บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างลำไยที่เป็นโรคในสภาพแปลงและอาการพุ่มไม้กวาดที่เกิดจากไรดูดกิน พบว่าลักษณะอาการของโรคแตกต่างกันไปตามลักษณะของแต่ละพันธุ์ พันธุ์เบี้ยวเขียวและพันธุ์คอส่วนในลำไยพันธุ์เดียวกันลักษณะอาการของโรคที่พบและผลจากการดูดกินของไรลักษณะอาการใกล้เคียงกัน

จากวิธีการสกัดดีเอ็นเอจากลำไยและตัวอย่างพืชที่นำมาตรวจสอบ โดยใช้วิธีการสกัดดีเอ็นเอแบบเดียวกับที่ใช้ในมะม่วง พบว่าเป็นวิธีที่ให้ปริมาณดีเอ็นเอสูงเมื่อตรวจสอบบน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis เพราะเนื่องจากในองค์ประกอบของ extraction buffer มีสาร CTAB เป็นองค์ประกอบอยู่ซึ่งสารเคมีดังกล่าวมีความเข้มข้นของเกลือสูงสามารถที่จะใช้กำจัดสารประกอบพวก polysaccharide ให้ตกตะกอน นอกจากนั้นยังเพิ่มปริมาณสารเคมี SDS ลงไปในขั้นตอนการสกัดซึ่งคุณสมบัติของสารดังกล่าวจะช่วยในการย่อยผนังเซลล์พืช ทำให้มีการปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมามากยิ่งขึ้น และยังช่วยนำเอาอาร์เอ็นเอออกจากดีเอ็นเอเป็นการป้องกัน ribonucleotide จับกับ primer ในปฏิกิริยา PCRอีกด้วย(Porebski *et al.*,1997)

จากการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในลำไยที่เป็นโรคโดยใช้เทคนิคDot-blot hybridization พบว่า ดีเอ็นตัวติดตามที่มีระดับความไว 1 พิโคกรัมไม่สามารถทำปฏิกิริยาไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอของลำไยที่เป็นโรคได้ ยกเว้นดีเอ็นเอชุดควบคุม รุ่งโรจน์ (2544) ได้ใช้ดีเอ็นเอตัวติดตามตัวเดียวกันนี้สามารถตรวจสอบอ้อยที่แสดงอาการของโรคใบขาวจากแหล่งปลูกในประเทศไทยได้โดยไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอของพืชปกติที่นำมาทดสอบ

จากการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาในพืช โดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่จำเพาะเจาะจงกับบริเวณ 16 s r RNA ของเชื้อในกลุ่มไฟโตพลาสมา คือ R16F2และR16R2 (Lee *et al.*, 1993) พบว่าไม่สามารถตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในลำไยที่แสดงอาการพุ่มไม้กวาด ในต้นแพงพวยที่ผ่านการเสียบกิ่งจากลำไยที่เป็นโรค ในฝอยทองที่ผ่านการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุได้ ยกเว้นดีเอ็นเอของแพงพวยที่เป็นโรคดอกเขียว(periwinkle virescence)ซึ่งนำมาเป็นชุดควบคุม(positive control) จากการศึกษาของสุภาพรและคณะ (2540) พบว่าสามารถใช้ R16F2 และ R16R2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบ 8 ชนิด คือ โรคใบขาวของ อ้อย หญ้าแพรก และหญ้า Brachiaria

ในโรคเหลืองเตี้ยของข้าว ป่อเทือง ผักเสี้ยนผี และ โรคดอกเขียวของแพงพวย จากการศึกษาในลักษณะเดียวกันของรุ่งโรจน์ (2544) พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก primer เดียวกันได้ทุกตัวอย่างของอ้อยและหญ้าที่แสดงอาการใบขาว นอกจากนั้นยังประสบผลสำเร็จในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน ดีเอ็นเอในแมลงพาหะของ mulberry dwarf โดยสามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอ่อนที่เพิ่งฟักออกจากไข่ (Kawakita, 2000) ต่อมาได้ใช้ universal primer fU5 และ rU3 ซึ่งเป็น primer ที่มี ประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่มของไม้ยืนต้น นำมาเปรียบเทียบกับ universal primer fO1/rO1, fPD/rO1 และ fPD/rPDS ที่ออกแบบมาจากลำดับเบสให้ homologous กับดีเอ็นเอของเชื้อในกลุ่มไฟโตพลาสมาเฉพาะ คือ apple proliferation (AP) pear decline (Lorenz *et al*., 1995) ซึ่งตรงกับการรายงานการศึกษาของ Schneider และ Gibb(1996) ซึ่งใช้ fU5 และ rU3 ตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาใน declining pear ได้ประสบผลสำเร็จ แต่การใช้ primer ดังกล่าวไม่สามารถตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมา ในลำไยที่แสดงอาการของโรคพุ่มไม้กวาดและตัวอย่างพืชที่นำมาตรวจสอบได้ ยกเว้นดีเอ็นเอควบคุม ซึ่ง primer ดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ประมาณ 8.74 กิโลเบส (Malinowki, 1997)

เมื่อไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยวิธี PCR เพราะประสิทธิภาพอาจไม่เพียงพอสำหรับเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีความเข้มข้นต่ำในพืช จึงได้นำเอาเทคนิค Nested PCR เข้ามาตรวจสอบโดยใช้ primer จำนวน 2 คู่ คือ R16F2 และ R16RO(Lee *et al.*, 1995) primer ดังกล่าวออกแบบมาจากส่วน 16 s rDNA ของ aster yellow ซึ่งเป็น primer คู่แรกที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอนเอของเชื้อในกลุ่มไฟโตพลาสมาทั่วๆไป แต่พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างลำไยที่เป็นโรค และพืชที่มานำมาทดสอบทั้งหมด ยกเว้นดีเอ็นเอชุดควบคุม เมื่อตรวจดูด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis เนื่องจากผลผลิตดีเอ็นเอในปฏิกิริยารอบแรกปริมาณ PCR product มีไม่มากพอที่จะปรากฏให้เห็นบน agarose gel ดังนั้นจึงนำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR รอบแรกมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาในรอบที่สองต่อไป โดยใช้ primer R16F2/R16R2 และใช้ condition เดิมในการทำปฏิกิริยา PCR ยกเว้นในขั้นตอน annealing ได้เพิ่มอุณหภูมิจาก 50 ไปเป็น 60 องศาเซลเซียส เพื่อลดผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการ (false negative) และเพิ่มความเฉพาะเจาะจงในการจับระหว่างดีเอ็นเอต้นแบบ แต่จากการตรวจสอบดังกล่าวก็ไม่สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในลำไยที่แสดงอาการของโรค และในพืชที่นำมาทดสอบ ยกเว้นดีเอ็นเอชุดควบคุม

จากรายงานการศึกษาลำไยตลอด 30 ปีที่ผ่านมามักเข้าใจกันว่า ลำไยที่แสดงอาการพุ่มไม้กวาดมีสาเหตุมาจากเชื้อมายโคพลาสมาหรือไฟโตพลาสมามีส่วนเกี่ยวพันธุ์กับการเกิดโรค(ประสาทพร, 2516) แต่เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถแยกเชื้อสาเหตุดังกล่าวออกมาได้ จึงยังไม่มีการพิสูจน์ยืนยันว่าเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นสาเหตุของอาการเกิดโรคดังกล่าวจริง (จริยาและคณะ, 2542) ต่อมา Chen *et al.*(1992)ได้ศึกษาสาเหตุของของโรคพุ่มไม้กวาดของลำไย โดยสามารถแยก flexible virus ได้จากต้นลำไยที่เป็นโรคและประสบผลสำเร็จใน การถ่ายทอดอาการดังกล่าวได้ และสามารถถ่ายทอดลักษณะโรคพุ่มไม้กวาดจากต้นลำไยที่แสดงอาการไปยังต้นลิ้นจี่ปกติได้ โดยอาศัยแมลงพาหะ *Tessaratoma papillosa* และ *Cornegenapsylla sinica* จริยาและคณะ (2542) พบว่าอาการพุ่มไม้กวาดที่พบในยอด ช่อดอก เกิดจากการดูดกินของไร คือ ใบหงิก ใบมีขนาดลดรูป ช่อดอกแตกเป็นพุ่ม และลักษณะดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากสารพิษที่ไรปล่อยเข้าไปในระหว่างการดูดกิน ซึ่งเกิดจากลักษณะที่เรียกว่า toxicogenic reaction มากกว่าที่จะเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อโรค โดยทั่วไปลักษณะพุ่มไม้กวาดของพืชต่างๆ คาดว่าจะเกิดจาก เชื้อไวรัส และเชื้อไฟโตพลาสมา แต่ในกรณีของลำไยหลังจากที่ตรวจด้วย DAPI แล้วไม่พบปฏิกิริยาที่แสดงผลเป็นบวก และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้โดยใช้วิธี PCR โดยใช้ primer ที่มีประสิทธิภาพสูงในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาได้ (Epstein and Hill, 1999)

จากการศึกษา(ปริญญาและคณะ, 2542) โดยการตัด ultrathin section ยอดลำไยที่แสดงอาการพุ่มไม้กวาด มักพบ polymorphism ที่คล้ายลักษณะ spherical ของเชื้อไฟโตพลาสมาอยู่ภายใน sieve tube cell ในลำไยที่แสดงอาการของโรค ซึ่งอนุภาคที่ปรากฏอาจจะมีการสร้างขึ้นเป็นผลจากไรเข้าทำลายมากกว่าจะเป็นอนุภาคของเชื้อไฟโตพลาสมา จากการศึกษาดังกล่าวคาดว่าสาเหตุของโรคพุ่มไม้กวาดของลำไยมีความเป็นไปได้ที่จะไม่ได้เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา เพราะโครงสร้างที่คล้ายเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบเป็นอนุภาค double-membrane bodies (DMBs) มีขนาดประมาณ 100-200 นาโนเมตร รูปร่างลักษณะเป็นแบบ oval-shaped มีรายงานพบในไซโตพลาสซึมของพืชที่เป็นโรค wheat spot mosaic, pigeon pea sterility และ rose rosette รูปร่างของอนุภาคที่ปรากฏจะเหมือนกับ แบคทีเรีย และไฟโตพลาสมา ซึ่งเกิดจากการขยายและม้วนตัวจากตรงปลายของเนื้อเยื่อองค์ประกอบ endoplasmic reticulum (Hiruki, 1994) ต่อมา Epstein and Hill (1999) พบ double strand RNA ในไซโตพลาสซึมในโรค rose rosette ในกุหลาบ แต่ไม่พบลักษณะดังกล่าวในพืชปกติ ซึ่งสามารถตรวจสอบบน polyacrymide gel คาดว่าจะเป็นสาเหตุของโรคดังกล่าว และสามารถถ่ายทอดโดยการติดตา และไร *Phyllocoptes frutipilus* ได้

จากการรายงานของนักวิจัยท่านอื่นยังไม่ประสบความสัมเร็จในการถ่ายทอดอาการพุ่มไม้กวาดของลำไยโดยวิธีกล และการทาบกิ่ง แต่สามารถถ่ายทอดโดยไรได้ เพราะฉะนั้นสิ่งที่ควรศึกษาต่อไป คือ การตรวจหาเชื้อสาเหตุในตัวไร ซึ่งอยู่ในขั้นตอนการปรับปรุงหาวิธีและ สภาพที่เหมาะสมในการสกัดดีเอ็นเอจากไร และนอกจากนั้นในลำไยที่เป็นโรคมีการสะสมสารพวก tannin และ polysaccharide ในเนื้อเยื่อเป็นจำนวนมาก สารเหล่านี้อาจจะเป็นตัว inhibitor ในการทำปฏิกิริยา PCR ได้ หรือ primer ที่นำมาตรวจสอบมีลำดับเบสต่างจาก นิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา เนื่องจากในกรณีที่มีลำดับเบสต่างกันเพียงเล็กน้อยก็จะไม่เกิดปฏิกิริยา หรือที่เรียกว่า non-homologues ระหว่าง primer กับเชื้อไฟโตพลาสมา เพราะฉะนั้นควรเพิ่มขั้นตอนการทำให้ดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์มากกว่าวิธีที่ใช้ในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามยังไม่ได้มีการสรุป สาเหตุที่แน่นอนในการเกิดโรคพุ่มไม้กวาดของลำไย แต่ประสบผลสำเร็จในการถ่ายทอดอาการของโรคโดยการดูดกินของไรจากลำต้นที่เป็นโรคไปยังต้นปกติ ซึ่งอาการดังกล่าวอาจเกิดจากสารพิษที่ปลดปล่อยออกมาจากไรในขณะดูดกินมากว่าการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุที่คาดว่าน่าจะเป็นสาเหตุของโรค เช่น ไวรัส และไฟโตพลาสมา ซึ่งจากการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีความสัมพันธุ์กับโรคพุ่มไม้กวาดลำไยพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค DAPI stain(สุภาพร, 2544 : ติดต่อส่วนตัว), PCR และ nucleic acid hybridization พบว่า ไม่เกิดปฏิกิริยาในการตรวจสอบโดยเทคนิค DAPI ไม่พบสัญญาณที่แสดงผลเป็นบวกบนแผ่นแมมเบรน และลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างพืชที่เป็นโรค ยกเว้นดีเอ็นเอชุดควบคุม เหมือนลักษณะเช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Seemuller (2544 : ติดต่อส่วนตัว) ซึ่งไม่ประสบความสำเร็จในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในลำไยโดยเทคนิค DAPI และ เทคนิค PCR เช่นเดียวกัน

การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพืชตามวิธีของ Semancik (1987) โดยวิธี phenol extraction ขั้นตอนการสกัดผ่านขนวนการทำให้นิวคลีอิคแอซิคบริสุทธิ์โดยผ่าน CF-11 Cellulose Chromatography ซึ่งประกอบไปด้วย cellulose สารประกอบ ดังกล่าวจะจับกับ นิวคลีอิคแอซิค โดยอาศัยคุณสมบัติของปฏิกิริยา non-ionic interaction ระหว่าง นิวคลีอิคแอซิค กับ cellulose เพราะฉะนั้นในขั้นตอนนี้ สารเคมีในพืชที่มีคุณสมบัติเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา (inhibitor) และ pigment ต่าง ๆก็จะถูกชะล้างออกไปเหลือแต่นิวคลีอิคแอซิคและ viroid –like RNA จับกับ cellulose (Budra, 1991) และจากนั้นใช้ 1xSTE buffer และ ethanol 35 เปอร์เซ็นต์ ล้างนิวคลีอิคแอซิคโมเลกุลขนาดใหญ่ออก เพราะฉะนั้นจะเหลือเฉพาะ viroid- like RNA และนิวคลีอิคแอซิคขนาดเล็กจับกับ cellulose จากนั้นละลายอาร์เอ็นเอที่ได้ ด้วย 1xSTE buffer วิธีดังกล่าวถูกนำไปใช้ได้ดีในการแยกสกัดไวรอยด์ใน ส้ม องุ่น และ อโวกาโด (Semencik, 1986) และถูกนำไปประยุกต์ใช้ในการสกัดลำไยโรคพุ่มไม้กวาด เมื่อตรวจดูแถบอาร์เอ็นเอ

บนเจลที่ 1 (non-denature gel) จะพบ แถบอาร์เอ็นเอตรงบริเวณ 4S RNA , 5S RNA และ 7S RNA ชัดเจนบนเจล แต่ไม่พบ viroid –like RNA บนตำแหน่ง 7 S RNA เพราะอาจเนื่องมาจากปริมาณเชื้อไวรอยด์มีอนุภาคต่ำในเนื้อเยื่อพืช สำหรับเจลที่ 2 (denature gel) ซึ่งมีคุณสมบัติทำให้ double –strand RNA อยู่ในสภาพ single -strand RNA หลังจากครบเวลาการย้อมด้วย silver nitrate ไม่ปรากฏ viroid – like RNA band เพราะเนื่องมาจากการย้อมสีใช้เวลานานเกินไป หรือมีปริมาณ viroid –like RNA ปริมาณต่ำในเนื้อเยื่อพืช

จากการตรวจสอบไวรอยด์ด้วยวิธี PCR พบลายพิมพ์อาร์เอ็นเอที่น่าสนใจบนตัวอย่างลำไยที่แสดงอาการโรคพุ่มไม้กวาด มีขนาดประมาณ 480 bp และ ตัวอย่างแพงพวยที่ผ่านการเสียบกิ่งจากลำไยที่เป็นโรค พบลายแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 ชิ้น คือ ขนาด 300 และ 400 bp ตามลำดับ โดยใช้ DNA specific primer ที่จำเพาะกับเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม CEVd เพียง primer เดียวที่นำมาตรวจสอบ จากจำนวน primers ทั้งหมด แต่เนื่องจากไม่สามารถนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่สองเพื่อทำการ clone และหาลำดับเบสได้ ซึ่งอาจเกิดจากความไม่คงทนของอาร์เอ็นเอ แต่สำหรับในแพงพวย สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในทุกๆครั้งของปฏิกิริยาทั้งตัวอย่างจากธรรมชาติและตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สรุปขั้นต้นได้ว่าอาจเกิดจากลำดับเบสของ DNA specific primer ในกลุ่มของ CEVd complementary กับอาร์เอ็นเอของต้นแพงพวย

ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไวรอยด์ โดยวิธี PCR เพื่อหาลำดับเบสได้ และประกอบกับยังไม่มีรายงานการพบไวรอยด์ในลำไย เพราะฉะนั้นจึงไม่สามารถสรุปได้ว่าพบไวรอยด์มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคพุ่มไม้กวาดได้โดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในปัจจุบันในการตรวจสอบ เพราะฉะนั้นจึงทำให้ไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคพืชดังกล่าว และควรพัฒนาเทคนิคที่มีอยู่ตลอดจนนำเทคนิคใหม่ๆ มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรค เพื่อหาแนวทางป้องกันกำจัดต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้เขียนมีข้อเสนอแนะสำหรับผู้สนใจจะศึกษาต่อไป คือ

1. ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ ตัวอย่างพืชควรเป็นตัวอย่างสดเพราะจะให้ปริมาณดีเอ็นในปริมาณมาก และลดปริมาณการเกิดสารประกอบฟีนอลได้
2. ขั้นตอนการตรวจสอบโดยวิธี PCR ควรออกแบบ primer เพิ่มเติมจากการทดลองโดยอาจใช้ทั้ง specific primer และ degenerate primer