หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

## บทนำ

อ้อยล่งโรงงานหรืออ้อยน้ำตาลเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งของโลกและของประเทศไทย น้ำตาลที่ผลิตได้ทั่วโลกร้อยละ 60 เป็นผลผลิตจากอ้อย ประเทศไทยได้ส่งน้ำตาลจำหน่ายต่างประเทศเป็นจำนวน 3 ใน 4 ส่วนของน้ำตาลที่ผลิตได้ โดยส่วนใหญ่ส่งในรูปของน้ำตาลทรายดิบ ซึ่งทำรายได้ให้แก่ประเทศอยู่ในอันดับ 1-3 ตลอดมา ฝ่ายนโยบายและเศรษฐกิจน้ำตาลได้รายงานว่า ในปี พ.ศ. 2526 ประเทศไทยส่งน้ำตาลทรายดิบและน้ำตาลทรายขาวออกไปจำหน่ายต่างประเทศประมาณ 1.5 ล้านเมตริกตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 6,300 ล้านบาท

อ้อยน้ำตาลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Saccharum officinarum Linn. พันธุ์ที่ปลูกอยู่ในปัจจุบันเป็นลูกผสมที่มีผลผลิตสูงแต่มักไม่ต้านทานโรค อ้อยสายพันธุ์ F156 เป็นลูกผสมของ F141 และ CP 34-79 เป็นสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกพันธุ์หนึ่งโดยมีอัตราการเจริญเร็ว ไม่ค่อยล้ม ผลผลิตต่อไร่สูง อายุเก็บเกี่ยว 12-13 เดือน (เกษม สุขสถาน และคณะ, 2520) อ้อยมีศัตรูมากทั้งโรคและแมลง ทำให้เกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายในการดูแลรักษาเป็นจำนวนมาก โรคที่สำคัญที่สุดและระบาดไปกับอ้อยแทบทุกพันธุ์ในแหล่งปลูกอ้อยทั่วประเทศ คือ โรคแส้ดำ โรคนี้ทำความเสียหายให้แก่อุตสาหกรรมการปลูกอ้อยปีละหลายร้อยล้านบาท (ธนาคร จารุพัฒน์ และคณะ, 2526) อาการของอ้อยที่เป็นโรค คือ มีลำต้นแคระแกรนและผอมเรียว แตกกอคล้ายตะไคร้ ใบแคบเล็ก ข้อสั้นและต้นเตี้ย อาการขั้นสุดท้ายที่ยอดมีลักษณะคล้ายแส้ ถ้าอาการรุนแรงอาจแห้งตายไปทั้งกอ โรคนี้ระบาดในต้นฤดูปลูกเมื่ออ้อยอายุได้ 3-6 เดือน โดยเป็นกับอ้อยตอมากกว่าอ้อยปลูกใหม่ ทำให้ผลผลิตต่อไร่ลดลงหรือเก็บเกี่ยวไม่ได้เลย อ้อยในพันธุ์ที่ไวต่อโรค คุณภาพจะลดลง ปริมาณน้ำตาลต่ำกว่าปกติถึง 10-28 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักลดลง 70-75 เปอร์เซ็นต์ ความรุนแรงของโรคสามารถทำให้อ้อยแห้งตายได้ทุกระยะการเจริญ (สุวนิตย์ แวงวรรณ, 2524; ธนาคร จารุพัฒน์ และคณะ, 2526) การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีการที่ดีที่สุดในการป้องกันโรคอย่าง

ถาวร การสร้างสายพันธุ์ใหม่เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ทนต่อโรคสูง นิยมใช้วิธีผสมพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์เป็นวิธีมาตรฐาน ปัจจุบันพบว่าเทคนิคการเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อพืช เป็นอีกวิธีหนึ่งซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชได้ Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1976) ได้รายงานถึงการแปรที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวาย (Dendrobium) ซึ่งได้ต้นใหม่ที่เจริญมาจาก clone เดียวกันแต่มีลักษณะต่าง ๆ กัน และลักษณะที่แปรไปนี้ทำให้ได้พันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะทั้งดีขึ้นและเลวลง ปัจจุบันห้องปฏิบัติการหลายแห่งทั่วโลกได้ใช้เทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อทำการปรับปรุงพันธุ์พืช เช่น ห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของ Colorado State University, DNA Plant Technology Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา; Plant cell and Tissue Culture Research Center, Kyoto University ประเทศญี่ปุ่น; Fiji Sugar Corporation ประเทศฟิจิ; International Rice Research Institute ประเทศฟิลิปปินส์ รวมทั้งห้องปฏิบัติการเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพระยาอนุกูลสยามกิจฯ ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองนี้ต้องการศึกษามิวเตชันที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยทั้งที่เกิดขึ้นเองและชักนำด้วย ethyl methanesulphonate (EMS) คาดว่าจะได้สายพันธุ์ใหม่ที่มีความต้านทานต่อโรคแส้ดำ ซึ่งจะได้เผยแพร่สู่เกษตรกร เพื่อใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

<u>วัตถุประสงค์และขอบเขตงานวิจัย</u>

ในงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษามิวเตชันของอ้อยที่เกิดจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อทั้งที่เกิดขึ้นเองและชักนำด้วยสารเคมี โดยศึกษาในรูปของการเจริญ ลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป และความสามารถในการต้านทานโรคแส้ดำเป็นหลัก

การตรวจสอบเอกสาร

ประวัติการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย (Saccharum officinarum Linn.)

ในปี ค.ศ. 1960 Nickell และคณะได้เลี้ยงเนื้อเยื่อและเซลล์อ้อย (Saccaharum Officinarum Linn.) ที่สถานีทดลอง Hawaiian sugar planters' association (HSPA) โดยศึกษาปัญหาทางด้านสรีระวิทยาและชีวเคมี ได้ทดลองใช้เนื้อเยื่อพาเรนไคมาที่เจริญเต็มที่แล้ว จากบริเวณปล้องของอ้อยพันธุ์ H50-7209 เพื่อให้ได้ clone แท้ จึงเลี้ยงเซลล์เดี่ยว (single cell) ในรูปของ suspension culture ต่อมาได้นำเซลล์เดี่ยวมาชักนำให้เกิดคัลลัสด้วยวิธี nurse culture technique และได้คัลลัสที่มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด 5 กลุ่ม คือ สีขาว 1 กลุ่ม สีเหลืองอมน้ำตาล 2 กลุ่ม และสีเหลือง 2 กลุ่ม ในกลุ่มสีเหลืองอมน้ำตาล และสีเหลืองด้วยกันมีอัตราการเจริญไม่เท่ากัน Nickell และคณะสามารถชักนำคัลลัสทั้ง 5 กลุ่มนี้เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้สำเร็จ จากการศึกษาทางด้านเซลล์วิทยาพบว่า แต่ละ subclone มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน สาเหตุหนึ่งที่สำคัญคืออ้อยที่นำมาทำ suspension culture มีโครโมโซมแบบ chromosomal mosaic[1] (Heinz, และคณะ 1977) ต่อมาในปี ค.ศ. 1966-1967 Urata ได้แสดง totipotency[2] ในพืชตระกูลหญ้าหลายชนิดรวมทั้งอ้อยด้วยและจากการที่พบ chromosomal mosaic ในอ้อย ทำให้นักวิจัยในฮาวายใช้วิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อชักนำให้เกิดการแปร (variation) เพื่อใช้คัดเลือกลักษณะที่ต้องการในงานปรับปรุงพันธุ์อ้อย หลังจากนั้น Krishnamurthi (1974,1977) นักวิจัยชาวฟิจิได้เลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ต่าง ๆ เช่น Pindar, Ragnar, Spartan และ Yasawa ฯลฯ และได้ศึกษาขบวนการพัฒนาตั้งแต่ระยะคัลลัสจนเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ เขาได้พบว่า subclone ของอ้อยพันธุ์ Pindar 4 subclone มีความสามารถในการต้านทานโรคฟิจิสูงมาก นอกจากนี้ Krishnamurthi (1974) ยังได้เลี้ยงโปรโตพลาสต์ ตลอดจนทำ fusion และชักนำให้เป็นต้นได้สำเร็จอีกด้วย อาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่ออ้อย โดยทั่วไปนิยมใช้อาหารสูตรดัดแปลงของ

---

[1] แต่ละส่วนมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน

[2] ความสามารถที่แต่ละเซลล์เจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้

White (1943) หรือ Murashige และ Skoog (1962) โดยเติมสารอื่นลงไปด้วย เช่น น้ำมะพร้าว yeast extract และน้ำมะเขือเทศ เป็นต้น พบว่าสูตรของ White (1943) ให้การเจริญของเซลล์ดีกว่า แต่ถ้าเลี้ยงมากกว่า 1 subculture (4 สัปดาห์) แม้ว่าจะได้นำ auxin ออกจากสูตรอาหารแล้ว พบว่าเนื้อเยื่อเหล่านี้จะไม่เจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นเลย สูตรอาหารที่ดีสำหรับการเจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นต้นที่สมบูรณ์ คือ สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog อย่างไรก็ตาม ถ้าคัลลัสนี้อยู่ในสูตรอาหารนี้มากกว่า 5 ปี ก็มีโอกาสสูญเสีย totipotency ได้ (Barba และ Nickell, 1969; Heinz และคณะ, 1977) ต่อมาในปี ค.ศ. 1971 Heinz และคณะได้ศึกษา subclone ที่เกิดจากคัลลัสอ้อย 2 พันธุ์ คือ H37-1933 และ H50-7209 ถึงความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา จำนวนโครโมโซมและระบบเอ็นไซม์ได้ผลว่า อ้อยพันธุ์ H50-7209 ซึ่งเป็น chromosomal mosaic มีการแปรมากกว่าอ้อยพันธุ์ H37-1933 ซึ่งเป็น chromosomal stable แต่ละ subclone ของ H50-7209 มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน นอกจากนี้การแปรทางด้านสัณฐานวิทยาไม่สัมพันธ์กับการแปรทางด้านระบบเอ็นไซม์โดยเปรียบเทียบกับพันธุ์เดิม subclone ที่มีสัณฐานวิทยาต่างกัน อาจมี enzyme pattern เหมือนกัน ในทางกลับกัน subclone ที่มีสัณฐานวิทยาเหมือนกัน อาจมี enzyme pattern ต่างกันได้เช่นกัน

หลังจากนั้น ในปี ค.ศ. 1970 สถาบันวิจัยน้ำตาลแห่งไต้หวัน (Taiwan Sugar Research Institute) ได้เริ่มนำเทคนิคการเลี้ยงเนื้อเยื่อมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์อ้อย (Liu, 1981) ต่อมา Liu และ Chen (1977) รายงานว่าได้เลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ F156 และ F164 เพื่อศึกษาลักษณะทางเกษตร เช่น ผลผลิต จำนวนลำต่อกอ ความสูง ฯลฯ พบว่า subclone ที่ได้ใหม่มีบางลักษณะดีกว่าพันธุ์เดิมและดีกว่าพันธุ์ F160 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ดีที่สุดในสมัยนั้นและพบการแปรในระบบเอ็นไซม์ของ subclone ที่ได้อีกด้วย งานวิจัยทางด้านการเลี้ยงเนื้อเยื่อในไต้หวันได้ขยายขอบเขตออกไปมากขึ้น ในปี ค.ศ. 1981 Liu ได้เลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยจากใบอ่อน แล้วชักนำให้เกิดมิวเตชันโดยแช่คัลลัสในสารละลาย ethyl methanesulphonate (EMS) และฉายรังสีแกมมา หลังจากชักนำคัลลัสเหล่านั้นให้เจริญเป็นต้นแล้ว จึงตรวจสอบและคัดเลือกลักษณะที่ต้องการต่อไป

ในประเทศไทยเริ่มศึกษาการเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย โดยบุญเทือง โพธิ์เจริญ (2522) ได้ศึกษาการเจริญของคัลลัสอ้อยที่ชักนำจากตาข้าง ตายอด ข้อและใบอ่อนในอาหารสูตรต่าง ๆ พบว่าหากใช้ 2,4-D ในปริมาณสูงเกินไป (5 ppm.) อ้อยที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อจะมีการเจริญผิดปกติไป และเมื่อไม่นานมานี้ Hendre และคณะ (1983) ได้ศึกษาการขยายพันธุ์อ้อยด้วยวิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอด (shoot tip culture) ตายอดที่เลี้ยงนี้สามารถแตกหน่อออกไปมากมายได้โดยไม่ผ่านระยะคัลลัสและ subclone ที่ได้มีการแปรน้อยมาก วิธีนี้เหมาะสำหรับขยายพันธุ์อ้อยที่มีลักษณะดีโดยปราศจากโรค (ยกเว้นโรคที่เกิดจากไวรัส) ในระยะเวลาอันสั้น ในอนาคตสำนักงานอ้อยและน้ำตาลทราย กระทรวงอุตสาหกรรมแห่งประเทศไทย มีโครงการที่จะผลิตท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรคโดยวิธีการเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อส่งให้เกษตรกรใช้เป็นพันธุ์ปลูกต่อไป

## วิธีเลี้ยงเนื้อเยื่อ

### เนื้อเยื่อที่ใช้เลี้ยง

เกือบทุกส่วนของอ้อยสามารถนำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อและทำให้เกิด totipotency ได้ เช่น ตายอด ตาข้าง ใบอ่อน ข้อ ปล้อง ปุ่มราก ช่อดอกอ่อนและ pith parenchyma ฯลฯ (Nickell, 1973; Krishnamurthi และ Tlaskal, 1974; Heinz และคณะ 1977; Liu, 1981; บุญเทือง โพธิ์เจริญ, 2522) ชิ้นส่วนเหล่านี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญและพาเรนไคมา ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ถูกชักนำได้ง่าย ส่วนที่ให้คัลลัสเร็วและเกิด totipotency ได้มากที่สุด คือ ใบอ่อนและช่อดอกอ่อน (Heinz และคณะ, 1977; Liu, 1981) เนื่องจากใบอ่อนและช่อดอกอ่อนผลิตสาร phenolic compound ซึ่งเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่ออ้อยเองน้อยกว่าบริเวณอื่น ทำให้อัตราการอยู่รอดของชิ้นส่วนทั้งสองมากกว่าชิ้นส่วนอื่น (Liu, 1981)

### การชักนำให้เกิดคัลลัสและต้นที่สมบูรณ์

โดยทั่วไปคัลลัสของอ้อยเจริญและเปลี่ยนแปลงเป็นยอดได้ง่ายมาก อย่างไรก็ตาม อ้อยพันธุ์เก่า เช่น Badila, POJ 2878 และ POJ 2883 ฯลฯ มีอัตราการเจริญและ regenerate ต่ำกว่าอ้อยรุ่นใหม่ เช่น F160, F170 และ F177 (Liu, 1981)

Liu (1981) ได้รายงานว่าคัลลัสที่เจริญในอาหารสูตรของ White (1943) มีอัตราการเจริญต่ำกว่าคัลลัสในอาหารสูตรของ Murashige และ Skoog (1962) ซึ่งขัดกับรายงานของ Barba และ Nickell (1969) ที่รายงานว่า คัลลัสอ้อยที่เลี้ยงในอาหารสูตรของ White (1943) มีอัตราการเจริญสูงกว่าคัลลัสในอาหารสูตรของ Murashige และ Skoog (1962) แต่ถ้ายักนำคัลลัสในอาหารสูตรของ White (1943) หรือนำคัลลัสที่เลี้ยงในอาหารสูตรของ Murashige และ Skoog (1962) หรือสูตรอื่น แล้วย้ายลงเลี้ยงบนอาหารสูตรของ White (1943) มากกว่า 1 subculture (3-4 สัปดาห์) จะไม่สามารถยักนำคัลลัสให้เปลี่ยนแปลงเป็นยอดได้ (Barba และ Nickell, 1969; Heinz และคณะ, 1977) นอกจากนี้คัลลัสอ้อยที่มีอายุมากก็สูญเสียความสามารถในการ differentiate เช่นกัน Barba และ Nickell (1969) ได้เลี้ยงคัลลัสของอ้อย 4 พันธุ์ คือ H109, Badila, H37-1933 และ H50-7209 ที่มีอายุ 5 ปีในสูตรของ White (1943) และ Murashige และ Skoog (1962) ซึ่งมีออร์โมนต่าง ๆ ผสมอยู่ เช่น NAA, 2,4-D Kinetin และน้ำมะพร้าว พบว่าไม่มีอาหารสูตรใดที่สามารถยักนำให้คัลลัสเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไปเป็นยอดได้เลย

โดยทั่วไปสูตรอาหารที่ใช้ยักนำให้เกิดคัลลัสใช้สูตรดัดแปลงของ Murashige และ Skoog (1962) (MS + 2,4-D 3 ppm. + น้ำมะพร้าว 10-15 เปอร์เซ็นต์ + sucrose 20 กรัม) (Krishnamurthi และ Tlaskal, 1974) และได้ศึกษากายวิภาคของการเจริญของเนื้อเยื่อพบว่าคัลลัสอ้อยเจริญและเปลี่ยนแปลงมาจากเซลล์ phloem ของเนื้อเยื่อลำเลียงที่มีอายุน้อยในยอดและใบอ่อน เมื่อเลี้ยงชิ้นส่วนอ้อยได้ประมาณ 5-6 วัน จะเริ่มเห็นคัลลัสตามบริเวณรอยตัดของชิ้นส่วนนี้ (Liu, 1981) เมื่อคัลลัสอายุประมาณ 5-6 สัปดาห์ เซลล์ในคัลลัสรวมตัวกันแน่นขึ้นเป็น embryonic structure ซึ่งประกอบด้วย embryonic cell (Nadar และคณะ, 1978) ลักษณะคล้าย embryo ระยะ blastula ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเรียกระยะนี้ว่า re-organization (Krishnamurthi, 1977) ต่อมา embryonic cell เปลี่ยนแปลงไปเป็น green nodule เล็ก ๆ ขนาด 1.0-1.5 มิลลิเมตร ซึ่งประกอบด้วย growing point และ leaf primordia (Liu, 1981) ระยะนี้คัลลัสมีลักษณะคล้ายถ้วย (Krishnamurthi และ Tlaskal, 1974) ภายใน 1 สัปดาห์ต่อมา จะเห็นยอดโผล่ออกมา เรียกระยะนี้ว่า re-differentiation และเห็นใบยืดเจนในเวลาต่อมา (Krishnamurthi และ Tlaskal, 1974)

Nadar และคณะ (1978) รายงานว่า การพัฒนาจากคัลลัสเป็นกล้าอ้อยว่าเป็นการพัฒนาแบบ embryogenesis และการยักนำให้เกิด embryonic cell ต้องการ auxin ในความเข้มข้นสูง (2,4-D 3 ppm.) ซึ่งใกล้เคียงกับความเข้มข้นของ auxin ใน embryo development ของอ้อยหลังจากปฏิสนธิในธรรมชาติ นอกจากนี้ยังกล่าวว่า auxin ไม่ใช่เป็นตัวยับยั้งแต่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิด embryogenesis ระยะเริ่มต้น การพัฒนาจาก mature embryo ไปเป็นกล้าอ้อยต้องการอาหารที่ไม่มี auxin เลย ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Nickell (1973) ที่ว่า ขบวนการพัฒนาจากคัลลัสเป็นกล้าอ้อยเป็นขบวนการแบบ organogenesis และ auxin เป็นตัวยับยั้งหรือป้องกันขบวนการนี้ ดังนั้นในการยักนำคัลลัสให้เจริญและเปลี่ยนแปลงไปเป็นกล้าอ้อยต้องเลี้ยงคัลลัสในอาหารที่ไม่มี auxin เลย นอกจากนี้ Liu (1981) ได้เสนอสูตรอาหารที่ใช้ยักนำให้เกิดยอดที่ได้ผลดี คือ สูตรของ Murashige และ Skoog (1962) ที่ดัดแปลงโดยเติมฮอร์โมนและสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ kinetin 1 ppm. NAA 1 ppm. casein hydrolysate 400 ppm. อย่างไรก็ตามการเจริญและเปลี่ยนแปลงของคัลลัสไม่แน่นอน บางครั้งคัลลัสสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นต้นก่อนย้ายสู่อาหารสังเคราะห์ที่ไม่มี auxin แต่บางครั้งเมื่อย้ายคัลลัสไปเลี้ยงในอาหารที่คิดว่าเหมาะสมแล้ว คัลลัสอาจไม่ differentiate เลยก็ได้ (Krishnamurthi, 1974; Liu, 1981)

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า ขบวนการพัฒนาจากคัลลัสไปเป็นต้นที่สมบูรณ์มีความเห็นแตกต่างไปเป็นสองฝ่าย ฝ่ายหนึ่งเชื่อว่าการพัฒนานี้เป็นแบบ embryogenesis (Nadar และคณะ, 1978) แต่อีกฝ่ายหนึ่งเห็นว่าเป็นแบบ organogenesis ฝ่ายหลังสังเกตว่าคัลลัสเปลี่ยนแปลงเป็นยอดก่อน เมื่อยอดเจริญพอสมควรจึงจะเกิดรากที่ nodal primordia บริเวณโคนต้น (Krishnamurthi, ; Krishnamurthi และ Tlaskal, 1974) Nadar และคณะ (1978) รายงานว่า polyembryonic mass ของอ้อยใช้ radical tissue ร่วมกัน แต่ Liu (1981) รายงานว่ายอดอ้อยที่พัฒนาจากคัลลัสไม่มี radicle หรือ coleorhiza บางครั้งรากเปลี่ยนแปลงจากเซลล์คัลลัสโดยตรง คัลลัสที่เป็น root primordia เห็นเป็นจุดสีแดงซึ่งต่างจากคัลลัสที่จะเจริญไปเป็นยอดโดยจะเห็นเป็นจุดสีเขียว คัลลัสที่เห็นเป็นจุดสีแดงอาจเจริญกลับเป็นคัลลัสปกติที่สามารถเจริญไปเป็นยอดได้ (Krishnamurthi, ; Krishnamurthi และ Tlaskal, 1974) การยักนำให้เกิดรากใช้

เวลาค่อนข้างนาน จึงมีผู้ศึกษาวิธีการต่าง ๆ เพื่อชักนำรากอย่างมีประสิทธิภาพ Nickell และคณะ เป็นนักวิทยาศาสตร์คณะแรกที่สามารถชักนำต้นอ่อนที่สมบูรณ์จาก cell suspension ในอาหารสังเคราะห์ที่ไม่มีออร์โมนได้สำเร็จ (Nickell, 1973) นอกจากนี้ 2,2-dichloropropionic acid (dalapon) และ indole-3- butyric acid เป็นสารที่ช่วยในการชักนำรากได้ดี (Barba และ Nickell, 1969; Krishnamurthi และ Tlaskal, 1974) บางครั้งเอ็นไซม์ polyphenoloxidase ซึ่งทำให้เกิดสารสีน้ำตาลยับยั้งการเกิดราก การเติม diethyldithiocarbamate เข้มข้น 250 ppm. ช่วยทำให้สารสีน้ำตาลนี้ลดลง (Krishnamurthi และ Tlaskal, 1974) วิธีทางกายภาพก็สามารถชักนำให้เกิดรากได้ดีเช่นกัน โดยนำยอดแช่ลงในน้ำที่มีการพ่นอากาศ อุณหภูมิระหว่าง 15-18 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 98-100 เปอร์เซ็นต์ สามารถชักนำให้เกิดรากได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ Liu (1981) ได้ศึกษาค้นวิธีที่กล่าวมาทั้งหมด โดยรายงานว่าการเลี้ยงยอดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส หรือเติม auxin ในอาหารสังเคราะห์ทำให้ยอดเจริญช้าลงและไม่ช่วยให้เกิดรากด้วย dalapon ก็ไม่ช่วยชักนำรากเช่นกัน Liu กล่าวว่าถ้าใช้อาหารสูตรของ Schenk และ Hildebrandt (1972) ซึ่งเติมน้ำมะพร้าว 10 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาณพอเพียง (60 มิลลิลิตร ใน Erlenmayor flask 250 มิลลิลิตร) และวางยอดไว้ใต้แสงแบบกระจาย (diffused light) ช่วยให้เกิดรากดีที่สุด แต่โดยทั่วไปแล้วสูตรของ Murashige และ Skoog (1962) สามารถชักนำให้เกิดการเจริญจากคัลลัสไปเป็นต้นอ่อนที่สมบูรณ์ได้ดี (Krishnamurthi, ; Barba และ Nickell, 1969; Heinz และคณะ, 1977; บุญเทือง โพธิ์เจริญ, 2522)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิวเตชัน

มิวเตชันที่เกิดขึ้นในธรรมชาติปรากฏ phenotype ในลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปมองเห็นได้ยาก นอกจากจะเกิดในส่วนของพืชที่เป็นจุดสำคัญ เช่น บริเวณเนื้อเยื่อเจริญของตายอด ตาข้าง ตาดอก เป็นต้น แต่จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อพบการเกิดมิวเตชันสูงกว่า เนื่องจากเซลล์หรือกลุ่มเซลล์ของเนื้อเยื่อที่เปลี่ยนไปมีโอกาสเจริญเป็นต้นที่สมบูรณ์ได้มากกว่า (Vajrabhaya และ Vajrabhaya, 1976) จากการทดลองของ Vajrabhaya และ Vajrabhaya (1976) พบว่า เกิดการแปรในขนาดและรูปร่างของกลีบดอกโดยเฉพาะ

petal และ labellum ของกล้วยไม้ที่ได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อ 2 พันธุ์ คือ Dendrobium Pompadour 'Phra Tabha' และ Den. May Neal 'Sri Sobhon' โดยแตกต่างจากดอกของต้นเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบการแปรในสีของส่วนต่าง ๆ ของดอกอีกด้วย

ในปี ค.ศ. 1960 Nickell ได้ทำ suspension culture ของอ้อยพันธุ์ H50-7209 ศัลลัลที่ได้จาก suspension cell 5 กลุ่ม มีความแตกต่างกันทั้งในด้านสีและอัตราการเจริญทุกกลุ่ม หลังจากที่ชักนำให้เกิดต้นจากศัลลัลเหล่านี้ จึงพบว่าแต่ละ clone มีจำนวนโครโมโซมต่างกัน เนื่องจากการแปรใน suspension cell ในอ้อยพันธุ์ H50-7209 ต้นเดียวกันมีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากัน เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า chromosomal mosaic ดังนั้น จึงใช้คุณสมบัตินี้ผลิตและแยก subclone หา variant เพื่อปรับปรุงลักษณะที่ต้องการต่อไป (Heinz และคณะ, 1977)

จากการพบchromosomal mosaic ในอ้อย จึงมีผู้ศึกษาการแปรมากมายดังนี้

1. จำนวนโครโมโซม

Heinz และคณะ (1971, 1972) ได้ศึกษาการแปรจากการเลี้ยงเนื้อเยื่อของอ้อยลายพันธุ์ H37-1933 และ H50-7209 พบว่า การแปรในอ้อยพันธุ์ H50-7209 ซึ่งเป็นชนิด chromosomal mosaic มีการแปรสูงกว่าอ้อยลายพันธุ์ H37-1933 ซึ่งเป็นชนิด chromosomal stable จำนวนโครโมโซมของต้นที่ได้จากลายพันธุ์ H50-7209 แปรตั้งแต่ 25-118 ซึ่งต้นที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อมีโครโมโซมเป็น 2n = ca. 108-128 เซลล์เหล่านี้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ มีนิวเคลียสแบบ multinucleate ซึ่งแบ่งตัวแบบ asynchronous mitosis ส่วนในต้นที่ได้จาก H37-1933 มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = ca.106 ซึ่งเท่ากับโครโมโซมของต้นที่นำมาเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต่อมาได้มีการศึกษาการแปรทางโครโมโซมใน suspension cell และอ้อยที่เกิดจาก suspension cell ได้ผลดังนี้

อ้อยลายพันธุ์ F164 มี 2n = ca.108 ใน suspension cell มี 2n = 82-191 ในรากของต้นที่เกิดจาก suspension cell มี 2n = 88-108

อ้อยลายพันธุ์ F156 มี 2n = ca.114 ใน suspension cell มี 2n = 77-150 ในรากของต้นที่เกิดจาก suspension cell มี 2n = 86-108

F146และอ้อยที่เจริญมาจากคัลลัสของ F146 มีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n = ca.110 แสดงว่า F146 เป็นพันธุ์ที่ stable ที่สุด (Liu และคณะ 1977; Liu และ Shih, 1983)

2. Karyotype

Liu และ Shih (1983) ได้ศึกษาการแปรทาง karyotype ใน suspension cell 4 clone ด้วยกันคือ F156, F164, F166 และ F167 โดยพิจารณาอัตราส่วนระหว่างโครโมโซมแท่งยาว : โครโมโซมแท่งสั้น จากผลการทดลองพบว่า เกิดการแปรทาง karyotype ในต้นที่เจริญจาก F156 และ F166 สูงกว่าในต้นที่เจริญจาก F164 และ F167 การแปรทาง karyotype ในเซลล์มีมากเท่าใด การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในอ้อยที่ยักนำจากคัลลัสมีมากขึ้นเท่านั้น

นอกจากนี้ยังพบ dicentric chromosome ในอ้อยที่เจริญจาก F156 และ F166 มากกว่าอ้อยที่เจริญจาก F164 และ F167 Dicentric chromosome อาจเกิดจาก breakage fusion bridge cycle ทำให้เกิดการแปรทาง karyotype ได้เช่นกัน (Liu และ Shih, 1983)

3. สัณฐานวิทยา

Heinz และคณะ (1976, 1972) ได้ศึกษาการแปรในเนื้อเยื่อที่เลี้ยงของอ้อยพันธุ์ H37-1933 และ H50-7209 พบว่า การแปรทางสัณฐานวิทยาของอ้อยพันธุ์ H50-7209 มีถึง 34.8 เปอร์เซ็นต์ มากกว่าอ้อยพันธุ์ H37-1933 ซึ่งมีเพียง 12.1 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ศึกษา ได้แก่ auricle length, dewlap, สีกาบใบ, กลุ่มขน และสีลำต้น เป็นต้น ในไต้หวันได้มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาในอ้อยที่เจริญจากคัลลัสในลายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าอ้อยที่มาจาก F156 มีการแปรสูงที่สุด (Liu และ Chen 1975, 1978) เชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา การเปลี่ยนแปลงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ genotype ที่เปลี่ยนไป การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของโครโมโซม บางครั้งอาจไม่เพียงพอที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา มีการเปลี่ยนแปลง

ทาง genetic complement แต่ไม่แสดงออกทาง phenotype ก็ได้ ซึ่ง Liu และ Shih (1985) กล่าวว่า เกิดการแปรในเซลล์มากเท่าใด ก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะวิทยามากขึ้นเท่านั้น

4. ความสามารถต้านทานโรค

หลังจากที่ Nickell พบ chromosome mosaic ในปี 1960 นักวิทยาศาสตร์ ชาวฟิลิปปินส์ จึงได้เริ่มทำการทดลองในทำนองเดียวกัน พบว่าลักษณะทาง chromosomal mosaic สามารถถ่ายทอดสู่รุ่นต่อไปได้ Krishnamurthi (1974) ได้เลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ Pindar 38 subclone พบว่ามี 4 subclone มีความสามารถต้านทานโรคฟิลิปปินส์และราน้ำค้างสูงมาก แม้ว่าปลูก subclones ทั้ง 4 นี้ ในพื้นที่ 4 แห่งและทดสอบโรคฟิลิปปินส์และราน้ำค้างทุกปี subclones เหล่านี้ ยังคงสามารถต้านทานโรคได้ตลอดมาเป็นเวลา 5 ปี ติดต่อกัน ในไต้หวันได้ปรับปรุงหาพันธุ์ต้านทานโรคอยู่ตลอดเวลานับตั้งแต่ปี 1970 โรคแส้ดำเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งในไต้หวันเพราะทำลายผลผลิตนับเป็นมูลค่ามหาศาล อ้อยพันธุ์ F177 เป็นอ้อยอันดับสองของไต้หวันที่ให้ผลผลิตสูง คิดเป็น 10.8 เปอร์เซ็นต์ ของอ้อยในไต้หวันทั้งหมด แต่ไวต่อโรคแส้ดำมาก ในการแก้ไขปัญหานี้ ได้เลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ F177 แล้วคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคแส้ดำ พบว่าสายพันธุ์ 76-5530 แสดงอาการเป็นโรคน้อยที่สุด คือ 43.8 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ F177 เป็นโรคถึง 88.2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังได้มีการทดสอบหาพันธุ์ต้านทานโรค eye spot ซึ่งเกิดจากเชื้อรา Helminthosporium sacchari อ้อยที่เกิดจากเนื้อเยื่อพันธุ์ Q101 สามารถต้านทาน helminthosporoside toxin ได้สูงมาก (Larkin และ Scowcroft, 1983)

5. ลักษณะแปรอื่น ๆ

5.1 Isoenzyme pattern Heinz และคณะ (1971, 1972 ได้ศึกษา isoenzyme pattern ได้แก่ peroxidase, amylase และ transiminase ของอ้อยพันธุ์ H37-1933 และ H50-7209 พบว่า อ้อยที่เจริญจาก H50-7209 (chrmosomal mosaic) มี isoenzyme pattern ต่างจากต้นเดิมถึง 80.9 เปอร์เซ็นต์ แต่อ้อยที่เจริญจาก H37-1933 ซึ่ง stable กว่า ต่างจากต้นเดิมเพียง 31.0 เปอร์เซ็นต์ และลักษณะทางลักษณะวิทยาไม่มีความสัมพันธ์กับ isoenzyme pattern clone ใดที่มีลักษณะ

วิทยาต่างกันอาจมี isoenzyme pattern เหมือนกัน และในทางกลับกัน clone ใดที่มีลักษณะวิทยาเหมือนกันอาจมี isoenzyme pattern ต่างกันได้ ต่อมา Liu และ Chen (1977) ได้ศึกษา esterase zymogramm ในอ้อยที่มาจาก F164 และ F156 คือ 70-6132 และ 70-6069 ตามลำดับพบว่า 70-6132 มีแถบหายไป 2 แถบ แต่ 70-6069 มีแถบเพิ่มขึ้น 2 แถบ

5.2 <u>ลักษณะทางเกษตร</u> อ้อยที่เจริญจากเนื้อเยื่อบางต้นมีลักษณะทางเกษตรดีกว่าต้นเดิม เช่น มีผลผลิตต่อไร่ ปริมาณน้ำตาล และจำนวนลำสูงกว่า F164 ซึ่งเป็นต้นเดิม 32, 34 และ 6 เปอร์เซ็นต์ และยังสูงกว่า F160 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่ดีที่สุดในสมัยเดียวกันถึง 20, 16 และ 2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Liu และ Chen, 1977; Liu, 1981) ส่วน 74-3216 มีผลผลิตต่อไร่ ปริมาณน้ำตาลและจำนวนลำสูงกว่า F160 ซึ่งเป็นต้นเดิม 5, 2 และ 14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ใน 71-4829 และ 75-3070 ซึ่งเป็นอ้อยที่เจริญจากเนื้อเยื่อมีเปอร์เซ็นต์ sucrose สูงกว่าต้นเดิม คือ H37-1933 และ F160 อย่างมีนัยสำคัญตามลำดับ (Liu, 1981) นอกจากนี้ ยังพบว่า subclone ของพันธุ์ Pindar มีอัตราการงอกเร็วกว่าต้นเดิมมากภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม . 50 เปอร์เซ็นต์ของ subclone งอกภายใน 7 วัน ซึ่งต้นเดิมงอกช้ากว่า 3 วัน และ Pindar ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกือบเป็นหมัน ผลิตละอองเกสรตัวผู้หรือเมล็ดน้อยมาก แต่ Pindar 70-31 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็น male fertile (Krishnamurthi, 1977)

กลไกการเกิดมิวเตชันในธรรมชาติเกิดจาก tautomeric shift (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2523; หัทยา ปริญญารักษ์ และคณะ, 2524; Strickberger, 1968) โดยปกติโมเลกุลของเบสมีได้อยู่นิ่งเฉย มีการจัดอิเลคตรอนภายในโมเลกุลทำให้แยนที่จับอยู่ระหว่าง base (H-bond) เปลี่ยนแปลงไป (Strickberger, 1968; หัทยา ปริญญารักษ์ และคณะ, 2524) เช่น ไทมีน ส่วนใหญ่อยู่ในรูป keto form แต่อาจอยู่ในรูปของ enol form ได้ โดยการย้ายโปรตอนหรือไฮโดรเจนอะตอมจากไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 ไปอยู่ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ทำให้มีความสามารถจับกับกัวนีนต่อมากัวนีนจึงจับคู่กับไฮโดรอีน ได้คู่เบส กัวนีน-ไฮโดรอีน แทนที่ อดีนีน-ไทมีน (Strickberger, 1968; Jenkins, 1975; ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ 2523; หัทยา ปริญญารักษ์ และคณะ, 2524) ดังแผนภาพในหน้าต่อไป

A-T (Keto) ปกติ

↓

A-T (enol)

↓

G-T (enol)

↓

G-C base pair substitution

ในทางกลับกัน keto form ของกัวนีน ถ้าเปลี่ยนเป็น enol form ก็สามารถจับคู่กับ Keto form ของไทมีนได้เช่นเดียวกัน (ทัทยา ปริญญารักษ์, 2524) ดังแผนภาพข้างใต้

C-G (keto)

↓

C-G (enol)

↓

T-G (enol)

↓

T-A Base pair substitution

นอกจากนี้ tautomeric shift ยังทำให้ amino form ของอดีนีนเปลี่ยนเป็น imino form โดยไฮโดรเจนอะตอมย้ายจากไนโตรเจนตำแหน่งที่ 6 มายังไนโตรเจนตำแหน่งที่ 1 ทำให้ imino-adenine สามารถจับคู่กับไซโตซีนได้ (Strickberger, 1968; ทัทยา ปริญญารักษ์ และคณะ 2524) ดังแผนภาพข้างใต้

T-A (amino)

↓

T-A (imino)

↓

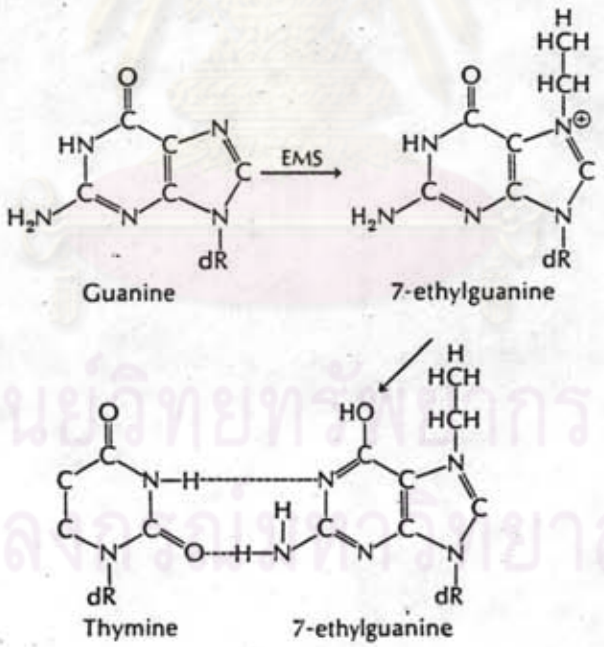
C-A

↓

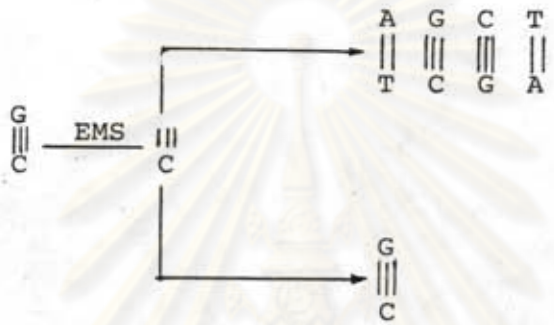
C-G base pair substitution

จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงแบบ tautomeric ส่วนใหญ่เปลี่ยนแบบ transition จากกลไกนี้จึงมีผู้พยายามหาสารเคมีเร่งให้เกิดการแทนที่เบสเช่นนี้ สารเคมีเหล่านี้ได้แก่ base analoque และสารเคมีที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางเคมีของเบส ได้แก่ กรดไนตรัส, ไฮดรอกไซลามีน และสารกลุ่มแอลคิล (alkylating agent) ทำให้เกิดมิวเตชันโดยการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของเบส ethyl methanesulphonate (EMS) เป็นสารมิวตาเจนที่แรงที่สุดตัวหนึ่งในกลุ่มแอลคิล EMS เป็นสารที่เติม ethyl group ($-C_2H_5$) ที่ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 7 ของกัวนีน ทำให้ได้ 7-ethylguanine ซึ่งทำหน้าที่คล้ายอดีนีน 7-ethylguanine นี้สามารถจับคู่กับไทมีนได้ เกิดการสับเปลี่ยนเบสแบบ transition (Strickberger, 1968; Jenkin, 1975) จากรูปข้างใต้แสดงผลของ EMS ต่อการจับคู่ของเบส

Ethyl methanesulphonate mutagenesis



นอกจากนี้ EMS ยังทำให้เกิด depurination[1] เป็นการรบกวน DNA replication โดยทำให้กัวนีนขาดหายไป เกิดช่องว่างบน DNA ดังนั้น เบสชนิดหนึ่งชนิดใดสามารถเข้าแทนที่กัวนีนได้ เมื่อสิ้นสุดการแบ่งตัว ก็อาจได้คู่เบส A-T, T-A, C-G หรือ G-C คู่หนึ่งคู่ใดแทน G-C การแทนที่ของคู่เบส T-A และ C-G เป็นการเปลี่ยนแบบ transversion[2] แต่การแทนที่ของ A-T เป็นการเปลี่ยนแบบ transition ส่วนคู่เบส G-C ยังคงเหมือนเดิม (ไพศาล เหล่าสุวรรณ และคณะ, 2523) ดังแผนภาพข้างใต้




ส่วนใหญ่มักใช้สาร EMS ในไวรัส, ราสีม่วง, แบคทีเรีย และแมลงหวี่ (ทัศนา ปริญญารักษ์ และคณะ, 2524) ในการชักนำให้เกิดมิวเตชันในเซลล์สัตว์ ได้มีการใช้รังสีเอ็กซ์และสารเคมีต่าง ๆ ได้แก่ methyl methanesulphonate และ ethyl methanesulphonate ในความเข้มข้น 50 ppm. (Heinz และคณะ, 1977) ต่อมา Liu (1981) ได้ใช้ EMS ในความเข้มข้น 0.02 M. และ 0.04 M. แช่เซลล์สัตว์พันธุ์ F160 และ F177 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ได้กล้าอ้อย 2 ต้น จากเซลล์ของอ้อยพันธุ์ F160 และได้กล้าอ้อย 1 ต้นจากเซลล์ของอ้อยพันธุ์ F177 ปรากฏว่าทั้ง 3 ต้นมีลักษณะทางเกษตรเหมือนต้นเดิม

---

[1]depurination เป็นขบวนการที่ดึงเบสกลุ่ม purine ออกจากสาย DNA

[2]transversion เป็นขบวนการแทนที่เบสชนิดต่างกัน เช่น แทน purine ด้วย pyrimidine

009731

โรคแส้ดำ

โรคแส้ดำหรือบางครั้งเรียกว่า โรคเขม่าดำ โรคดอกรูป โรคราดำ โรคยอดดำ โรคดอกฟูปลาย เป็นโรคที่สำคัญที่สุดในเขตปลูกอ้อยภาคกลางและระบาดไปทั่วประเทศ ทำความเสียหายให้แก่ประเทศปีละหลายร้อยล้านบาท พบโรคแส้ดำครั้งแรกที่ประเทศนาตาล ประมาณปี ค.ศ. 1877 โดยทำลายอ้อยจีน (china cane) จนเกือบสูญพันธุ์ (Martin และคณะ, 1961; ธนาคร จารุพัฒน์ และคณะ, 2526) ในประเทศไทยพบโรคนี้เมื่อ พ.ศ. 2506 ซึ่งมักพบในอ้อยตอมากกว่าอ้อยปลูกใหม่ โดยเป็นกับอ้อยแทบทุกพันธุ์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง NCo310 และ Co419 ซึ่งไวต่อโรคแส้ดำมาก (ธนาคร จารุพัฒน์ และคณะ, 2526)

โรคแส้ดำในอ้อยเป็น true smut อยู่ใน Class Basidiomycetes Order Ustilaginales Family Ustilaginaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า Ustilago scitaminea Sydow (Martin และคณะ, 1961, Westeott, 1959) U. scitaminea สามารถเจริญในรูปของ saprophyte ในที่ที่มีสารอินทรีย์สูง ๆ หรือในอาหารสังเคราะห์ โดยอยู่ในรูปของ sporidia (Westeott, 1951; Liu และ Teng, 1974; สุวนิตย์ แวงวรรณ, 2524) ในแต่ละประเทศหรือแต่ละเขตปลูกอ้อยพบว่าอ้อยพันธุ์เดียวกันอาจตอบสนองต่อโรคแส้ดำต่างกัน เช่น พันธุ์ NCo310 ไวต่อโรคแส้ดำมากในหลายประเทศ เช่น บราซิล โรดีเซีย และไทย ฯลฯ แต่กลับเป็นพันธุ์ที่ต้านทานในประเทศฟิลิปปินส์ เคนยา และอินเดีย เนื่องจากมี race หรือ strain ต่างกัน ในแต่ละ race นั้น มีคุณสมบัติทางสัณฐานและสรีระเหมือนกัน แต่คุณสมบัติในการทำให้เกิดโรคต่อพันธุ์อ้อยต่างกัน จึงใช้คุณสมบัตินี้แยก race ได้ ในไต้หวันแบ่ง U. scitaminea เป็น 2 race คือ 1 และ 2 NCo310 นั้นไวต่อ race 1 แต่ต้านทานต่อ race 2 ในทางกลับกัน F134 นั้นไวต่อ race 2 แต่กลับต้านทานต่อ race 1 (Liu และ Teng, 1974) ในฮาวายพบว่า U. scitaminea มี 2 race เช่นเดียวกัน คือ A และ B อ้อยพันธุ์ H50-7209 H57-5062 และ H59-3775 ต้านทานต่อ race A แต่ไวต่อ race B ส่วน H48-160 นั้นไวต่อ race A แต่ต้านทาน race B (Comstock และ Heinz, 1977) ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการจำแนก race ของ U. scitaminea (วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, ติดต่อส่วนบุคคล)

เชื้อราใน Order Ustilaginales ทั้งหมดเป็น parasite ของพืชตระกูลหญ้า เข้าทำลายพืช โดย teliospore หรือ chlamydospore ซึ่งมีรูปร่างกลมหรือค่อนข้างกลม ผิวเป็นหนาม สีน้ำตาลถึงดำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.2-10μ (เฉลี่ย 7.5μ) งอกได้ดีในที่มีความชื้นสูง โดยงอกให้ promyceliumก่อน มีผนังแบ่งตามขวาง 2-4 เซลล์ แต่ละเซลล์งอกให้ basidiospore หรือ sporidium ที่ปลายหรือด้านข้างของ promycelium sporidium แตกหน่อได้และเจริญให้เส้นใยยาว มีผนังกั้น เส้นใยบาง haustoria เข้าไปดูดน้ำเลี้ยงในเซลล์อ้อย ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสม chlamydospore จะงอก germ tube แทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อของพืชอาศัย (host) โดยตรง ทำหน้าที่เป็น haustoria ได้เช่นกัน (Martin และคณะ, 1961; สุวนิตย์ แวงวรรณ, 2524; ธนาคร จารุพัฒน์ และคณะ 2526) โดยปกติเส้นใยเจริญอยู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ แล้วบาง haustoria เข้าไปในเซลล์ ภายใน 2-3 สัปดาห์ผิวเคลือบสีของเซลล์อ้อยมีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นใยถูกสร้างมากมายระหว่างชั้น epidermis และ central portion ต่อมาเส้นใยเหล่านี้สร้าง teliospore หรือ chlamydospore บน receptacle เล็ก ๆ เป็น microsorus ที่ยอดอ้อย เห็นเป็นลักษณะคล้ายแส้เรียวยาวยื่นออกมา มีเยื่อบาง ๆ สีขาว ซึ่งเป็นส่วน epidermis ของอ้อย เมื่อเยื่อบาง ๆ นี้ปริออกเห็นสปอร์ผงสีน้ำตาลดำเกาะรวมกันอย่างหนาแน่น (สุวนิตย์ แวงวรรณ, 2524)

U. scitaminea เข้าทำลายเนื้อเยื่อเจริญได้ 3 วิธี คือ

1. เข้าทำลายจากภายนอก โดยสปอร์ที่เกาะติดกับเปลือกเมล็ดและท่อนพันธุ์ หรือที่มีอยู่แล้วในดินทำลายกล้าอ้อยขณะกำลังงอก

2. เข้าทำลายจากภายใน โดยเชื้อราที่อยู่ภายในเมล็ดและท่อนพันธุ์ทำลายกล้าอ้อยโดยตรง

3. เข้าทำลายเนื้อเยื่อเจริญ เช่น ปลายราก ปลายยอด tassel หรือ young ear (Westeott, 1959; Martin และคณะ 1961)

อาการของอ้อยที่เป็นโรคแส้ดำมีลักษณะแคระแกรน ลำต้นผอม ข้อสั้น ต้นเตี้ย ใบลีบแคบเล็ก แตกกอมากผิดปกติดูคล้ายตะไคร้ ที่ยอดพบลักษณะคล้ายแส้ แส้มีความยาวตั้งแต่ 2-3 นิ้ว จนถึงหลายฟุต เป็นแท่งตรง โค้ง คดงอ หรือหดย่นก็ได้ แส้เป็นเส้นเดียว

ไม่แตกล่ายา แกนกลางเป็นพาเรนไคมาและ fibrovascular tissue มี chlamydospore หุ้มอยู่เป็นจำนวนมากจนดูเป็นแผ่นสีดำ และมีเยื่อบาง ๆ หุ้ม chlamydospore อีกชั้นหนึ่ง (Martin และคณะ, 1961)

การแพร่กระจายของเชื้อราส่วนใหญ่โดยลม ท่อนพันธุ์อาจได้รับเชื้อโดยลมหอบสปอร์มาปะทะโดยตรง เมื่อเชื้อราเข้าทำลายเนื้อเยื่อเจริญของตาโดย chlamydospore เกาะทางด้านหลังของใบเกล็ดที่หุ้มตาอยู่ แล้วงอกเส้นใยเข้าสู่เซลล์ ตาอ่อนถูกเชื้อเข้าทำลายได้ง่ายกว่าตาที่มีอายุแก่กว่า (Yamauchi และ Uehara, 1978) หลังจากระยะนี้แล้ว chlamydospore จะพักตัวยั่วคราวจนกว่าท่อนพันธุ์ถูกนำไปปลูก เมื่อตาเจริญเป็นหน่ออ่อย เชื้อราก็เริ่มเจริญเช่นกัน นอกจากนี้เชื้อราที่อยู่ในดินหรือมากับน้ำโดยการชะล้างประทานหรือฝนพามาก็อาจทำลายอ้อยซ้ำได้ สปอร์งอกเมื่อดินชื้นเพียงพอ หลังจากนั้นถ้าไม่มีต้นอ้อยเชื้อราจะตายไป ถ้าดินแห้ง สปอร์มีชีวิตอยู่ได้ 2-3 เดือน (Martin และคณะ, 1961) ในประเทศไทยเริ่มปลูกอ้อยเมื่อเข้าฤดูฝน ต้นอ้อยจึงถูกเชื้อราเข้าทำลายได้ง่าย (วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุล, ติดต่อส่วนบุคคล)

แมลงบางชนิดอาจช่วยแพร่กระจายสปอร์ได้เช่น Endomychid beetle โดยเก็บสปอร์ไว้ที่ตัว U. scitaminea นอกจากทำลายต้นอ้อยแล้วยังทำลายพืชตระกูลหญ้าอื่นได้อีก เช่น Imperata arundinaceae, Imperata cylindrica, Erianthus saccharoides, Sorghum vulgare และหญ้าป่าอีกหลายชนิดในอัฟริกาตะวันออก (Martin และคณะ, 1961; Latiza, 1980)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การป้องกันกำจัดและควบคุมโรคแส้ดำ

โรคแส้ดำนับเป็นโรคหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการปลูกอ้อยมาก ได้มีผู้ศึกษาวิธีป้องกันกำจัดและควบคุมโรคนี้หลายวิธี (Martin และคณะ, 1961, สวนิตย์ แวงวรรณ 2524; ธนาคร คารุพัฒน์, และคณะ 2526) ซึ่งสรุปได้ดังนี้

1. กำจัดส่วนของต้นหรือท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคเพื่อป้องกันการกระจายของสปอร์
2. คัดเลือกท่อนพันธุ์ที่ไม่เป็นโรคก่อนปลูก
3. ทำลายเชื้อราที่ติดมากับท่อนพันธุ์ก่อนปลูก

4. ทำเขตกรรมโดยปลูกพืชหมุนเวียนและกำจัดวัชพืช

5. ใช้พันธุ์ต้านทานโรค

การใช้พันธุ์ต้านทานเป็นวิธีที่ให้ผลดีที่สุด ส่วนใหญ่อ้อยพันธุ์เศรษฐกิจไวต่อโรคแล้ดำมาก พบว่าในอ้อยป่า S. spontaneum โดยทั่วไปต้านทานโรคได้ดี ยกเว้นอ้อยป่าในอินเดียและฟิลิปปินส์ (Martin และคณะ, 1961; Latiza, 1980) Martin และคณะ (1961) เชื่อว่าความต้านทานต่อโรคขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของตา ซึ่งเป็นการป้องกันตัวตามธรรมชาติ ไม่เกี่ยวกับ metabolism ภายในต้นอ้อย ในประเทศอาร์เจนตินา โรดีเซีย ปารากัวและเมอริเชียส สามารถควบคุมโรคแล้ดำได้โดยใช้พันธุ์ต้านทาน ในประเทศไทย อ้อยที่พอจะต้านทานโรคนี้ได้คือ POJ2878 แต่เป็นพันธุ์ที่ไวต่อโรคที่สุดในฟิลิปปินส์ (ธนาคร จารุพัฒน์ และคณะ, 2526)

<u>เขตการแพร่ระบาดของโรคแล้ดำในประเทศไทย</u>

จากรายงานของ ธนาคร จารุพัฒน์ และคณะ (2526) ได้สรุปขอบเขตการแพร่ระบาดของโรคแล้ดำในอ้อยไว้ดังนี้

| | |
|---|---|
| ภาคเหนือ | กำแพงเพชร ลำปาง อุตรดิตถ์ |
| ภาคกลาง | กาญจนบุรี นครปฐม ประจวบคีรีขันธ์ ราชบุรี สุพรรณบุรี |
| ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ | ขอนแก่น อุดรธานี |
| ภาคตะวันออก | ชลบุรี ระยอง |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย