตร : 2558

ศุภชัย อติชาติ นฤทัย วรสถิตย์ รพีพร ศรีสถิต และ กุศล ถมมา . 2556. การศึกษาความแปรปรวนของช่วงฤดูฝนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แก่นเกษตร 41 ฉบับพิเศษ 1 : (2556).. 346-351.

สถาบันวิจัยพืชไร่. 2544. เอกสารวิชาการ พันธุ์อ้อย การปลูกและดูแลรักษา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 29-30 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยแลน้ำตาลทราย. 2556. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2555/56. กลุ่มสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยแลน้ำตาลทราย สำนักนโยบายอุตสาหกรรมอ้อยแลน้ำตาลทราย สำนักงานคณะกรรมการอ้อยแลน้ำตาลทราย.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยแลน้ำตาลทราย. 2557. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2556/57. กลุ่มสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยแลน้ำตาลทราย สำนักนโยบายอุตสาหกรรมอ้อยแลน้ำตาลทราย สำนักงานคณะกรรมการอ้อยแลน้ำตาลทราย.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2563. รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 25562/63. แหล่งที่มา: http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-9193.pdf, 31 มีนาคม 2564.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. 2564. รายงานสถานการณ์การปลูกอ้อย ปีการผลิต 2562/63. 78 หน้า.

สุนี ศรีสิงห์ 2552**.** การทดสอบฤดูปลูกเพื่อเหลีกเลี่ยงโรคใบขาวในเขตภาคตะวันตก. *ใน : รายงานความก้าวหน้าไตรมาส 3* วันที่ 30 กรกฎาคม 2552 ณ สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร.(สไลด์ Powerpoint)

สุภาพร คงกลิ่น. 2552. ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท ศูนย์การพิมพ์เพชรรุ่ง จำกัด. นนทบุรี. 115 น.

อนุสรณ์ กุศลวงศ์. 2534. โครงการป้องกันกำจัดโรคใบขาวของอ้อย จ.อุดรธานี เอกสารรายงานผลงาน โครงการวิจัยเพื่อป้องกันกำจัดโรคใบขาวในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. 34 หน้า.

อนุสรณ์ กุศลวงศ์. 2536. แนวทางการควบคุมโรคใบขาวในอ้อย หน้า 144 - 158.ใน : เอกสารเผยแพร่วิชาการ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

Alloway, B.J. 2008. *Zinc in soil and crop nutrition*. IZA and IFA Brussels, Belgium and Pans, France.135 pp.

Anderson, D.L. and Bowen J.E. 1990. *Sugarcane nutrition*. Potash and phosphate institute of Canada, Foundation for Agronomic Research Atlanta Georgia USA. 39 p.

Armstrong, S.E., J.A. Mariano, and D.J. Lundin. 2010. The scope of mycoplasma contamination within the biopharmaceutical industry. Biologicals. 38(2):211-3

Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, S.A.J., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapipus, A., Campbell, J.W. and Hogenhout, S.A. 2006. Living with genome instability: adaption of phytoplasma to diverse environment of their insect and plant hosts. **Journal Bacteriology** 188: 3682-3696.

Bassereau, D. 1988. Sugarcane. *In* Martin-Prevel, P.; Gagnard, J. and Gautier, P.(eds). Plant analysis as a guide to the nutrient requirements of temperate and tropical corops. 513-525. Lavoisier Publishing, New York.

Bertaccini A, B. Duduk, S. Paltrinieri, and N. Contaldo. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. Am J Plant Sci. 5:1763–1788.

Bienert G.P, J.K. Schjoerring, and T.P. Jahn. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et BiophysicaActa* 1758:994–1003

Cai, H, W. Wei, R.E. Davies, H. Chen, and Y. Zhao. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting Opuntia species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches, broom phytoplasma group. Int J Syst Evol Microbiol. 58:1448–1457.

Calcino, D.V. 1994. *Australian Sugarcane Nutrition Manual*. BSES/SRDC, Brisbane, Australia.

Chatenet, M., C. Mazarin, J. C. Girard, E. Fermandez, D. Gargani, G. P. Rao, M. Royer, B. Lockhart, and P. Rott. 2005. Detection of Sugarcane streak mosaic virus in sugarcane from several Asian countries. Sugarcane Intl. 23: 12-15.

Chen, C.T. 1973. Insect transmission sugarcane white leaf disease by single leafhopper *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). Rep. *Taiwan Sugar Rec. Inst*. 60:25-33.

กรมวิชาการเกษตร

Chen, C.T. 1978. Vector pathogen relationships of sugarcane white leaf disease. *Taiwan Sugar J.* 25:50-54.

Chen, L.L., Chung, W.C., Linn, C.P. and Kuo, C.H. 2012. Comparative Analysis of Gene Content Evolution in Phytoplasma and Mycoplasmas. PLoS ONE 7: e34407.

Chia-Cheng, H., Shin-Yu, L., Shuan-Pei, L., Chin-Ping, C., Lang-Yao, C., Chien-Nan, L. and Yi-Ning, S. 2011. Quantitative and Quanlitative analysis of the SNRPN gene using real-time PCR with melting curve analysis. The journal of molecular diagnostics. 13(6): 609-613.

Choochai N. , N. Rungroj , N.Sawasdee, N. Sudtachat and P. Yenchitsomanus. 2013. Detection of SNP rs5896 in rothrombin gene by polymerase chain reaction and high-resolution meltinganalysis. Thai J. Genet. 6(1): 54-59.

Christensen NM, Nicolaisen M, Hansen M, Schulz A (2004). "Distribution of phytoplasmas in infected plants as revealed by real time PCR and bioimaging". Molecular Plant-Microbe Interactions. 17 (11): 1175–1184. doi:10.1094/MPMI.2004.17.11.1175. PMID 15553243

Christensen, N.M., Axelsen, K.B. Nicolaisen, M. and Schulz, A. 2005. Phytoplasma and their interactions with hosts. Trends in Plant Science 10: 526-535.

Delic, D. 2012. Polymerase Chain Reaction for Phytoplasmas Detection, Polymerase Chain Reaction, Dr Patricia Hernandez-Rodriguez (Ed.), ISBN: 978-953-51-0612-8, InTech, Available from: http://www.intechopen.com/books/polymerase-chain-reaction/polymerase-chain- reaction-for-phytoplasmas detection (สืบค้นเมื่อ 19 มิ.ย. 2560)

Doi, Y.M., K.Teranaka, K.Yora and H. Asuyama. 1967. Mycoplasma or PTL-group-like microorganism found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellow or paulownia witches' broom. Annual of the Phytopathological Society of Japan 33: 439-449. doi:10.1371/journal.pone.0034407.

Evans, H. 1965. Tissue diagnostic analyses and their interpretation in sugarcane. Proc. Int. Soc. *Sugar Cane Technol*., 12, 156-180.

Hanboonsong, Y., W. Ritthison, C. Choosai, , P. Sirithorn, 2006. Transmission of Sugarcane White Leaf Phytoplasma by Yamatotettix flavovittatus, a New Leafhopper Vector. Journal of Economic Entomology 99 (https://doi.org/10.1603/0022-0493-99.5.1531 . Submission: Received: 3 October 2005; Accepted: 1 May 2006

Hodgetts, J., N. Boonham, R. Mumford, N. Harrison and M. Dickson. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of secA and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58: 1826-1837

Howeler, R.H., O.O.Edwards and C.J. Asher. 1982. Micro- nutrient deficiencies and toxicities of cassava plants grown in nutrient solutions. 1. Critical tissue concen- trations. *Journal of Plant Nutrition* 5.1059-1076.

Ikten C, Ustun R, Catal M, Yol E, Uzun B. 2016. Multiplex Real-Time qPCR Assay for Simultaneous and Sensitive Detection of Phytoplasmas in Sesame Plants and Insect Vectors. PLoS ONE 11(5): e0155891. doi:10.1371/journal. pone.0155891 (สืบค้นเมื่อ 18 มิ.ย. 2560)

Jean, A, F. Tardy, O. Allatif, I. Grosjean, B. Blanquier, and D. Gerlier. 2017. Assessing mycoplasma contamination of cell cultures by qPCR using a set of universal primer pairs targeting a 1.5 kb fragment of 16S rRNA genes.PLoS ONE 12(2): e0172358. doi:10.1371/journal.pone.0172358

Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hoshi, A., Maejima, K., Jung, H.Y., Yamaji, Y., Namba, S. 2009. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their *in planta* expression. *FEMS Microbiol Lett*; 293 (1): 92-101. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01509.x (สืบค้นเมื่อ 20 มิ.ย. 2560)

Kesumawati, E., Kimata, T., Uemachi, T., Hosokawa, M. and Yazawa, S. 2006. Correlation of phytoplasma concentration in Hydrangea macrophylla with green-flowering stability. Scientia Horticultural 108: 74-78.

ศูนย์วิทยทรัพยากร

Kim, D.S, J.B. Kim, E.J. Goh, W.J. Kim, S.H. Kim, Y.W. Seo, C.S. Jang, and S.Y. Kang. 2011. Antioxidant response of Arabidopsis plants to gamma irradiation: Genome-wide expression profiling of the ROS scavenging and signal transduction pathways. J Plant Physiol. 1;168(16):1960-71.

Kobori, Y. 2021. Simulation of the Spread of Sugarcane White Leaf Disease Using an Individual-based Model as a Strategy for Developing Disease Management Techniques. In "FFTC-BAPHIQ-APAARI International Webinar on Monitoring and Early Warning of Plant Pest and Disease Epidemics in Response to Climate Change" organized by Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. July 27-28, 2021.

Kobori, Y., S.Ando. M.M. Thein, Y.Hanboonsong. 2015. Movement ability of vector insects of sugarcane white leaf disease. In: Annual Report 2015 (Apr.2015-Mar.2016) Japan International Research Center for Agricultural Sciences. P.50-51.

Kuske, C.R. and B.C. Kirkpatrick. 1992. Phylogenetic relationships between the western aster yellows mycoplasma like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence. Int. J. Syst. Bacteriol 42: 226-233.

Lebsky, V., A. Poghosyan, and L. Silva-Rosales. 2010. Application of scanning electron microscopy for diagnosing phytoplasmas in single and mixed (virus-phytoplasma) infection in Papaya. 21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops.

Lee I-M, K.D. Bottner-Parker, Y. Zhao, A. Bertaccini, and R.E. Davis. 2012. Differentiation and classification of phytoplasmas in the pigeon pea witches' broom group (16SrIX): an update based on multiple gene sequence analysis. Int J Syst Evol Microbiol. 62:2279–2285.

Li, M. and Midmore, D.J. 1999. Estimating the genetic relationships of chinese water chestnut (E. dulcis (Burm.f.) Hensch) cultivated in Australia, using RAPD. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 74(2):224-231.

Lin, S.C. and C.S. Lee. 1968. Studies on sugarcane white leaf disease .I .Causal organism. Rep. *Taiwan sugar Exp. Stn*., 47: 129-138.

Magarey, R.C. 2020. Sugarcane - an old plantation crop that offers new environmentally friendly possibilities. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 418 (2020) 012004. doi:10.1088/1755-1315/418/1/012004.

Marcu, D., V. Cristea and L. Daraban. 2013. Dose-dependent effects of gamma radiation on lettuce (Lactuca sativa var. capitata) seedlings. Int J Radiat Biol 89 : 219-223.

Martini, M., P. Ermacora, G.Magris, F.Ferrini, andN.Loi. 2011. Symptom expression and 'Candidatus Phytoplasmaprunorum' concentration in different Prunus species. *Bulletin of Insectology*64 (Supplement): S171-S172.

Marzachì, C., R.G. Milne and D. Bosca. 2004. Phytoplasma-plant-vector relationships. In: Research signpost recent research development in plant pathology p. 3-31.

Mehdy M.C. 1994. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. Plant Physiol. 105(2) : 467–472.

Moghaddam, S. S., J. Hawa, I. Rusli, R. Asmah, A. A. Maheran and P. Elizabeth. 2011. Effects of acute gamma irradiation on physiological traits and flavonoid accumulation of Centella asiatica. Molecules 2011, 16, 4994-5007.

Musetti R., L. Sanità Di Toppi, M. Martini, F. Ferrini, A. Loschi, M.A. Favali and R. Osler, 2005. Hydrogen peroxide localization and anti- oxidant status in the recovery of apricot plants from European Stone Fruit Yellows. European *Journal of Plant Pathology*112, 53–61.

Olarerin-George, A.O, and J.B. Hogenesch. 2015. Assessing the prevalence of mycoplasma contamination in cell culture via a survey of NCBI's RNA-seq archive. Nucleic Acids Res. ; 43(5):2535–42. Epub 2015/02/26. doi: 10.1093/nar/gkv136 PMID: 25712092 *Pathology* 42,723-729.

Petrov, V. D. and F. V. Breusegem. 2012. Hydrogen peroxide a central hub for information flow in plant cells. AoB PLANTS 2012: pls014; doi:10.1093/aobpla/pls014, available online at www.aobplants.oxfordjournals.org. phytoplasma, not by leaf yellows phytoplasma. In: *Journal of Australasian Plant*

Robinson,. L.B., and R.H. Wichelhausen. 1956. Contamination of human cell cultures by pleuropneumonia like organisms. Science. 124(3232):1147-8.

Roggiaab, C., P. Caciaglia, L. Galettoa, D. Pacificoa, F. Verattia, D. Boscoband, and C. Marzach. 2014. Flavescencedoree phytoplasma titre in field-infected Barbera and Nebbiolo grapevines. *Plant Pathology*.63, 31–41.

Sakuanrungsirikul, S., Wongwarat, T., Sansayavichai, T., Srisink, S., Taweekul, N., Warasatit, N. and Chroenstaporn. 2012. Estimation of Sugarcane White Leaf Disease Phytoplasma Concentration Using Conventional PCR Technique. The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases 2012, February 7-10, 2012, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.

Sakunrungsirikul, S.*, Wongwarat, T., Sankot, S., Kawabe, K., Kobori, Y. and Ando, S. 2013. Sugarcane white leaf and sugarcane grassy shoot diseases in Thailand and their detection methods. *Proceedings* of *International Society Sugar Cane Technology*. 28: 1-11.

Sanabria, N.M., J.C. Huang and I. A. Dubery. 2010. Self/nonself perception in plants in innate immunity and defense. Self /Nonself. 1(1): 40–54.

Schroeder, B.L.; Wood, R.A. and Meyer, J.H. 1992. Advances in leaf analysis techniques and interpretation in the South African sugar industry. Proc. Int. Soc. *Sugar Cane Technol.* 21, 123-135.

Schroeder, B.L.;R.A. Wood and J.H. Meyer. 1992. Advances in leaf analysis techniques and interpretation in the South African sugar industry. Proc. Int. Soc. *Sugar Cane Technol.* 21, 123-135.

Seyed, A.G., Amir, H.N., and Phiip, F.M. 2010. Differentiation of Micoplasma gallisepticum strains using PCR and high-resolution melting curve analysis. Microbiology. 156: 1019-1029.

Shapiro, L.R., L. Salvaudon, K. E. Mauck, H. Pulido, C.M. De Moraes, A. G. Stephenson, M. C. Mescher. 2013. Disease interactions in a shared host plant: effects of pre-existing viral infection on cucurbit plant defense responses and resistance to bacterial wilt disease. PLoS ONE 8(10): e77393. doi:10.1371/journal.pone. 0077393

Siddique, A.B.M., Guthrie, J.N. Walsh, K.B., White, D.T. and Scott, P.T. 1998. Hystopathology and within-plant distribution of the phytoplasma associated with Australian papaya dieback. Plant Dis. 82: 112-120.

Smirnoff, N. and D. Arnaud. 2019. Tansley review : Hydrogen peroxide metabolism and functionsin plants New Phytologist. 221: 1197–1214

Thongwai N. and J. Kunopakarn. 2007. Growth inhibition of Ralstonia solanacearum PT1J by antagonistic bacteria isolated from soils in the northern part of Thailand. Chiang Mai J. Sci. 2007; 34(3) : 345-354

Wei, W., Kakisawa, S., Suzuki, S., Jung, H.-Y., Nishigawa, H., Miyata, S.-I, Oshima, K., Ugaki, M., Hibi, T. Namba, S. 2004. In planta dynamic analysis of onion yellows phytoplasma using localized inoculation by insect transmission. Phytopathology 94: 244-250.

Wittwer, C.T., Reed G.H., Gundry, C.N., Vandersteen, J.G. and Pryor, R.J. 2003. High resolution genotyping by amplicon melting analysis using LC Green. Clin Chem 49:853–860.

Wongkaew P. 1999. Sugarcane white leaf disease management, Thailand Research Fund, Pimpatana Press, KhonKaen, Thailand. 228 pp.

Wongkaew, P., and J. Fletcher. 2004. Sugarcane white leaf phytoplasma in tissue culture: long-term maintenance, transmission, and oxytetracycline remission. Plant Cell Rep. 23(6):426-34.

Wongkaew, P., Y. Hanboonsong, P. Sirithon, C. Choosai, S. Boonkrong, T. Tinnangwattana, R. Kitchareonpanya and S.Damak. 1997. Differentiation of phytoplasma associated with sugarcane and gramineous weed

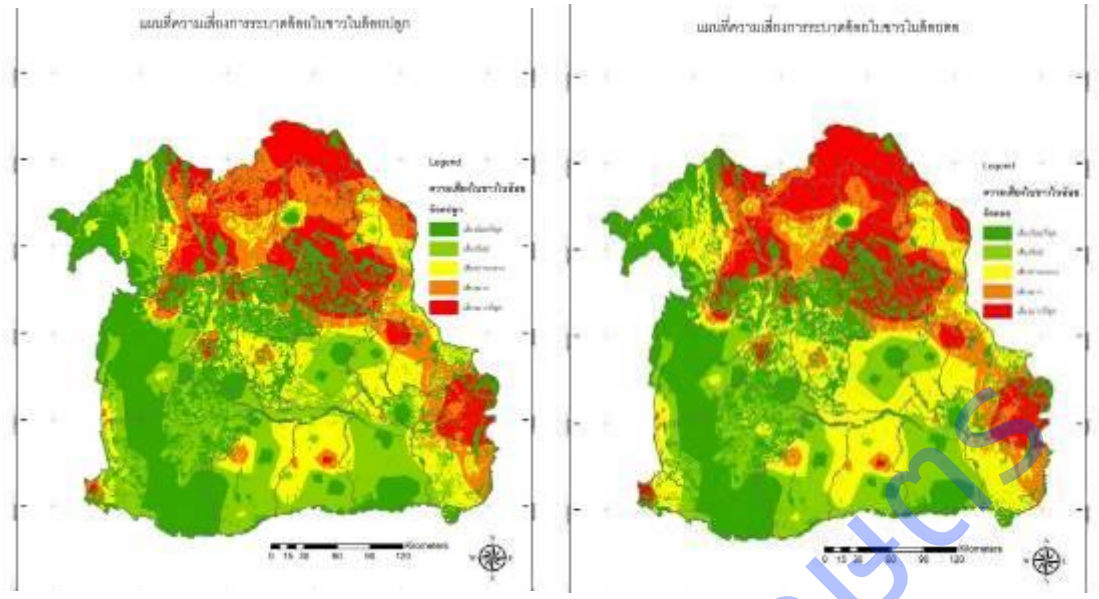
white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing. *Theo rAppl Genet*. 95:660-663.

Young, L, J. Sung, G. Stacey, and J.R. Masters. 2010. Detection ofMycoplasma in cell cultures. Nat Protoc.; 5 (5):929–34. Epub 2010/05/01. doi: 10.1038/nprot.2010.43 PMID: 20431538

Ziad. Soufi , S. Sakuanrungsirikul , T. Wongwarat ,T. Hamarn , S. Srisink , E. Komor . (2013) : Sugarcane yellow leaf symptomatic plants in Thailand are infected by white leaf phytoplasma, not by leaf yellows phytoplasma. In: *Journal of Australasian Plant Pathology* 42,723-729.

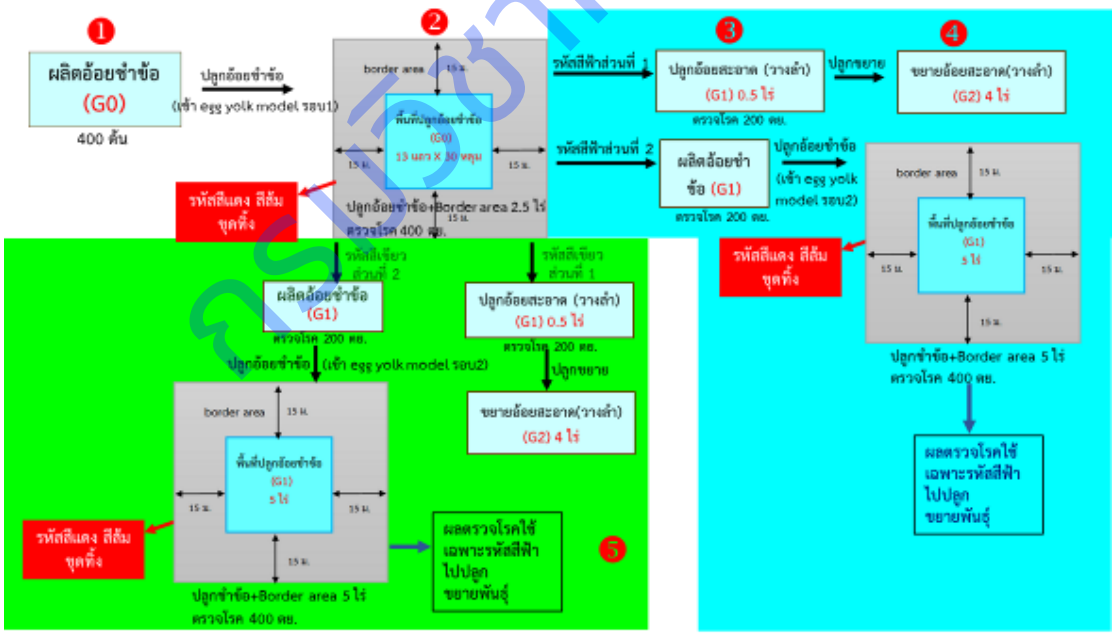
กรมวิชาการเกษตร

ภาคผนวก



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.1.1 แผนที่ความเสี่ยงในการเกิดใบขาวในอ้อยปลูก (ก) และอ้อยตอ (ข)



ภาพที่ 4.2.1 การจัดทำแปลงผลิตพันธุ์อ้อยสะอาดโดยการตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาวและการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area

ลิขสิทธิ์การเกษตร

พื้นที่ปลูกอ้อยซ้ำข้อจากอ้อยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

27	54	81	108	135	162	189	216	243	269	296	323	350
26	53	80	107	134	161	188	215	242	268	295	322	349
25	52	79	106	133	160	187	214	241	267	294	321	348
24	51	78	105	132	159	186	213	240	266	293	320	347
23	50	77	104	131	158	185	212	239	265	292	319	346
22	49	76	103	130	157	184	211	238	ใบขาว	291	318	345
21	48	75	102	129	156	183	210	237	264	290	317	344
20	47	74	101	128	155	182	209	236	263	289	316	343
19	46	73	100	127	154	181	208	235	262	288	315	* 342
18	45	72	99	126	153	180	207	234	261	287	314	341
17	44	71	98	125	152	179	206	233	260	286	313	340
16	43	70	97	124	151	178	205	232	259	285	312	339
15	42	69	96	123	150	177	204	231	258	284	311	338
14	41	68	95	122	149	176	203	230	257	283	310	337
13	40	67	94	121	148	175	202	229	256	282	309	336
12	39	66	93	120	147	174	201	228	255	281	308	335
11	38	65	92	119	146	173	200	227	254	280	307	334
10	37	64	91	118	145	172	199	226	253	279	306	333
9	36	63	90	117	144	171	198	225	252	278	305	332
8	35	62	89	116	143	170	197	224	251	277	304	331
7	34	61	88	115	142	169	196	223	250	276	303	330
6	33	60	87	114	141	168	195	222	249	275	302	329
5	32	59	86	113	140	167	194	221	248	274	301	* 328
4	31	58	85	112	139	166	193	220	247	273	300	327
3	30	57	84	111	138	165	192	219	246	272	299	326
2	29	56	83	110	137	164	191	218	245	271	298	325
1	28	55	82	109	136	163	190	217	244	270	297	324

หมายเหตุ : ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยจากการตรวจ

1 = มีเชื้อน้อยมาก (0 - 0.5 copy/ul in 25 ng plant DNA)

2 = ตรวจพบเชื้อในระดับต่ำ (0.5 - 1 copy/ul in 25 ng plant DNA)

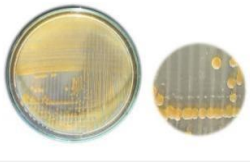
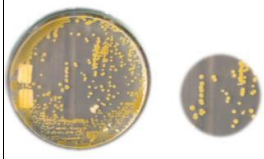
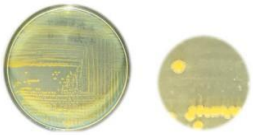
3 = มีเชื้อน้อย (1-10 copy/ul in 25 ng plant DNA)

4 = มีเชื้อระดับปานกลาง (10-100 copy/ul in 25 ng plant DNA)

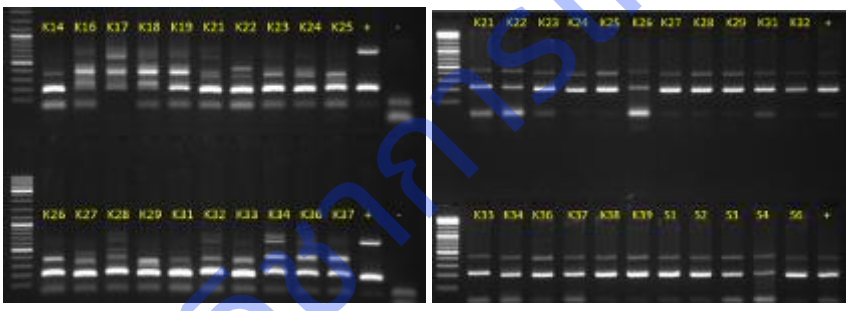
5 = มีเชื้อสูง (> 100 copy/ul in 25 ng plant DNA)

ภาพที่ 4.2.2 ปริมาณเชื้อโรคใบขาวในอ้อยปลูกแปลงผลิตพันธุ์อ้อยสะอาดโดยการตรวจคัดกรองเชื้อสาเหตุโรคใบขาวและการจัดการแปลงพันธุ์แบบมี border area

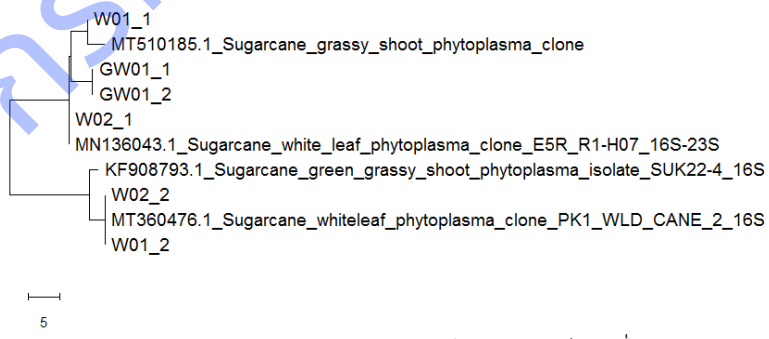
กรมวิชาการเกษตร

isolate	Colony form	isolate	Colony form
A		B	
C		D	
E			

ภาพที่ 5.2.1 Xanthomonas isolates ที่ใช้ในการปลูกเชื้อในตัวอย่างอ้อยชุดที่ 2-2561 ที่อายุ 2 เดือน

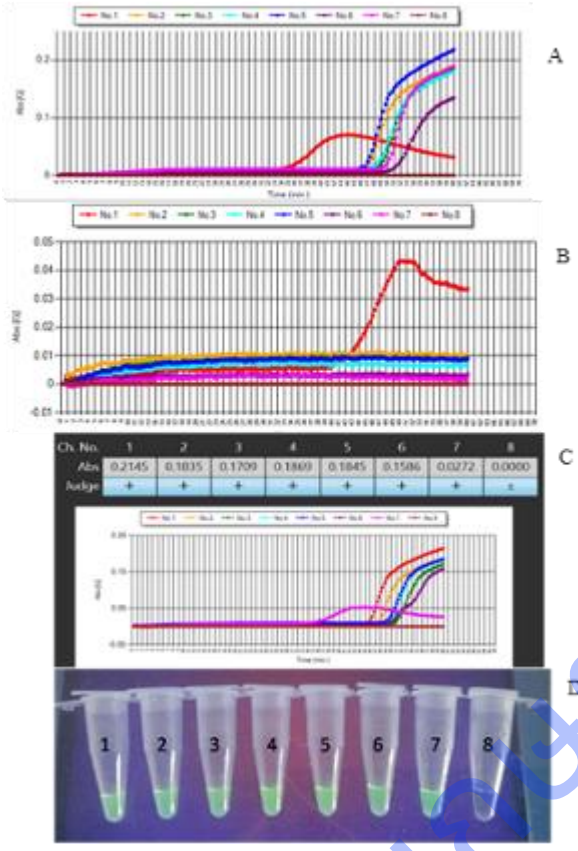


ภาพที่ 5.4.1 เปรียบเทียบความจำเพาะของวิธีการตรวจโรคใบขาวด้วย nested-PCR (ซ้าย) และ M13-tagged two steps- PCR (ขวา) ในตัวอย่างใบอ้อยที่เก็บจากแปลงทดลอง

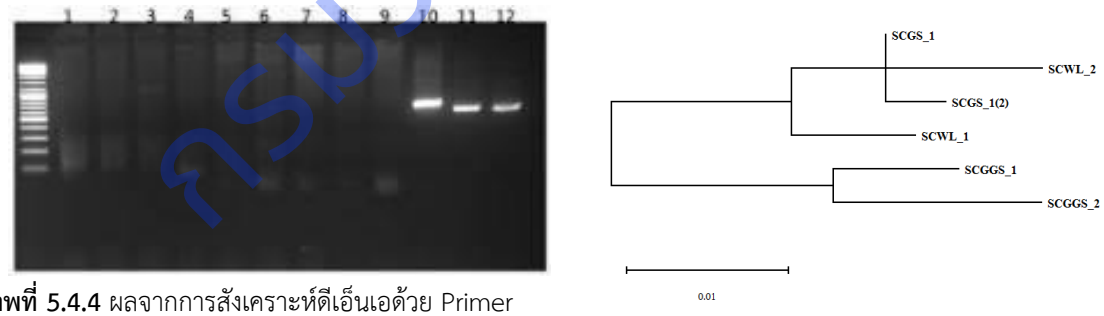


ภาพที่ 5.4.2 แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้จากวิธี M13-tagged two steps- PCR เปรียบเทียบกับข้อมูลสากลของ SCWL และ SCGS

กรมวิชาการเกษตร

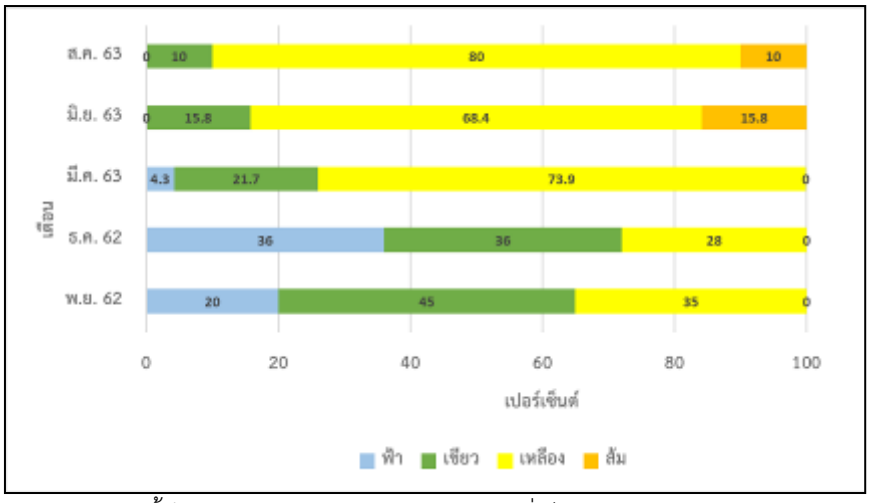


ภาพที่ 5.4.3 ผลการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค LAMP ต่อเชื้อphytoplasma genesด้วยเทคนิค LAMP (A) ดีเอ็นเอที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย (B) ดีเอ็นเอที่ไม่มีเชื้อไฟโตพลาสมา (No. 1 Positive Control มาจากชุด kit, 2-7 ดีเอ็นเอพืช No. 8 No Target control) (C) ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา ทั้ง 3 SCGGS, SCWL, SCGS (No. 1 Positive Control No.2-3 SCGGS, No.4-5 SCWL, No.6-7 SCGS, No. 8 No Target control)(C) ผลจากสัญญาณสาร Fluorescent (D) ผลจากการดูสี Fluorescent ที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา 1-7 ตัวอย่างอ้อยใบขาว 8 negative control

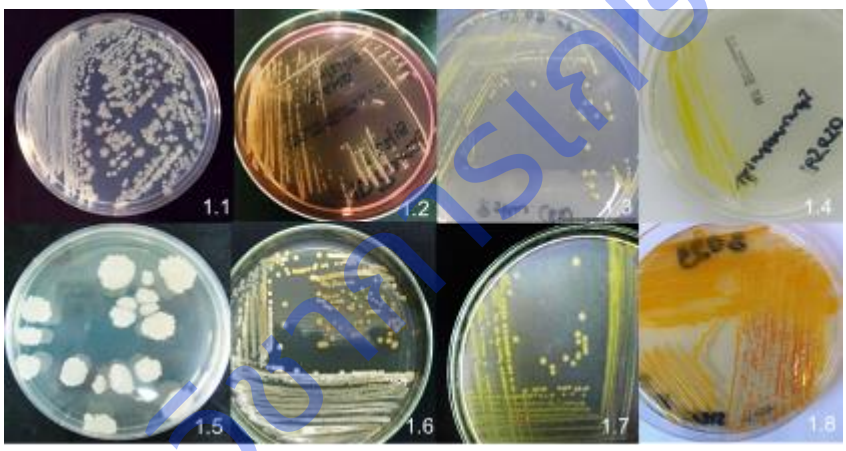


ภาพที่ 5.4.4 ผลจากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วย Primer Imp2 หมายเลข (1-5) ใบอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (6-9) ใบมันสำปะหลังที่มีอาการโรคพุ่มแจ้ (10-12) อ้อยใบขาว ใบเขียว และใบเขียวปนขาว (ซ้าย) และ Phylogeny และ ค่า Diversity ของเชื้อไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิดได้แก่ Sugarcane white leaf, sugarcane grassy shoot และ sugarcane green grassy shoot วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA X

กรมวิชาการเกษตร



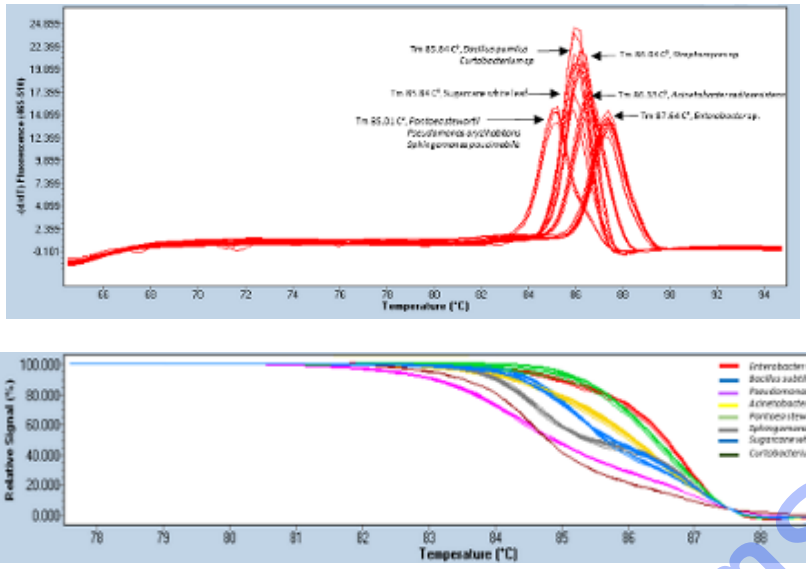
ภาพที่ 5.5.1 สัดส่วนปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในอ้อยที่เก็บตัวอย่างจากลำเดิมในระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2562 ถึง สิงหาคม 2563 จากอ้อย 25 กอตรวจด้วยวิธี nested-PCR รหัสสีระบุถึงระดับปริมาณเชื้อ สีฟ้า : <0.5 ; สีเขียว: >0.5 ; สีเหลือง : 1-10 ; สีส้ม: 10-100 copy/ul ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม



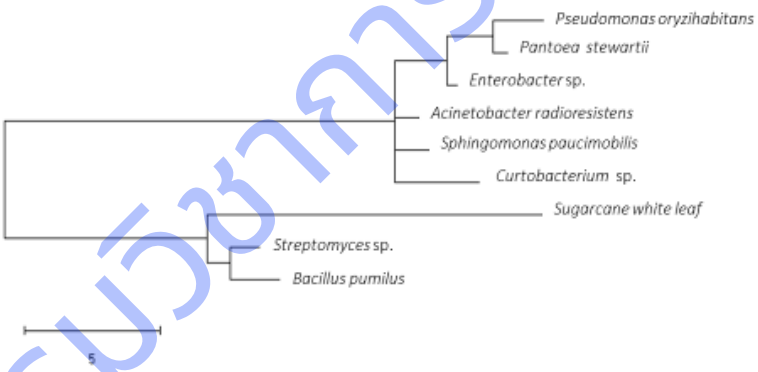
ภาพที่ 5.6.1 เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างอ้อย ได้แก่

1.1 *Enterobacter cloacae* 1.2 *Acinetobacter Radioresistens*
1.3 *Pantoea stewartii* 1.4 *Sphingomonas paucimobilis*
1.5 *Bacillus subtilis* 1.6 *Streptomyces spp.*
1.7 *Pseudomonas oryzihabitans* 1.8 *Curtobacterium* sp.

กรมวิชาการเกษตร

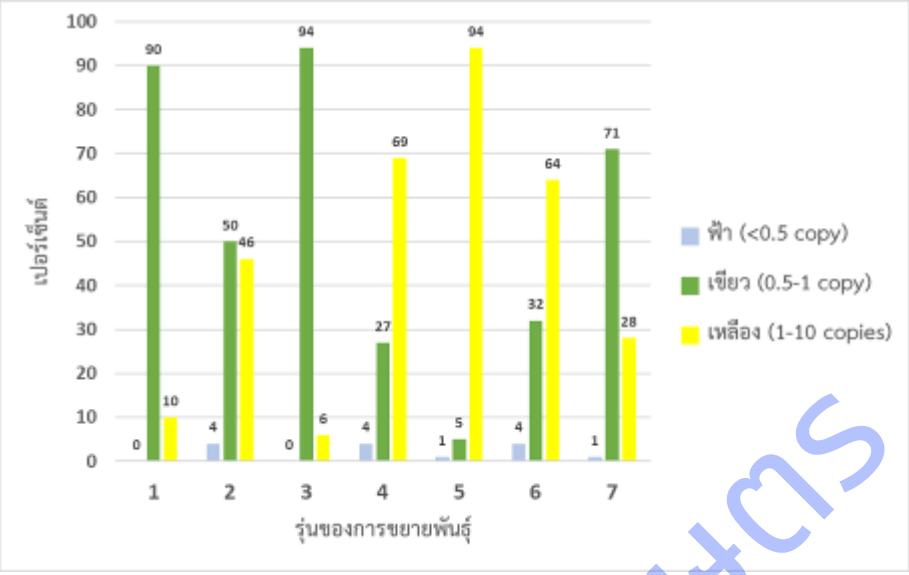


ภาพที่ 5.6.2 การวิเคราะห์ Melting curve (บน) และ Normalized curve (ล่าง) ด้วยวิธี real-time PCR บริเวณยีน 16S-23S rRNA เชื้อแบคทีเรียและเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย

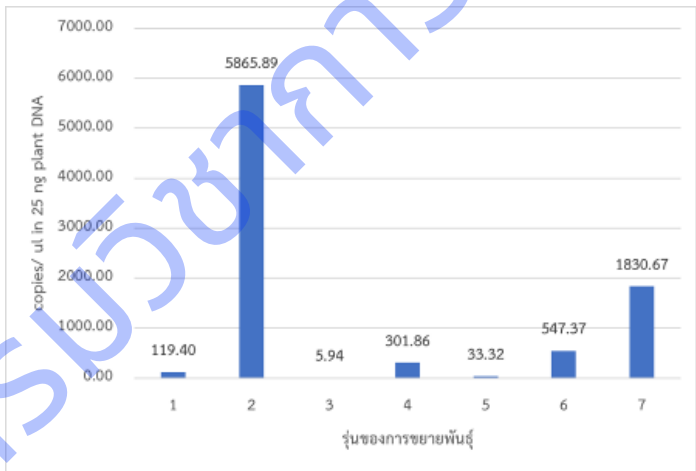


ภาพที่ 5.6.3 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยจากการใช้ฐานข้อมูลลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรีย 8 ชนิด (ภาพที่ 5.6.1)

กรมวิชาการเกษตร



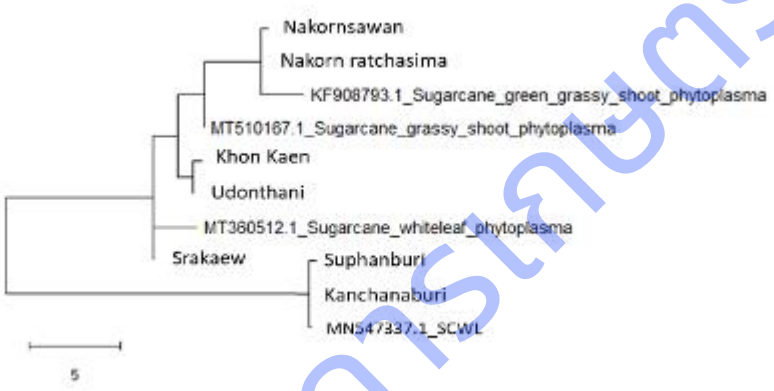
ภาพที่ 5.7.1 สัดส่วนของต้นอ่อนอ้อยที่ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแต่ละรุ่นของการขยายเพิ่มจำนวนและระดับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาภายในต้น ตรวจวิเคราะห์ยีนเป้าหมาย 16S-23S rDNA ด้วยวิธี nested-PCR



ภาพที่ 5.7.2 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในต้นอ่อนอ้อยที่ขยายเพิ่มปริมาณด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในแต่ละรุ่นของการขยายเพิ่มปริมาณ วิเคราะห์ด้วย qPCR ใช้ยีนเป้าหมาย 16S rDNA

กรมวิชาการเกษตร

ภาพที่ 5.8.1 อาการเส้นกลางใบเหลืองในอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา



ภาพที่ 5.8.2 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยของแต่ละพื้นที่

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 4.1.1 ผลการวิเคราะห์ความแม่นยำถูกต้องจากการสำรวจภาคสนาม

							Producer
						Classification	Accuracy
		1	2	3	4	5	overall	(Precision)
	1	25	7	9	0	0	41	60.98%
	2	0	0	1	0	0	1	0%
	3	0	0	2	0	0	2	100%
	4	0	0	1	1	0	2	50%
	5	0	0	0	1	0	1	0%
Truth		25	7	13	2	0	47	
User Accuracy		100%	0	15.39%	50%	nodata		
(Recall) Overall								
accuracy (OA)		59.57%						
Kappa1:		0.221						

ตารางที่ 5.1.1. ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาวิเคราะห์ด้วย 16S-23S rDNA nested-PCR และ secA gene ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ได้จากลำที่ติดเชื้อใบขาว ก่อนการทดสอบ และสีของใบในวันที่ 5 และ90 วันหลังทดสอบในสภาพแวดล้อมที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 33 °C ความชื้น 55% RH ความเข้มแสง 20,000 LUX ระยะเวลาส่องสว่าง/มืด 14/10 ชม. ไม่ให้น้ำ G : green, WG : white and green, W : white

	Phytoplasma concentration cells/ul in 25 ng plant DNA				Leaf no. / symptom 5 days post treatment					90 days post
No.	concentration	700 bp	210 bp	SecA	1	2	3	4	5	treatment
1inT1	100,000	4+	4+	4+	WG/D	WG/D	WG/WG	W/W	W/W	dry
1inT2	10,000	4+	4+	3+	WG/D	WG/D	WG/W	WG/W	W/W	dry
1inT3	100,000	4+	4+	4+	WG/D	WG/D	WG/WG	WG/W	W/W	dry
1inT4	100,000	4+	4+	4+	WG/D	WG/D	WG/W	W/W	-	dry
2inT1	10	1+	4+	3+	G/D	G/G	G/D	G/D	G/WG	dry
2inT2	10	0.5+	4+	1+	G/D	G/D	G/D	G/G	G/WG	dry
2inT3	<10	-	4+	+/-	D/D	G/D	G/G	G/G	-	dry
2inT4	<10	1+??	4+	2+	G/D	G/G	G/G	G/G	G/G	dry
3inT1	1000	3+	4+	3+	D/D	G/D	G/D	G/WG	G/WG	dry
3inT2	10	1+	4+	<0.5+	G/D	G/D	G/D	G/WG	G/WG	dry
3inT3	<10	-	4+	+/-	G/D	G/WG	G/WG	G/WG	-	dry
3inT4	100	2+	4+	3+	G/D	G/WG	G/-	-	-	dry
3inT5	1000	4+	4+	2+	G/G	G/WG	WG/W	WG/W	-/W	dry
4inT1	100,000	4+	4+	4+	G/D	G/WG	G/WG	G/WG	G/WG	dry
4inT2	10	0.5+	4+	1+	G/D	G/D	G/D	G/D	-	shoot GW
4inT3	1000	3+	4+	3+	G/WG	G/WG	G/WG	G/WG	G/WG	dry ตาย
4inT4	<10	-	4+	+/-	G/G	G/D	G/-	-	-	shoot G

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5.2.1 ปริมาณเชื้อโรคใบขาวในใบอ้อยหลังการปลูกเชื้อโรคใบลวก ตรวจด้วย nested-PCR และ secA

isolate	Isolate /ต้นที่	PCR Product			ปริมาณเชื้อ copy/ul in 25 ng plant DNA		ระดับความรุนแรงของโรคที่สัปดาห์ที่ 4**				
		Nested-PCR		SecA	ก่อนการปลูกเชื้อ*	หลังการปลูกเชื้อ 4 สัปดาห์	1	3	5	7	9
		700 bp	210 bp	275 bp							
A	A1		+/-	+/-	<10	<0.5					
	A2	-	+/-	+/-	10	<0.5					
	A3	-	+/-	+/-	>0.5	<0.5					
	A4	-	1+	+/-	>0.5	>0.5					
	A5	1+	4+	3+	<10	10					
	A6	-	4+	+/-	>0.5	<10					
	A7	-	4+	+/-	>0.5	<10					
	A8	-	2+	+/-	<10	>0.5					
	A9	0.5+	4+	1+	>0.5	10					
	A10	-	+/-	+/-	>0.5	<0.5					
B	B1	-	+/-	+/-	<10	<0.5					
	B2	-	+/-	2+	>0.5	>0.5					
	B3	-	2+	4+	<10	<10					
	B4	-	4+	4+	10	<10					
	B5	-	4+	<0.5+	>0.5	<10					
	B6	-	4+	<0.5+	>0.5	<10					
	B7	-	4+	+/-	>0.5	<10					
	B8	-	4+	+/-	>0.5	<10					
	B9	-	0.5+	+/-	>0.5	>0.5					
	B10	-	+/-	+/-	>0.5	<0.5					
C	C1	-	+/-	+/-	>0.5	<0.5					
	C2	-	2+	4+	10	>0.5					
	C3	-	+/-	2+	<10	>0.5					
	C4	-	+/-	1+	>0.5	>0.5					
	C5	0.5+	4+	4+	>0.5	10					
	C6	2+	4+	4+	<10	100					
	C7	-	4+	+/-	>0.5	<10					
	C8	-	+/-	+/-	10	<0.5					
	C9	2+	3+	2+	10	100					
	C10	2+	3+	2+	<10	100					
D	D1	-	+/-	0.5+	>0.5	<0.5					
	D2	-	+/-	1+	>0.5	<0.5					
	D3	-	+/-	1+	<0.5	<0.5					
	D4	-	4+	4+	>0.5	<10					
	D5	-	+/-	?	>0.5	<0.5					
	D6	-	4+	<0.5+	>0.5	<10					
	D7	-	4+	<0.5+	>0.5	<10					
	D8	-	1+	<0.5+	10	>0.5					
	D9	-	4+	<0.5+	>0.5	<10					
	D10	-	4+	+/-	>0.5	<10					
E	E1	-	2+	1+?	10	>0.5					
	E2	-	+/-	0.5+	>0.5	>0.5					
	E3	-	2+	4+	>0.5	>0.5					
	E4	-	4+	2+	100	<10					
	E5	2+	4+	4+	<10	100					
	E6	-	1+?	?	<10	>0.5					
	E7	1+	4+	4+	<10	10					
	E8	-	+/-	+/-	>0.5	<0.5					
	E9	-	4+	+/-	>0.5	<10					
	E10	2+	2+	2+	>0.5	100					
control	W1	?	2+	4+	10	100?					
	W2	-	+/-	+/-	>0.5	<0.5					

กรมวิชาการเกษตร

	W3	-	+/-	+/-	>0.5	<0.5					
	W4	-	4+	1+	>0.5	<10					
	W5	-	4+	2+	>0.5	<10					
	W6	-	3+	+/-	>0.5	1					
	W7	-	4+	+/-	>0.5	<10					
	W8	-	4+	+/-	>0.5	<10					
	W9	-	4+	0.5+	>0.5	<10					
	W10	-	<0.5+	+/-	>0.5	<0.5					
positive	ใบขาว	++++	+	+							

*** ข้อมูลจาก**ตารางที่ 5.2.15 ****ข้อมูลจากตารางที่ 5.2.16**

ตารางที่ 5.3.1 อัตราการงอกและการเกิดอาการใบขาวในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่ผ่านการฉายรังสีแกมม่าแบบเฉียบพลันที่ระดับ 0-150 Gy ที่อายุ 2 เดือนหลังปลูก

Radiation dose (Gy)	No. of plant	Germinated seedlings (%)*	Asymptomatic plants (%)**	White leaf plants (%)**	N.B. Plant appearance
0	70	51 (72.8%)	21 (41.2%)	30 (60.8%)	
30	70	35 (50.0%)	30 (85.7%)	5 (14.3%)	normal growth
60	70	21 (30.0%)	21 (100%)	0 (0%)	Short and small
90	70	0	0	0	
120	70	0	0	0	
150	70	0	0	0	

* calculated from total plants tested ** calculated from germinated seedlings

ตารางที่ 5.3.2 เปอร์เซ็นต์ต้นอ่อนอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่มีอาการใบขาวหลังผ่านการฉายรังสีแกมม่าแบบเฉียบพลันที่ระดับ 20-80 Gy

Radiation	control			Irradiation		
dose	Total plant	symptomatic	%	Total plant	symptomatic	%
20 Gy	95	14	14.7	98	9	9.2
40 Gy	84	18	21.4	90	14	15.6
60 Gy	86	16	18.6	77	8	10.4
80 Gy	85	5	5.9	22	1	4.5

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5.4.1 ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สามารถตรวจด้วยเทคนิค LAMP และ Nested PCR ใช้พลาสมิด pUC1318 ที่มีชิ้นยีนขนาด 700 คู่เบสของ 16S-23S rDNA ในการทดสอบ copy number

DNA serial dilution	LAMP (DNA)	Nested PCR (DNA)		Nested PCR pUC1318		pUC1318 (copy/µl)
		700 bp	210 bp	700 bp	210 bp	
10^{0}	+	+	+	+	+	$4.09x10^{9}$
10^{-1}	NT	+	+	+	+	$9.75X10^{8}$
10^{-2}	+	+	+	+	+	$9.75X10^{7}$
10^{-3}	NT	+	+	+	+	$8.90X10^{6}$
10^{-4}	+	+	+	+	+	$7.46X10^{5}$
10^{-5}	NT	+	+	+	+	$6.22X10^{4}$
10^{-6}	+	+	+	+	+	$1.68X10^{3}$
10^{-7}	+	+	+	+	+	$2.66X10^{2}$
10^{-8}	+	-	+	-	+	$4.11X10^{1}$
10^{-9}	NT	-	+	-	+	$9.55X10^{0}$
10^{-10}	+	-	+	-	+	$1.27X10^{-1}$

NT: not tested + : positive - : negative

ตารางที่ 5.7.1 ค่าเฉลี่ยปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ในอ้อยขยายพันธุ์รุ่นที่ 1-7 ที่ขยายเพิ่มปริมาณด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ตรวจวิเคราะห์ยีนเป้าหมาย 16S-23S rDNA ด้วยวิธี qPCR

รุ่นที่	1	2	3	4	5	6	7
UT1	0.0	0.3	0.3	0.0	139.8	507.0	1.0
UT2	0.0	540.0	0.0	0.0	1.3	415.7	26.4
UT3	0.0	0.0	0.2	0.0	5.1	828.2	3281.0
UT4	0.0	249.2	0.2	47.0	0.0	0.0	11237.5
UT5	0.0	310.0	0.0	30.2	20.8	514.9	367.0
UT6	0.0	9652.1	0.0	142.6	59.1	279.0	72.9
UT7	0.0	1378.3	22.1	627.8	95.1	2004.5	5.4
UT8	1194.0	12123.3	0.3	248.1	3.3	457.5	1044.4
UT9	0.0	7040.0	0.0	545.4	7.7	183.3	2259.4
UT10	0.0	27365.7	36.4	1377.7	1.1	283.5	11.7
ค่าเฉลี่ย	119.4	5865.9	5.9	301.9	33.3	547.4	1830.7
SD	358.2	8347.7	12.1	419.9	46.4	529.5	3314.6
cv	300	142	203	139	139	97	181

*ปริมาณเชื้อ (copies/µl ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม)

กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 5.8.1 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติของดินในแปลงปลูกอ้อยและตัวอย่างใบอ้อยที่มีอาการเส้นกลางใบเหลือง

Locations	Soil analysis							Leaf analysis		
	Dept. (cm.)	pH (1:1)	EC dS/m	% OM	P mg/kg	K ppm	Fe ppm	%N	% K	% Fe
ขอนแก่น	30	6.8	0.0172	0.10	5	23	13	1.26	1.54	0.01
อุดรธานี	30	6.5	0.0198	0.19	7	26	15	**1.73**	**1.89**	0.02
นครราชสีมา	30	6.3	0.0277	0.32	11	34	13	1.09	1.61	0.01
นครสวรรค์	30	6.6	0.0260	**1.01**	**120**	**72**	**56**	1.08	1.00	**0.04**
สุพรรณบุรี	30	**8.7**	**0.0719**	**1.08**	24	**172**	**48**	**1.53**	**1.87**	**0.03**
กาญจนบุรี	30	8.3	0.0623	**2.85**	46	78	**0**	1.07	1.18	0.02
สระแก้ว	30	6.8	0.0534	0.08	2	12	4	1.03	1.28	0.01

กรมวิชาการเกษตร

รายละเอียดหลักฐานของผลผลิต ผลลัพธ์ และการนำไปใช้ประโยชน์

<u>หลักฐานผลผลิตที่เกิดขึ้นจริง</u>

1. องค์ความรู้ จำนวน 2 เรื่อง

1. การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อในอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ การศึกษาถ่ายทอดเชื้อในอ้อยตอ
2. การพัฒนาวิธีการตรวจโรคใบขาวแบบใหม่ด้วยเทคนิค LAMP, M13-tagged two-steps PCR, multiplex PCR, IMP และ เทคนิคการตรวจเชื้อแบคทีเรียในอ้อยด้วย HRM

รายละเอียดในเอกสารคู่มือการจัดการโรคใบขาวอ้อย : นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

2. ต้นแบบเทคโนโลยี

2.1 ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 1 ต้นแบบ

1. วิธีการจำแนกชนิดของเชื้อโรคในอ้อยด้วยเทคนิค HRM

2.2 ระดับภาคสนาม จำนวน 3 ต้นแบบ

1.การพัฒนาเทคนิคการตรวจโรคใบขาวด้วยวิธี M13 tagged two-steps PCR

2. การจำแนกชนิดของเชื้อใบขาวด้วย multiplex PCR

3. การตรวจโรคใบขาวอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค LAMP

รายละเอียดในเอกสารคู่มือการจัดการโรคใบขาวอ้อย : นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

4. กระบวนการใหม่ ระดับห้องปฏิบัติการ จำนวน 4 กระบวนการ

1. การกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อ ส่งกรมวิชาการเกษตร ปี 2562
2. การตรวจโรคใบขาวด้วยเทคนิคใหม่ M13 tagged two-steps PCR
3. การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อในอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
4. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอ้อยด้วยเทคนิค HRM

รายละเอียดในเอกสารคู่มือการจัดการโรคใบขาวอ้อย : นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

5. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนา<u>ระดับชาติ</u>

5.1 นำเสนอแบบปากเปล่า 1 เรื่อง

1. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยยีน Immunodominant membrane protein (Imp) ในประชุมวิชาการเกษตรครั้งที่ 22 จัดที่คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทางออนไลน์ วันที่ 25 มกราคม 2564

5.2 นำเสนอแบบโปสเตอร์ 4 เรื่อง

1. รหัสลับ...รหัสสีบ่งชี้ระดับโรคใบขาวอ้อย ในงาน SIMA Asean Thailand 2017 ระหว่าง 7-9 กันยายน 2560 ที่ อิมแพค เมืองทองธานี จัดโดย กรมวิชาการเกษตร ร่วมกับบริษัท อิมแพ็ค เอ็กซิบิชั่น เมเนจเม้นท์ จำกัด

2. โรคใบขาวอ้อยนำเสนอผลงานวิจัยและแสดงนิทรรศการ ในงานประชุมอ้อยและน้ำตาลแห่งชาติ ประจำปี 2561 ระหว่างวันที่ 21-23 สิงหาคม 2561 ณ จังหวัดขอนแก่น

3. Detection and Identification of sugarcane expressing yellow leaf midrib symptoms in Sra Kaew province ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The International Sugar and Sugarcane Conference วันที่ 31 กรกฎาคม – 2 สิงหาคม 2562 ณ โรงแรม ดุสิตธานี พัทยา ชลบุรี จัดโดย สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย

4. นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน ใน การจัดงานแถลงผลงานด้านการวิจัยพัฒนาและประกาศเกียรติคุณผู้เกษียณอายุราชการ กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2564 วันที่ 29-30 กันยายน 2564

6. การประชุมเผยแพร่ผลงาน/สัมมนา<u>ระดับนานาชาติ</u>

6.1 นำเสนอแบบปากเปล่า 4 เรื่อง

1. Sugarcane white leaf disease in Asia ใน การประชุมกลุ่มพันธมิตรน้ำตาลอาเซียนครั้งที่ 3 วันที่ 12-14 เม.ย. 2561 ณ เมืองพัทยา จัดโดยสมาคมโรงงานน้ำตาล TSMC

กรมวิชาการเกษตร

2. Detection techniques on sugarcane white leaf disease ใน “Second International Workshop on Network development and Information Sharing for the Management of Sugarcane White Leaf Disease in Asia” ระหว่างวันที่ 19-20 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2561 ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น

3. Sugarcane White Leaf Disease and the Sustainable Disease Management ในงานประชุมนานาชาติ 4th Meeting of ASEAN Sugar Alliance 1 ในระหว่างวันที่ 17-18 มิถุนายน 2562 ณ เมือง Ho Chi Minh City, Vietnam จัดโดย สมาคมโรงงานน้ำตาล TSMC

4. A new efficient and rapid method for detection of the phytoplasma associated with sugarcane disease based on groEL gene and the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ The International Sugar and Sugarcane Conference วันที่ 31 กรกฎาคม – 2 สิงหาคม 2562 ณ โรงแรม ดุสิตธานี พัทยา ชลบุรี จัดโดย สมาคมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลแห่งประเทศไทย

7. การพัฒนากำลังคน นักวิจัยภาคเอกชน 3 คน ได้แก่

1. ดร.สุภาพร แก้วนุ่ม ผู้จัดการฝ่ายวิจัยและพัฒนา บริษัท ES วิจัยและพัฒนาจำกัด ในเครือโรงงานน้ำตาลภาคตะวันออก และคณะนักวิชาการ

2. นางสาวศิริพร รัตนภักดี ผู้จัดการส่วนวิจัยและพัฒนาวัตถุดิบ บริษัทเกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นเนลชูการ์คอร์ปอเรชั่น จำกัดมหาชน (สาขา3) และคณะนักวิชาการ

3. นางสาวทิวาพร ป้องแก้ว และนางสาวศิริวรรณ โนนศรี นักวิชาการ โรงงานน้ำตาลเกษตรผล

8. ผลงานตีพิมพ์ ระดับชาติ 6 เรื่อง

1. นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน ตีพิมพ์ใน การประชุมวิชาการพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ประจำปี 2564 “พืชไร่ยุคใหม่ สไตล์ New Normal” วันที่ 30 –31 สิงหาคม 2564 หน้า 128-155.

2. วิธีตรวจคัดกรองโรค และแผ่นรายงานผล ใช้ประโยชน์ในการตรวจโรคใบขาวอ้อยในโครงการวิจัยปี 2559-2564 และโครงการขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรคใบขาว

3. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยด้วยยีน Immunodominant membrane protein (Imp) ตีพิมพ์ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 49 ฉบับเพิ่มเติม 1 2564 หน้า 43 (1-2)

4. การหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมากับระดับการแสดงอาการของโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธีกราฟมาตรฐาน absolute qPCR ตีพิมพ์ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 49 ฉบับเพิ่มเติม 1 2564 หน้า 146 (1-3)

5. วิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยแบบใหม่ที่มีประสิทธิภาพและรวดเร็วโดยการตรวจยีน groEL ด้วยเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ตีพิมพ์ในเอกสารประกอบการประชุม มหกรรมงานวิจัยแห่งชาติ 2563 (Thailand Research Expo 2020) วันที่ 2-6 สิงหาคม 2563 เผยแพร่ทางออนไลน์เมื่อมกราคม 2564

6. การใช้เทคนิค HRM ตรวจสอบชนิดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย ดำเนินการเสร็จแล้วอยู่ระหว่างการส่งตีพิมพ์

<u>หลักฐานผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจริง</u>

ผลงานตีพิมพ์

1. บทความเรื่อง “การตรวจโรคใบขาวอย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค LAMP” ตีพิมพ์ใน เอกสารประกอบการประชุม มหกรรมงานวิจัยแห่งชาติ 2563 เผยแพร่ทางออนไลน์เมื่อมกราคม 2564 จำนวน 1 เรื่อง

2. บทความเรื่อง “การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยยีน Imp” ตีพิมพ์ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 49 ฉบับเพิ่มเติม 1 2564 หน้า 43 (1-2)

3. บทความเรื่อง “การหาความสัมพันธ์ของปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมากับระดับการแสดงอาการของโรคใบขาวอ้อยด้วยวิธีกราฟมาตรฐาน absolute qPCR ตีพิมพ์ในวารสารแก่นเกษตร ปีที่ 49 ฉบับเพิ่มเติม 1 2564 หน้า 146 (1-3)

4. นำเสนอผลงานวิจัยภาคนิทรรศการและโปสเตอร์เรื่อง “รหัสลับ...รหัสสีบ่งชี้ระดับโรคใบขาวอ้อย” ในงาน SIMA Asean Thailand 2017 ระหว่าง 7-9 ก.ย. 60 ที่ อิมแพค เมืองทองธานี จัดโดย กรมวิชาการเกษตร ร่วมกับบริษัท อิมแพ็ค เอ็กซิบิชั่น เมเนจเม้นท์ จำกัด

กรมวิชาการเกษตร

5 นำเสนอผลงานวิจัยและแสดงนิทรรศการผลงานวิจัยเรื่อง “โรคใบขาวอ้อย” ในงานประชุมอ้อยและน้ำตาลแห่งชาติ ประจำปี 2561 ระหว่างวันที่ 21-23 ส.ค. 2561 ณ จังหวัดขอนแก่น

ฐานข้อมูลและแบบจำลองวิจัย (Research databases and models)

- ข้อมูลลำดับเบสและชนิดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอ้อยที่พบในอ้อย 8 ฐานข้อมูล ในเอกสารคู่มือการจัดการโรคใบขาวอ้อย : นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

ความก้าวหน้าในวิชาชีพของบุคลากรด้านวิทยาศาสตร์วิจัยและนวัตกรรม (Next destination)

- ความเชี่ยวชาญด้านโรคอ้อยของไทย ได้แก่ นักวิชาการเกษตร จำนวน 1 คน (นายวีรกรณ์ แสงไสย์ นักวิชาการเกษตรชำนาญการ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น)

ผลิตภัณฑ์ใหม่ (New products)

- ผลิตภัณฑ์ด้านเทคนิคและเทคโนโลยี ได้แก่ เทคโนโลยีการตรวจโรคใบขาวที่รวดเร็วและประสิทธิภาพสูง จำนวน 4 ผลิตภัณฑ์ M13 two step PCR, LAMP, IMP, HRM ในการตรวจวินิจฉัยโรคใบขาวและแบคทีเรียก่อโรคในอ้อยที่รวดเร็ว แม่นยำ ในเอกสารคู่มือการจัดการโรคใบขาวอ้อย :นวัตกรรมด้านเทคโนโลยีการจัดการโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาแบบไร้รอยต่อเพื่อควบคุมการระบาดอย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

<u>หลักฐานการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์</u>

1. การถ่ายทอดเทคโนโลยีให้กับเกษตรกรเรื่องลดความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อย ในแปลงเกษตรกร บ้านบ้านทุ่งพัฒนา ตำบลไผ่เขียว อำเภอสว่างอารมณ์ จังหวัดอุทัยธานี หลักฐาน ข่าวหนังสือพิมพ์เดลินิวส์ ฉบับวันที่ 27 มกราคม 2560 link https://d.dailynews.co.th/agriculture/551373/
2. วิดีโอถ่ายทอดเทคโนโลยี เรื่อง วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวอ้อย : เทคนิคพีซีอาร์ เผยแพร่โดยกลุ่มประชาสัมพันธ์ กรมวิชาการเกษตร ปี2559 link https://www.youtube.com/watch?v=bTuDnI7_XJM
3. แผ่นพับเรื่อง โรคใบขาวอ้อยและการป้องกันกำจัด ในงานถ่ายทอดเทคโนโลยี “ร่วมแรง ร่วมใจ ขจัดภัยโรคใบขาวอ้อย” ณ สมาคมชาวไร่อ้อยสุรนารี

กรมวิชาการเกษตร