บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเขตร้อน ชอบอากาศร้อนและชุ่มชื้นมีถิ่นกำเนิดอยู่แถบหมู่เกาะนิวกินีทางตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของโลก อ้อยปลูกกันมากในประเทศบราซิล คิวบา อินเดีย แอฟริกาใต้ ออสเตรเลีย อินโดนีเซีย ไต้หวันและประเทศไทย (เกษม, 2544) ในปี 2544/45 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูก 6.32 ล้านไร่ (กรมวิชาการเกษตร, 2547) โดยพื้นที่ปลูกอ้อยส่วนใหญ่อยู่ในเขตภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพื่ออุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล โรคใบขาวของอ้อยเป็นโรคที่มีความสำคัญและเกิดขึ้นอย่างกว้างขวางในพื้นที่ปลูกอ้อยของประเทศไทย ทำความเสียหายรุนแรงต่อผลผลิตในพื้นที่ที่มีการระบาดมากไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลย (พรทิพย์, 2542ก) จากการสำรวจปัญหาโรคใบขาวในไร่อ้อยเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบว่า อำเภอกุมภวาปี และอำเภอศรีธาตุ จังหวัดอุดรธานี มีพื้นที่การระบาดของโรคใบขาวของอ้อยประมาณ 20,000 ไร่ อำเภอคูเมือง อำเภอสตึก และอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ มีพื้นที่การระบาดประมาณ 50,000 ไร่ และ กิ่งอำเภอผาขาว จังหวัดเลย มีพื้นที่ระบาดประมาณ 21,000 ไร่ (พรทิพย์ และคณะ, 2540; พรทิพย์, 2542ก)

ในระยะแรกของการพบโรคใบขาวในอ้อย เคยมีความเข้าใจว่าโรคชนิดนี้มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส เนื่องจากไม่พบร่องรอยของการมีเชื้อชนิดอื่น จากการพิสูจน์สาเหตุของโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบเชื้อจุลินทรีย์ที่มีลักษณะคล้ายแบคทีเรียขนาดเล็กแต่เป็นเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์หุ้มอีกชั้น มีเพียงเยื่อบางๆ หุ้มองค์ประกอบของเซลล์ไว้เท่านั้น ทำให้มีรูปร่างไม่แน่นอน โดยพบลักษณะรูปร่างตั้งแต่กลมไปจนถึงลักษณะรีหรือรูปไข่อยู่ภายในท่อลำเลียงอาหารของใบอ้อย นอกจากนี้ยังพบเชื้อที่มีลักษณะใกล้เคียงกันนี้ในเซลล์ท่อลำเลียงอาหารของอ้อยป่า (*Saccharum spontaneum* L.) ที่แสดงอาการโรคใบขาวเช่นกัน โรคใบขาวนอกจากพบในอ้อยแล้วยังพบในพืชตระกูลหญ้า เช่น หญ้าแพรก (*Cynodon dactylon* [L.] Pers.) หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* [L.] Beauv.) (Wongkaew *et al*., 1998; Marcone *et al*., 1997) หญ้าตีนติด (*Brachiaria reptans* Gard) หญ้าขจรจบดอกเล็ก (*Pennisetum pedicellatum* Trin.) หญ้าตีนกา (*Brachiaria distachya* Stapf) หญ้าชันกาศ (*Panicum repens* L.) หญ้ามาเลเซีย (*Axonopus compressus* [Swartz] Beauv.) และหญ้าตีนนก (*Digitaria ciliaris* [Retz] Koch.) และมี

รายงานว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา (Phytoplasma) (นงลักษณ์, 2536; รุ่งโรจน์, 2543) โดยเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยนั้นสามารถถ่ายทอดผ่านทางท่อนพันธุ์ และมีเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) เป็นแมลงพาหะจึงทำให้เกิดการระบาดของโรคใบขาวของอ้อยอย่างกว้างขวาง (Chen, 1978)

เนื่องจากหญ้าแพรกเป็นวัชพืชที่พบอยู่ทั่วไป และพบโรคใบขาวซึ่งมีอาการคล้ายคลึงกับโรคใบขาวของอ้อยเกิดขึ้นกับหญ้าแพรก จึงสันนิษฐานว่าหญ้าแพรกอาจเป็นแหล่งสะสมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว ภายหลังได้มีการพิสูจน์พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของหญ้าแพรกและอ้อยเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีพันธุกรรมใกล้ชิดกัน (Sdoodee *et al*., 1999) ต่อมามีรายงานว่าแมลงในวงศ์ Cicadellidae ซึ่งดักจับจากหญ้าแพรกที่ปรากฏโรคใบขาวเองตามธรรมชาติในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวได้ เนื่องจากเมื่อปล่อยให้แมลงดังกล่าวดูดกินหญ้าแพรกปกติ พบว่าสามารถทำให้ต้นหญ้าเกิดอาการโรคใบขาวได้ (ฐิตินันท์, 2543) และเมื่อทำการตรวจเชื้อโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (Polymerase Chain Reaction, PCR) หรือเทคนิคพีซีอาร์ในแมลงที่ดักจับมาจากหญ้าแพรกที่มีอาการโรคใบขาวพบเชื้อไฟโตพลาสมา (ภรณี, 2543) จากลักษณะรูปร่างของแมลงพาหะคล้ายคลึงกับแมลงจำพวก *Exitianus* sp. ขณะเดียวกันได้มีรายงานการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวในแมลง *Exitianus indicus* ที่ดักจับมาจากแปลงปลูกอ้อยที่เกิดโรคใบขาวในจังหวัดขอนแก่นและอุดรธานี (พรทิพย์, 2542ก)

