

วิธีสุ่มตัวอย่าง, เก็บรักษา และประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา

สาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์

A sampling and preserving method and the estimation of sugarcane

white leaf disease phytoplasma using conventional PCR technique

ศุภรัตน์ สงวนรังศิริกุล¹ ชีรุตติ วงศ์รัตน์¹ ทักษิณา สันสยะวิชัย¹
สุนิ ศรีสิงห์² นิลุบล ทวีกุล¹ นฤทัย วรรณดิษฐ์³ รังสี เจริญสถาพร⁴

บทคัดย่อ

องค์ประกอบสำคัญในการผลิตอ้อยปลอดโรคใบขาว อ้อยสะอาด หรือการคัดเลือกแปลงแม่พันธุ์เพื่อขยายพันธุ์อ้อย ประกอบด้วยวิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวที่แม่นยำและมีความไวสูง การประเมินปริมาณเชื้อที่ใช้คาดเดาระดับความรุนแรงของโรครภายในตัวอย่างในลำหรือแปลงแม่พันธุ์ การสุ่มเก็บตัวอย่างจากต้นที่ตำแหน่งตัวแทนที่ดีสำหรับการประเมินผลที่ถูกต้อง และวิธีการเก็บรักษาที่ไม่ทำลายปริมาณและคุณภาพของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์เพื่อผลที่เชื่อถือได้เมื่อแปลงตรวจสอบอยู่ห่างไกลจากห้องปฏิบัติการมาก รายงานนี้นำเสนอผลการประยุกต์ พัฒนาและปรับเปลี่ยนวิธีการจนได้เทคนิคในการสุ่มเก็บ ตรวจเชื้อ และประเมินปริมาณเชื้ออย่างคร่าวๆ ได้และใช้ได้จริงโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อนและราคาแพง วิธีนี้ใช้เครื่อง PCR ที่มีการใช้ยวดยุทไปในการตรวจหาเชื้อ ซึ่งแสดงดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสองตำแหน่ง คือ 700 คู่เบส ในบริเวณ 16S-23S rRNA ตรวจด้วยวิธี direct PCR เป็นตำแหน่งที่พบได้ในเชื้อไฟโตพลาสมาทั่วไป และ 210 คู่เบส ที่อยู่บริเวณ 16S-23S intergenic spacer region (ITS) ตรวจด้วยวิธี nested-PCR เป็นตำแหน่งจำเพาะต่อเชื้อโรคใบขาวในอ้อย จากการตรวจสอบพบว่าดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 700 คู่เบส สามารถนำมาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานเพื่อใช้หาความเข้มข้นดีเอ็นเอของเชื้อในตัวอย่างใบอ้อยได้ ($R^2 = 0.994$) และเป็นตำแหน่งที่ใช้คาดเดาปริมาณเชื้อในต้นได้ การหาปริมาณเชื้อภายในลำและกอ พบว่าตำแหน่งใบที่ 2-5 จากยอดมีปริมาณใกล้เคียงกัน ส่วนบริเวณโคนต้นมีปริมาณมากที่สุด ในขณะที่หน่อที่ 1 และหน่อถัดไปนั้นมีปริมาณเชื้อมากหรือน้อยขึ้นกับอาการของลำหลัก การศึกษาวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างใบอ้อยที่มีอาการใบขาวในสภาพแช่เย็นและใบแห้งพบว่าในสภาพแห้งมีคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอที่ดีกว่า ดังนั้นในการสุ่มเพื่อตรวจโรคควรเก็บตัวอย่างจากใบตำแหน่งดังกล่าวและหน่อที่ 1 และควรตากใบให้

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี

³ สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 3

⁴ สถาบันวิจัยพืชไร่

แห่งหากเป็นตัวอย่างใบขาวที่ต้องเก็บรักษาเป็นเวลาหลายวันก่อนถึงห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองนี้ได้ขยายผล
ใช้ในงานวิจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับโรคใบขาวในอ้อย ทำให้นักวิจัยสามารถวิเคราะห์ผลร่วมกับปริมาณเชื้อและอาการ
ตอบสนองของต้นอ้อยได้อย่างสมบูรณ์ยิ่งขึ้น