ดังนั้นเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาวเป็นแหล่งสะสมเชื้อไฟโตพลาสมาที่จะกระจายไปสู่อ้อยหรือไม่ จึงได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในหญ้าแพรกไปสู่อ้อย และในทางกลับกันถ่ายทอดเชื้อใบขาวจากอ้อยไปสู่หญ้าแพรก โดยใช้แมลงพาหะ *E. indicus*

การตรวจเอกสาร

โรคใบขาวของอ้อย

โรคใบขาวของอ้อยเป็นโรคที่มีความร้ายแรงโรคหนึ่งของอ้อยในประเทศไทย (พรทิพย์, 2542ก) และในประเทศทางแถบเอเชียตะวันออกและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Nakashima *et al*., 2001) รายงานการพบโรคครั้งแรกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2495 ซึ่งพบในอ้อยพันธุ์ Nco.421 ที่อำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง (อนุสรณ์, 2536) และพบการแพร่ระบาดต่อมาในพื้นที่จังหวัดอุตรดิตถ์ กำแพงเพชร ระยอง ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ (ลักษณ์ และคณะ, 2528) และมีรายงานการระบาดอย่างรุนแรงของโรคใบขาวในอำเภอกุมภวาปีและอำเภอศรีธาตุ จังหวัดอุดรธานี มีพื้นที่เสียหายถึง 50,000 ไร่ ในปี พ.ศ.2532 (อนุสรณ์, 2536) ปัจจุบันยังพบการแพร่ระบาดของโรคในพื้นที่ปลูกอ้อยทั่วประเทศ ในทางภาคเหนือเช่น จังหวัดกำแพงเพชร อุตรดิตถ์ สุโขทัย เชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน ภาคกลางในจังหวัดกาญจนบุรี สุพรรณบุรี ชัยนาท นครสวรรค์ ลพบุรี สิงห์บุรี อุทัยธานี นครปฐม ราชบุรี เพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ภาคตะวันออกในจังหวัดชลบุรี ระยอง ปราจีนบุรี สระแก้ว ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดอุดรธานี ชัยภูมิ มุกดาหาร นครพนม กาฬสินธุ์ อุบลราชธานี ยโสธร อำนาจเจริญ บุรีรัมย์ นครราชสีมา และ เลย เป็นต้น (พรทิพย์, 2542ก)

ในต่างประเทศพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อยมีรายงานการพบโรคใบขาวในครั้งแรกในปี ค.ศ. 1958 ในอ้อยพันธุ์ Nco 310 ที่เมือง Pingtung, Kaohsiung,Tainan และ Chiyi ทางตอนใต้ของประเทศไต้หวันและมีลักษณะอาการใบขาวเช่นเดียวกับที่พบในประเทศไทย (Lee, 1978) ในประเทศญี่ปุ่นพบโรคใบขาวของอ้อยที่เกาะ Tanegashima เมื่อปี ค.ศ. 1986 ต้นอ้อยที่เป็นโรคใบจะมีสีขาวซีดหรือมีลายสีขาวตามแนวเส้นของใบ การแพร่กระจายของโรคไม่รุนแรง (Arai and Ujihara, 1989) ส่วนประเทศอื่นๆ ที่มีการปลูกอ้อยในภูมิภาคเอเชีย และแอฟริกา ได้แก่ ประเทศอินเดีย พม่า ศรีลังกา และซูดาน มีรายงานการเกิดโรคที่มีลักษณะคล้ายโรคใบขาวแต่มีชื่อที่แตกต่างกันไป เช่น sugarcane grassy shoot disease หรือ yellowing disease หรือ albino disease คาดว่าอาจเป็นโรคใบขาวของอ้อย (sugarcane white leaf) ชนิดเดียวกับที่พบในประเทศไทย ไต้หวัน และบังคลาเทศ (Agnihotri, 1983; Rishi and Chen, 1989)

ลักษณะอาการของโรคใบขาวของอ้อยจะแสดงอาการผิดปกติตั้งแต่ระยะเริ่มงอก จนถึงระยะเก็บเกี่ยว โดยใบอ้อยมีขนาดเล็กและสั้นลงจนถึงเป็นฝอย มีรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงสีของใบอันเนื่องมาจากการทำลายคลอโรฟิลด์ตั้งแต่สีเขียวของใบซีดจางลงกลายเป็น สีเหลือง สีขาวปน

เหลืองไปจนมีสีขาวทั้งใบ ตั้งแต่ยอดจนทั่วทั้งต้น ต้นอ้อยที่แสดงอาการโรครุนแรงจะแตกตาข้างและมีจำนวนหน่อมากกว่าปกติ มีจำนวนลำในกอน้อย บริเวณโคนต้นมีหน่ออ้อยที่เจริญขึ้นมาพร้อมกับมีใบขนาดเล็กและสีขาว โรคใบขาวที่เกิดกับต้นอ่อนที่งอกจากอ้อยตอ หรือเจริญจากท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้อ หรือติดเชื้อในระยะต้นอ่อนแรกงอก มีอาการรุนแรงมากกว่าอ้อยที่โตแล้ว (พรทิพย์, 2542ข) ต่อมาอ้อยจะแคระแกร็น ลำต้นสั้น ปล้องถี่ แตกหน่อมากจนคล้ายต้นตะไคร้ และไม่สร้างลำต้น (รงรอง และคณะ, 2543) อ้อยจะแสดงอาการใบขาวชัดเจนถ้าอุณหภูมิอยู่ในช่วง 23 - 35 องศาเซลเซียส (Pan and Yang, 1971)

นอกจากนี้ในอ้อยบางกออาจมีอาการแฝง คือมีการติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการเป็นโรคที่ชัดเจน ต้นอ้อยมีการเจริญเติบโตและมีใบสีเขียวเหมือนอ้อยปกติ ซึ่งการแสดงอาการของโรคขึ้นอยู่กับอายุของอ้อยขณะที่ติดเชื้อ พันธุ์อ้อย ความแข็งแรงคุณภาพของท่อนพันธุ์ และปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในท่อนพันธุ์ อุณหภูมิ และสภาพภูมิอากาศ (ยุพา และ สกล, 2543)

โรคใบขาวของหญ้า ในพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อยพบว่ามีพืชตระกูลหญ้าหลายชนิด แสดงอาการใบขาวเหมือนกับอาการของอ้อย และมีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมาเช่นเดียวกัน พืชตระกูลหญ้าเหล่านี้อาจจะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อย ซึ่งสามารถกลับมาติดเชื้อได้อีกครั้ง (Sarindu and Clark, 1993; Hanboonsong *et al*., 2000)

สำหรับโรคใบขาวของพืชตระกูลหญ้าที่มีรายงานการพบในประเทศไทยได้แก่โรคใบขาวของหญ้าแพรก (*Cynodon dactylon* [L.] Pers.) หญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium* [L.] Beauv.) (Wongkaew *et al*., 1998; Marcone *et al*., 1997) หญ้าตีนติด (*Brachiaria reptans* Gard) หญ้าขจรจบดอกเล็ก (*Pennisetum pedicellatum* Trin.) หญ้าตีนกา (*Brachiaria distachya* Stapf) หญ้าชันกาศ (*Panicum repens* L.) หญ้ามาเลเซีย (*Axonopus compressus* [Swartz] Beauv.) และหญ้าตีนนก (*Digitaria ciliaris* [Retz] Koch.) (นงลักษณ์, 2536; รุ่งโรจน์, 2543)

Marcone และคณะ (1997) ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าแพรกใบขาวในอิตาลีซึ่งมีลักษณะอาการเหมือนกับที่พบในประเทศไทย ไต้หวัน และซูดาน ซึ่งเกิดขึ้นบริเวณแปลงผักและผลไม้ และพื้นที่ที่ไม่ได้มีการเพาะปลูกในตอนกลางและตอนใต้ของประเทศ นอกจากนี้ยังพบหญ้าแพรกที่แสดงอาการใบขาวในประเทศปากีสถานอีกด้วย (Ahmad *et al*., 1995)

ลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้นกับพืชตระกูลหญ้า ใบหญ้ามีอาการซีดขาว แตกกอเป็นพุ่มใบเล็ก ไหล (stolon) สั้นและลำต้นใต้ดิน (rhizome) แคระแกร็น (Marcone *et al*., 1997; Sdoodee *et al*., 1999)

แมลงพาหะนำโรคใบขาว

มีการค้นพบเพลี้ยจักจั่นพาหะนำโรคใบขาวของอ้อยครั้งแรกที่ไต้หวันและได้ตั้งชื่อเพลี้ยจักจั่นชนิดนี้ว่า *Epitettix hiroglyphicus* Matsumura (Chan, 1973) แมลงชนิดนี้จัดอยู่ในวงศ์ Cicadellidae อันดับ Homoptera ภายหลังได้มีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura เพื่อเป็นเกียรติแก่ Matsumura ผู้ค้นพบแมลงพาหะดังกล่าว (ลักษณ์ และคณะ 2528; Rishi and Chen, 1989) และลักษณะการถ่ายทอดโรคใบขาวของอ้อยโดยเพลี้ยจักจั่น *M. hiroglyphicus* เกิดขึ้นโดยแมลงดูดกินเชื้อไฟโตพลาสมาจากต้นอ้อยที่เป็นโรค หลังจากแมลงรับเชื้อเข้าสู่ร่างกายแล้ว เชื้อไฟโตพลาสมาจะพักตัวในแมลงประมาณ 3-5 สัปดาห์ (Lee and Chen, 1972) หรืออาจสูงถึง 40 วัน โดยหมุนเวียนอาศัยอยู่ภายในร่างกายแมลง และพร้อมที่จะถ่ายทอดสู่พืชต้นใหม่ (Hanboonsong *et al.,*2000; Wayadande and Fletcher, 1995) แมลงจะใช้เวลาในการดูดกินน้ำเลี้ยงเพื่อถ่ายทอดโรคอย่างน้อยที่สุดประมาณ 30 นาที (Chen, 1978) อ้อยที่ได้รับเชื้อจะแสดงอาการของโรคใบขาวให้เห็นประมาณ 40 วัน หลังจากได้รับเชื้อ ในสภาพแวดล้อมปกติแมลงจะรับเชื้อได้ในตัวอ่อนระยะที่ 2 และ ระยะที่ 3 แล้วจะถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวเต็มวัย นอกจากนี้ยังพบว่าตัวเต็มวัยเพศเมีย และตัวอ่อนในระยะสุดท้ายมีอัตราการถ่ายทอดโรคได้สูงกว่าตัวเต็มวัยเพศผู้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชีววิทยาของแมลงเพศเมีย มีอายุยืนยาวกว่าเพศผู้ (Chen,1973) และในการทดลองถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวของอ้อยโดยแมลงพาหะ *M. hiroghyphigus* เมื่อใช้แมลงตัวเต็มวัย 5 ตัวต่อพืชทดสอบหนึ่งต้น พบว่าพืชทดสอบแสดงอาการใบขาวหลังการถ่ายทอดเชื้อ 3-6 เดือน (Lee, 1978)

ฐิตินันท์ (2543) พบว่าจากการสุ่มจับแมลงจากบริเวณหญ้าแพรกที่เป็นโรคใบขาว แล้วนำไปถ่ายทอดเชื้อลงบนหญ้าแพรกปกตินั้น พบว่าแมลงสามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของหญ้าแพรกได้ภายใน 6 สัปดาห์ โดยแมลงที่ทำให้เกิดการถ่ายทอดนั้น มีลักษณะปีกคู่หน้าใส มีลายเส้นปีกเป็นร่างแหสีน้ำตาล อก (thorax) มีจุดสีน้ำตาลเข้ม 2 จุด ส่วนอกปล้องแรก (pronotum) มีแถบสีน้ำตาล ลำตัวสีน้ำตาลอ่อน ขนาด 4.0 มิลลิเมตร ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับแมลง *Exitianus* sp.และ Blanche และคณะ (1999) พบว่าแมลง *Chiasmus varicolor* มีเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวของหญ้าแพรก แต่ในการทดลองแมลงไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวไปยังหญ้าแพรกปกติได้

วรรณภา และ ยุพา (2546) ได้ทำการสำรวจเพลี้ยจักจั่นชนิดต่างๆในแปลงปลูกอ้อย อำเภอกุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี ในระหว่างเดือนมีนาคม 2545 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ 2546 โดยใช้กับดักแสงไฟ พบแมลงเพลี้ยจักจั่นจำนวน 31 ชนิด นำมาตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว

ของอ้อย พบเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงเพลี้ยจักจั่นจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ *Balclutha* sp., *Bhatiaolivacea*, *Exitianus indicus*, *Matsumuratettix hiroglyphicus*, *Recilia* sp., *Recilia distinctus*, *Recilia dorsalis*, *Yamatotettix flavovittatus* และที่ยังไม่ระบุชนิดจำนวน 4 ชนิด

สำหรับเพลี้ยจักจั่น *E. indicus* ซึ่งมีศักยภาพเป็นแมลงพาหะของโรคใบขาว เนื่องจากมีการพบเชื้อดังกล่าวในร่างกายแมลงชนิดนี้จากรายงานของพรทิพย์ (2542ก) เป็นแมลงที่ช่วงวัฏจักรชีวิตประมาณ 45 วัน และมีอัตราการอยู่รอดในการเลี้ยงในกรงแมลงค่อนข้างต่ำประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยนั้น พบแมลงชนิดนี้ตั้งแต่กลางเดือนเมษายน ถึงต้นเดือนสิงหาคม

เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว

ไฟโตพลาสมาเป็นเชื้อสาเหตุของโรคใบขาวของอ้อยและพืชตระกูลหญ้ารวมทั้งหญ้าแพรก สำหรับชื่อไฟโตพลาสมาเป็นชื่อที่ใช้เรียกเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคขึ้นกับพืชแทนชื่อเดิมที่เรียกว่าจุลินทรีย์คล้ายมายโคพลาสมา (mycoplasma like organism,MLOs)ไฟโตพลาสมาเป็นชื่อที่ได้รับการรับรองให้เป็นชื่อสากลสำหรับเชื้อชนิดนี้ โดย International Committee on Systematic Bacteriology (ICBS) ในปี ค.ศ 1994 เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในวงศ์ Mycoplasmataceae อันดับ Mycoplasmatales ชั้น Mollicutes (พรทิพย์, 2544) เชื้อไฟโตพลาสมาเป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กมีลักษณะคล้ายแบคทีเรียแต่ไม่มีผนังเซลล์ (cell wall) เซลล์หุ้มด้วยเยื่อบาง (single trilaminar unite membrane) ภายในเซลล์ประกอบด้วย ไรโบโซม (ribosome) และเส้นใยโครมาทิน (chromatin) ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอ จากการตรวจดูเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเป็นโปรคาริโอทเซลล์ (prokaryotic cell) ที่มีรูปร่างกลม (spherical) จนถึงเป็นเส้น (filamentous) (นงลักษณ์, 2536) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 80-800 นาโนเมตร (Rishi and Chen, 1989) และขนาดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยพบในแมลงพาหะมีขนาดประมาณ 500-1500 นาโนเมตร (Hanboonsong *et al*., 2000) เชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุของโรคพืชเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถทำการแยกออกมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทั่วไปเชื้อไฟโตพลาสมาจะอาศัยเฉพาะในเซลล์ท่ออาหาร (phloem) (พรทิพย์, 2544; Rishi and Chen, 1989) ของพืชโดยประชากรเชื้อเกือบทั้งหมดอยู่ในเซลล์ท่อลำเลียงอาหาร (sieve tube element) (Kimura and Chareonridhi, 1975) และมีบางโอกาสที่อาจเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ข้างเคียง (companion cells) แต่เป็นเพียงส่วนน้อยมาก การที่เชื้อมีตำแหน่งจำเพาะของการอยู่อาศัยภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช อาจเนื่องมาจากเซลล์ท่ออาหารเป็นตำแหน่งรับการถ่ายเชื้อโดยตรงจากแมลงที่มี

พฤติกรรมการดูดกิน (sucking) นอกจากนี้ท่อลำเลียงอาหารของพืชยังเป็นเซลล์ที่มีผนังหนากว่าเซลล์ทั่วไป จึงอาจเป็นเหตุผลอีกประการหนึ่งที่ทำให้เชื้อมีการจำกัดอยู่เฉพาะบริเวณนี้ และเคลื่อนที่ไปยังส่วนต่างๆของพืชได้ตามแนวเส้นทางท่อลำเลียงอาหารเท่านั้น ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยมีการกระจายตัวของประชากรเชื้อในท่อลำเลียงอาหารของทุกส่วนของต้นพืช แต่พบปริมาณเชื้อมากที่สุดในท่ออาหารบริเวณส่วนที่เป็นลำต้น โดยเฉพาะส่วนที่ค่อนไปทางโคนต้นของพืช ส่วนปลายรากและปลายยอดมีปริมาณเชื้อน้อยที่สุด (Nakashima *et al*., 1994)

เนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมาไม่สามารถแยกเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงไม่สามารถหาคุณสมบัติของตัวเชื้อ (phenotypic character) เพื่อใช้จำแนกชนิดและจัดหมวดหมู่ ดังนั้นจึงนำข้อมูลทางพันธุกรรม (conseved gene) ของเชื้อไฟโตพลาสมามาเป็นหลักในการจัด ซึ่งไม่อิงกับคุณสมบัติภายนอก (phenotype) จากการวิเคราะห์ยีนที่เป็นรหัสของ 16S rRNA และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal protein (rp) ทำให้ไฟโตพลาสมาถูกจัดไว้ใน class Mollicutes และแยกออกเป็น 14 กลุ่ม (ดังตารางที่ 1) และในแต่ละกลุ่มอาจแยกเป็นกลุ่มย่อย (subgroup) การแยกกลุ่มย่อยใช้ข้อมูลความแตกต่างทางพันธุกรรมรวมกับคุณสมบัติทางชีววิทยา เช่น พืชอาศัย แมลงพาหะ และการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ ซึ่งสมาชิกในกลุ่มย่อยเกิดขึ้นจากความ แตกต่างทางด้านลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) ซึ่งมียีนพูล (gene pool) เดียวกัน แต่มีวิวัฒนาการซึ่งทำให้เกิดความแตกต่างขึ้น เนื่องจากได้ถูกแบ่งย่อยออกจากบรรพบุรุษ โดยการไปอาศัยในพืชต่างชนิดหรือมีแมลงพาหะต่างชนิดหรือเพราะการกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน (Davis and Sinclair, 1998)

เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยจัดอยู่ในกลุ่ม 16Sr XI (Rice yellow dwarf group) และจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16Sr XI-B ซึ่งเป็นเชื้อไฟโตพลาสมากลุ่มเดียวกับโรคกอตะไคร้ (Sugarcane grassy shoot) ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้พืชแสดงอาการใบซีดขาว หรือใบเหลือง ใบสีส้ม เนื่องมาจากการสูญเสียคลอฟิลด์ ส่วนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในหญ้าแพรกนั้นเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาคนละชนิดกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยจึงจัดอยู่ในกลุ่ม 16Sr XIV (Bermuda grass white leaf group) และจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16Sr XIV-A (Davis and Sinclair, 1998; Lee *et al*., 1998)

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกกลุ่ม และกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของ 16S rRNA gene และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal protein (rp)

กลุ่ม 16S rRNA (กลุ่มย่อย)	Phytoplasma (ชนิด)	พาหะ [a]	แหล่งที่พบ
16SrI (aster yellows group)			
I (A)	Tomato big bud (BB)	Unk	Arkansas
I (B)	Michigan aster yellows (MIAY)	Unk	Michigan
I (C)	Clover phyllody (CPh)	+	Canada
I (D)	Paulownia witches'-broom (PaWB)	+	Taiwan
I (E)	Blueberry stunt (BBS1)	Unk	Michigan
I (F)	Apricot chlorotic leafroll (ACLR-AY)	Unk	Spain
I (K)	Strawberry multiplier (STRAWB 2)	Unk	Florida
16SrII (Peanut witches'-broom group)			
II (A)	Peanut witches'-broom (Pn WB)	+	Taiwan
II (B)	Witches'-broom of lime(WBDL)	Unk	Arabian
	"*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia"	Unk	Peninsula
II (C)	Faba bean phyllody (FBP)	Unk	Sudan
II (D)	Sweet potato little leaf (SPLL)	Unk	Australia
16SrIII (X-disease group)			
III (A)	X-disease (CX)	+	Canada
III (B)	Clover yellow edge (CYE)	+	Canada
III (C)	Pecan bunch (PB)	Unk	Georgia
III (D)	Goldenrod yellows (GR1)	Unk	New York
III (E)	Spirea stunt (SP1)	Unk	New York
III (F)	Milkweed yellows (MW1)	Unk	New York
III (G)	Walnut witches'-broom (WWB)	Unk	Georgia
III (H)	Poinsettia branch-inducing (PoiB1)	Unk	United States
III (I)	Viginia grapevine yellows(YGYIII)	Unk	Virginia
16SrIV (Coconut lethal yellows group)			
IV (A)	Coconut lethal yellowing (LY)	Unk	Florida
IV (B)	Tanzanian coconut lethal decline (LDT)	Unk	Tanzania

ตารางที่ 1 (ต่อ) การจัดจำแนกกลุ่ม และกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของ 16S rRNA gene และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal protein (rp)

กลุ่ม 16S rRNA (กลุ่มย่อย)	Phytoplasma (ชนิด)	พาหะ [a]	แหล่งที่พบ
16SrV (Elm yellows group)			
V (A)	Elm yellows (EY1)	+	United States
V (B)	Cherry lethal yellows (CLY)	+	China
V (C)	Flavescence dor′ee (FD)	Unk	France
16SrVI (Clover proliferation group)			
VI (A)	Clover proliferation (CP)	+	Canada
VI (B)	“Multicipita” phytoplasma	Unk	Canada
16SrVII (Ash yellows group)			
VII (A)	Ash yellows (AshY)	Unk	New York
16SrVIII (Loofah witches’-broom group)			
VIII (A)	Loofah witches’-broom (LfWA)	+	Taiwan
16SrIX (Pigeon pea witches’-broom group)			
IX (A)	Pigeon pea witches’-broom (PPWB)	Unk	Florida
16SrX (Apple proliferation group)			
X (A)	Apple proliferation (AP)	Unk	Germany
X (B)	Apricot chlorotic leafroll (ACLR)	+	Italy
X (C)	Pear decline (PD)	+	Italy
X (D)	Spartium witches’-broom (SPAR)	Unk	Italy
X (E)	Black alder witches’-broom (BAWB)	Unk	Germany
16SrXI (Rice yellow dwarf group)			
XI (A)	Rice yellow dwarf (RYD)	+	Japan
XI (B)	Sugarcane white leaf (SCWL)	+	Thailand
XI (C)	Leafhopper-borne (BVK)	Unk	Germany

ตารางที่ 1 (ต่อ) การจัดจำแนกกลุ่ม และกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมของ 16S rRNA gene และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ribosomal protein (rp)

กลุ่ม 16S rRNA (กลุ่มย่อย)	Phytoplasma (ชนิด)	พาหะ [a]	แหล่งที่พบ
16SrXII (Stolbur group)			
XII (A)			
	Stolbur (STOL)[formerly group 16SrI, subgroup G]	+	Serbia
XII (B)	Australian grapeving yellow (AUSGY) ‘Candidatus Phytoplasma australiense’ [formerly group 16SrI,subgroup J]	+	
16SrXIII (Mexican periwinkle virescence group)			
XIII (A)	Mexican periwinkle virescence (MPV) [formerly group 16SrI,subgroup I]	Unk	Mexico
16SrXIV (Bermudargrass white leaf group)			
XIV (A)	Bermudargrass white leaf (BGLW)	+	Thailand

[a] + = พบแมลงพาหะ ; Unk = ไม่พบแมลงพาหะ

ที่มา : (Davis and Sinclair, 1998; Lee *et al*.,1998)

การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมา

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาปัจจุบันมีหลายวิธี และเทคนิคที่มีความแม่นยำสูง คือ เทคนิค พีซีอาร์ มาใช้ในการตรวจหาเป็นการตรวจหา ดีเอ็นเอ ของเชื้อไฟโตพลาสมาของโรคใบขาวในเซลล์พืชที่เป็นโรค โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อตรงช่วงบริเวณ 16S rRNA gene ซึ่งสาเหตุที่มีการนำเอาเทคนิค พีซีอาร์ มาใช้ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวนั้น เนื่องจากเป็นเทคนิคที่มีความไว และมีความเฉพาะเจาะจงสูง และเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่จำเพาะ โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลิเมอเรส (DNA polymerase) และมีไพร์เมอร์เป็นดีเอ็นเอท่อนสั้นๆ (Oligonucleotide primers) ยาวประมาณ 16-20 นิวคลีโอไทด์ 1 คู่ เป็นตัวเริ่มต้นในการสร้างดีเอ็นเอ (วิจารณ์, 2533) เทคนิคพีซีอาร์ เป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคของพืชอย่างกว้างขวาง โดยสามารถตรวจดีเอ็นเอของแบคทีเรีย รวมทั้งกลุ่มของเชื้อในชั้น มอลลิคิวท์ (Mollicute) ซึ่งมีกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมารวมอยู่ด้วย (Ahrens and Seemüller, 1992) เทคนิคพีซีอาร์ไม่เพียงแต่มีความไวสูง แต่ยังสามารถตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีอยู่ในปริมาณน้อยในพืชอาศัย หรือในแมลงพาหะได้ โดย Vegac และคณะ (1993) ได้ทำการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีปริมาณต่ำในเพลี้ยจักจั่นซึ่งดูดกินน้ำเลี้ยงของพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา ไพรเมอร์ที่มีรายงานการนำไปใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย และหญ้าโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ได้ประสบผลสำเร็จได้แก่ ไพรเมอร์ชุด SN910601 และ SN910501 ใช้อุณหภูมิรอบจำนวน 50 รอบ ผลผลิตที่ได้มีขนาด 1.4 กิโลเบส (Namba *et al*., 1993) ไพรเมอร์ชุด MLO_1 และ MLO_2 ได้ผลผลิตท้ายสุดจากการเตรียมพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ มีขนาด 1.35 กิโลเบส (Wongkaew *et al*., 1997) และไพรเมอร์ชุด P_1และ P_7 ผลผลิตท้ายสุดที่ได้จากการเตรียมพีซีอาร์ทั้งสิ้น 35 รอบ มีขนาด 1.8 กิโลเบส (Sdoodee *et al*., 1999) จากรายงานดังกล่าวพบว่าไพรเมอร์ แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อยีน 16S rRNA ที่บริเวณแตกต่างกัน ทำให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน (Sdoodee, 2001) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับจำนวนรอบของการพีซีอาร์ อย่างไรก็ตามผลผลิตของดีเอ็นเอที่ได้รับจากการพีซีอาร์จะมีปริมาณมากพอ เมื่อใช้อุณหภูมิรอบ (thermal cycler) จำนวน 24 รอบขึ้นไป (Ahrens and Seemüller, 1992) นอกจากไพรเมอร์แล้ว อุณหภูมิรอบนอกจากไพรเมอร์และอุณหภูมิรอบยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว โดยอุณหภูมิรอบที่เหมาะสมในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาว คือ 94 องศาเซลเซียส เพื่อการแยกสายดีเอ็นเอ (denaturation) 55 องศาเซลเซียสในการเข้าจับของไพรเมอร์ (annealing) และ 72 องศาเซลเซียสในขั้นตอนการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension)

ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืช และในแมลงพาหะ โดยเทคนิคพีซีอาร์มีหลายกรณีที่ผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มปริมาณได้จากการใช้ universal primer ที่พัฒนามาจากยีนส่วน 16S rRNA ไม่สามารถแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกับพืชออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ ได้ ดังนั้นการแยกกลุ่ม และความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาจึงต้องอาศัยการวิเคราะห์การเรียงลำดับของเบส (sequence analysis) หรือวิเคราะห์ Restriction Fragment Length Polymorphism หรือ อาร์เอฟแอลพี (RFLP) (Ahrens and Seemüller, 1992) RFLP หมายถึงความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) (สุรินทร์, 2536) ช่วยให้สามารถจำแนกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาสายพันธุ์ต่างๆ ได้อย่างชัดเจน และมีประสิทธิภาพ

การวิเคราะห์รูปแบบ RFLP เป็นการวิเคราะห์สารพันธุกรรมโดยการเปรียบเทียบความแตกต่างหรือความหลากหลายของขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดจากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) อาศัยหลักการที่ข้อมูลทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตอยู่ในรูปของดีเอ็นเอสามารถจำลองตัวเองได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ เพื่อถ่ายทอดสู่เซลล์รุ่นลูกให้คงลักษณะที่เหมือนเดิมแต่บางครั้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงสายเบสภายในดีเอ็นเอ เนื่องจากสิ่งแวดล้อมหรือข้อผิดพลาดของเซลล์เอง การเปลี่ยนแปลงส่งผลให้เกิดการหายไป (deletion) การเพิ่มขึ้น (duplication) การจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) หรือมีการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งของดีเอ็นเอบางส่วนภายในโครโมโซม (transposition) ผลที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้เกิดความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ซึ่งสามารถตรวจพบได้โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอ (sequencing) แล้วนำมาเปรียบเทียบ แต่เป็นวิธีที่ทำได้ยาก และใช้เวลานาน วิธีที่ง่ายกว่า คือ การนำดีเอ็นเอที่ต้องการหาความแตกต่างนั้น มาย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะบางชนิด แล้วเปรียบเทียบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ถูกตัดโดยเอนไซม์นั้น วิธีการนี้ช่วยให้สามารถระบุความแตกต่าง หรือความเหมือนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่นำมาวินิจฉัย และมีประโยชน์อย่างมากต่อการจำแนกชนิดเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ การวิเคราะห์รูปแบบ RFLP จึงเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง และใช้เป็นการพิสูจน์ และจำแนกเชื้อพันธุกรรมในระดับของชนิด (species) สายพันธุ์ (strain) ของเชื้อ โดยการวิเคราะห์รูปแบบ RFLP ของผลผลิตจาก ปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในส่วน 16S rDNA หรือส่วนของ 16S-23S rDNA gene spacer ซึ่งเป็นส่วนที่ระบุวิธีที่ใช้ในการจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคกับพืช (รุ่งโรจน์, 2543; พรทิพย์, 2542ก) โดยทำการวิเคราะห์ RFLP ของผลผลิตพีซีอาร์ที่มีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอภายใน 16S rRNA gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาแล้วนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะโดยใช้เอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ *Alu* I, *Rsa* I, *Hpa* II, และ *Mse* I (Sdoodee *et al.*, 1999)

ชุตินันท์ (2541) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย และพืชชนิดต่างๆโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 15 ชนิด ได้แก่ *Msp I, Rsa I, Alu I, Acc I, Hpa I , Hpa II, Dra I , Xba I, Bgl I, EcoR I, Kpn I, Sal I, BamH I, Hind III* และ *Taq I* พบว่า รูปแบบ RFLP ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย หญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาวแตกต่างจากอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิด *Msp I* และ *Hpa II* รูปแบบ RFLP ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวแตกต่างจากหญ้าข้อ หญ้าแพรก และหญ้าปากควายที่แสดงอาการใบขาวเมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิด *Taq I*

รุ่งโรจน์ (2543) ได้ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 9 ชนิด ได้แก่ *Dra I, Tag I, Rsa I, Hha I, Hinf I, Hpa II , Sau 3AI, Hpa I* และ *HaeII* พบว่า รูปแบบ RFLP ของดีเอ็นเอมีความคล้ายคลึงกันมากในแต่ละชนิดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ ทั้งในอ้อยและหญ้า เมื่อนำข้อมูลแบบแผน ดีเอ็นเอ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม UPGMA (Dice's coefficent) สร้างเป็น dendrogram พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาที่เข้าทำลายอ้อย และหญ้าบางชนิดในประเทศไทย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ หากใช้ค่า similarity 0.85 ไม่สามารถแบ่งกลุ่มเชื้อที่พบในอ้อย และหญ้า ที่ค่า similarity 0.95 สามารถแบ่งเชื้อออกเป็น 4 กลุ่ม ในกลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อที่อยู่ในอ้อย และหญ้า จากภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออก กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่อยู่ในอ้อย และหญ้าจากภาคตะวันออก กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อที่อยู่ในอ้อย และหญ้า จากภาคภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อที่อยู่ในอ้อย และหญ้า จากภาคตะวันออก

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการรับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย และหญ้าแพรกของแมลง *Exitianus indicus*
2. เพื่อศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวโดยแมลง *Exitianus indicus* ข้ามระหว่างอ้อย และหญ้าแพรก
3. เพื่อจำแนกสายพันธุ์เชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งพบในอ้อยใบขาว หญ้าใบขาว และในแมลงพาหะ *Exitianus indicus* ด้วยการวิเคราะห์รหัสพันธุกรรม 16S rRNA gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยเทคนิค PCR/RFLP (Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism)