

การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ *Leifsonia xyli subsp. xyli* สาเหตุโรคตอ
แคระแกร็นของอ้อยด้วยเทคนิค Quantitative polymerase chain
reaction - high resolution melting analysis (qPCR-HRM)

Development of detection method for *Leifsonia xyli subsp. xyli*, causal organism
of ratoon stunting disease of sugarcane by quantitative polymerase chain
reaction - high resolution melting analysis (qPCR-HRM)

วุฒิฑารักษ์ บุญสนธิ^{1,2,3} จุฑาทพ วัชรไชยคุปต์^{1,2} วิชัย โหมสิทธิ์ตน^{1,2}
และ สุจินต์ ภัทรภูวadol^{1,2,3*}

Wuttitharuk Boonsonti^{1,2,3} Jutatape Watcharachaiyakup^{1,2} Wichai Kositratana^{1,2}
and Sujin Patarapuwado^{1,2,3*}

บทคัดย่อ: โรคตอแคระแกร็นของอ้อย (ratoon stunting disease of sugarcane; RSD) ที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Leifsonia xyli subsp. xyli* (LXX) ทำให้ต้นอ้อยแคระแกร็น ไม่อย่างปล้อง ทำให้ผลผลิตอ้อยลดลงได้ 5-30% และถึง 50% ในอ้อยพันธุ์อ่อนแอ อ้อยที่ติดเชื้อมักจะไม่แสดงอาการของโรคหรือแสดงอาการที่ไม่ชัดเจนทำให้เกิดความสับสนกับโรคหรือสาเหตุอื่น ๆ ที่ยากต่อการวินิจฉัยโรคนี้ในแปลงปลูก จึงต้องใช้วิธีตรวจหาเชื้อสาเหตุที่มีความแม่นยำและมีความไวในการตรวจสูง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อ LXX ในตัวอย่างอ้อยด้วยเทคนิค quantitative polymerase chain reaction ร่วมกับ high resolution melting analysis (qPCR-HRM) ซึ่งใช้หลักการของ qPCR ร่วมกับการวิเคราะห์ค่า melt peak ของผลผลิตจาก qPCR โดยเก็บตัวอย่างอ้อยจากสถานีผสมพันธุ์อ้อยบ้านทิพย์ กาญจนบุรี และศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี จำนวนรวม 240 ตัวอย่าง สกัดจีโนมิกส์ดีเอ็นเอ (gDNA) จากอ้อยและนำมาใช้เปรียบเทียบการตรวจหาเชื้อ LXX ด้วยเทคนิค conventional PCR และ qPCR-HRM พบว่าเทคนิค conventional PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ Pat1-F2/Pat1-R2 ที่จำเพาะกับยีน *Pat1* และ CxxITS#5/Cxx-ITS#5 ที่จำเพาะกับบริเวณ 16S-23S DNA internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อ LXX ให้ผลตรวจพบเชื้อได้ 29 และ 61 ตัวอย่างตามลำดับ เทคนิค qPCR-HRM ที่ใช้ไพรเมอร์ LayF/LayS ที่จำเพาะกับบริเวณ ITS ของเชื้อในจีโนม *Leifsonia* ให้ผลในการตรวจพบเชื้อ LXX จำนวน 96 ตัวอย่าง ดีกว่าวิธีข้างต้น การทวน

Received April 14, 2020

Accepted July 3, 2020

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand.

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agriculture Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

³ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140 Thailand.

* Corresponding author: agrsujp@ku.ac.th

สอบความถูกต้อง (verification) ของเทคนิค qPCR-HRM ในการตรวจหาเชื้อ พบว่าผลผลิต qPCR-HRM มีค่า melt peak ที่อุณหภูมิ 83.6 °C ที่ตรงกับจากของเชื้อ LXX ที่มีรายงานไว้และตรวจสอบความใช้ได้ (validation) ของวิธีการโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ขนาด 606 bp พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับ ITS ของเชื้อ LXX จากฐานข้อมูล GenBank ทั้งหมด (100%) ผลการศึกษาทำให้สรุปได้ว่าเทคนิค qPCR-HRM เป็นวิธีการตรวจหาเชื้อ LXX ที่สามารถตรวจหาเชื้อในสถานะที่มีปริมาณต่ำ ๆ (sensitive) และมีความแม่นยำสูง

คำสำคัญ: โรคตอแคะแกระรินของอ้อย, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, qPCR-HRM

ABSTRACT: Ratoon stunting disease (RSD) in sugarcane causes by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LXX) pathogen, leading to lower yields 5-30% and up to 50% in susceptible cultivars. Its symptoms are stunt, short internodes which are easily confused with other diseases or shown no symptom. Thus, sensitive and accurate detection method is needed. This study aims to develop a reliable detection method for this pathogen based on quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and high resolution melting analysis (HRM) of qPCR product. Sugarcane samples in a total of 240 samples were collected from Kanchanaburi Sugarcane Research Station and Suphan Buri Field Crops Research Center. Genomic DNA was extracted from sugarcane stem and leaf for comparison on LXX detection by conventional PCR and qPCR-HRM techniques. The conventional PCR technique with two primer pairs, Pat1-F2/Pat-R2 which targeted *Pat1* gene and CxxITS#5/CxxITS#5 which targeted the 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) region, detected 29 and 61 of LXX positive samples, respectively. The qPCR-HRM method using *Leifsonia*-generic quantitative PCR primers LayF/LayS to target the ITS region detected 96 of LXX positive samples and became more efficient method. The qPCR-HRM product was further verified by having the same melting peak at 83.6 °C as LXX and validated by DNA sequencing of ITS region (606 bp) matched to the ITS region of LXX strains from GenBank with 100% identity. The results revealed that qPCR-HRM is the most highly sensitive and accurate detection method for LXX.

Keywords: ratoon stunting disease, *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, qPCR-HRM

บทนำ

โรคตอแคะแกระรินของอ้อย (sugarcane ratoon stunting disease) เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย แกรมบวก ชื่อ *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LXX) ชื่อเดิม *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* (Eytushenko et al., 2000) มีรายงานการพบโรคนี้ในแหล่งปลูกอ้อยทั่วโลก พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อาทิเช่น มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ รวมถึงประเทศไทย (Bradbury, 1986) ต้นอ้อยที่มีการติดเชื้อ LXX มีอาการต้นแคะแกระริน ไม่อย่างปล้อง ใบมักมีสีซีด ทำให้ผลผลิตของอ้อยลดลง 5-30% และอาจลดลงถึง 50% ในสภาวะพื้นที่อ้อยแอต่อโรค เมื่อผ่าลำต้นอ้อยบริเวณเนื้อเยื่อท่อน้ำเลี้ยงของอ้อยใกล้ข้อจะมีจุดสีชมพูแดง (Young, 2017) ระดับความ

รุนแรงของอาการโรคนี้ขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของอ้อยและสภาพความเครียดต่าง ๆ โดยเฉพาะจากการขาดน้ำ เชื้อโรคนี้แพร่ระบาดไปกับท่อนพันธุ์ (seed borne) และโดยการติดไปกับอุปกรณ์การเกษตร เช่น มีด หรือเครื่องจักรกลในการตัดอ้อย พบรายงานโรคนี้ในประเทศไทย โดย Bradbury (1986) ต่อมา วีกรรด์และคณะ (2561) ได้รายงานการตรวจพบเชื้อ LXX ด้วยวิธี PCR จากการเก็บตัวอย่างจากแปลงปลูกอ้อย 14 แห่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง พบเชื้อ LXX ใน 3 แหล่งปลูก ได้แก่ แปลงปลูกในศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี และแปลงปลูกของเกษตรกรใน อ.อุทุมพร จ.สุพรรณบุรี

การวินิจฉัยโรคตอแคะแกระรินของอ้อยจากการตรวจดูจากลักษณะอาการทำได้ยาก เนื่องจากอ้อยอาจไม่แสดงอาการ หรือมีอาการที่ไม่ชัดเจน ทำให้

สืบสานกับอาการโรคที่เกิดจากสาเหตุอื่น ๆ (Pelosi et al., 2013 ; Young, 2017) มีการพัฒนาวิธีตรวจหาเชื้อนี้จากสารพันธุกรรมของเชื้อ ด้วยพื้นฐานเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ได้แก่ multiplex-PCR (Fegan et al., 1998) nested-PCR (Falloon et al., 2006) quantitative PCR (qPCR) (Grisham et al., 2007) และนอกจากนี้ยังมีการพัฒนาเทคนิค Taqman qPCR (Pelosi et al., 2013) และเทคนิค loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ในการตรวจหาเชื้อนี้ (Liu et al., 2013) พบว่าแต่ละวิธีการให้ประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ LXX ที่แตกต่างกัน ผลการเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ LXX สามวิธีการคือ เทคนิค conventional PCR LAMP และ qPCR พบว่าเทคนิค LAMP มีประสิทธิภาพให้ความไว (sensitivity) ในการตรวจหาเชื้อ LXX ดีที่สุด รองลงมาคือ qPCR และ conventional PCR (Wu et al., 2018) แม้ว่าเทคนิค LAMP จะให้ความไวในการตรวจสูง แต่มักพบให้ผลการตรวจหาเชื้อเกิดปฏิกิริยาบวกผิดพลาด (false-positive) ที่สูงกว่าเทคนิคพื้นฐาน PCR อื่นๆ (Lee et al., 2017) ในประเทศไทย วิจารณ์ และคณะ (2561) ได้ใช้เทคนิค conventional PCR และ nested PCR ตรวจหาเชื้อ LXX ของตัวอย่างอ้อยจากภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 819 ตัวอย่าง พบเชื้อ LXX จำนวนรวม 32 ตัวอย่าง จากการตรวจด้วยวิธี nested PCR ในขณะที่วิธี conventional PCR ตรวจพบเชื้อเพียง 2 ตัวอย่าง แสดงถึงการมีเชื้อ LXX ในปริมาณที่ต่ำมากจึงตรวจไม่พบโดยวิธี conventional PCR ขณะที่ Pelosi et al., (2013) ใช้เทคนิค Taqman-qPCR ในการตรวจหาเชื้อ LXX พบว่ามีความไวในการตรวจหาเชื้อได้ไม่ต่างจากเทคนิค nested-PCR แต่ตรวจหาได้รวดเร็ว ใช้ปฏิกิริยาเพียงขั้นตอนเดียว ไม่ต้องดูสารเตรียมปฏิกิริยาในหลอดทดลองใหม่เช่นดังในวิธี nested PCR จึงสะดวกต่อการตรวจหาเชื้อในตัวอย่างจำนวนมาก ต่อมา Young (2017) ได้พัฒนาเทคนิค quantitative polymerase chain reaction-high resolution melting analysis (qPCR-HRM) ที่ใช้เทคนิค qPCR ในการตรวจหาเชื้อเป้าหมายร่วมกับ การวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เกิดการแยกจากกันของสายดีเอ็นเอสายคู่ (high resolution melt ; HRM) ของผลผลิต PCR มาใช้ตรวจหาเชื้อ LXX โดยใช้ไพรเมอร์ LayF/LayS ที่ออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณ

16S-23S DNA internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อโนจีนัส *Leifsonia* เพื่อตรวจหาเชื้อโนจีนัส *Leifsonia* ที่อยู่ในต้นอ้อย และตรวจวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิที่เกิดการคลายเกลียวแยกออกดีเอ็นเอสายคู่ (melt peak) ของผลผลิต PCR ที่ได้ ขนาด 128 bp พบว่าต้นอ้อยที่มีเชื้อ LXX จะให้ผลผลิต PCR ที่มี melt peak ที่อุณหภูมิ 83.6 °C ในขณะที่ต้นอ้อยที่มีเชื้อ *Leifsonia* spp. อื่น ๆ จะมีผลผลิต PCR ที่มี melt peak ที่ต่างออกไป ด้วยเหตุนี้ qPCR-HRM จึงเป็นวิธีการตรวจหาเชื้อ LXX ได้อย่างรวดเร็ว จำเพาะ และทวนสอบความถูกต้องของผล (verification) ได้ในขั้นตอนเดียว การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ LXX จากอ้อยที่มีความไวและแม่นยำสูงในการตรวจหาด้วยเทคนิค qPCR-HRM เพื่อนำมาใช้ตรวจหาเชื้อ LXX ในแปลงรวบรวมพันธุกรรมอ้อย ก่อนนำไปใช้ขยายพันธุ์ ปรับปรุงพันธุ์ หรือการควบคุมโรคต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างอ้อย และการเตรียม genomic DNA จากอ้อย

เก็บตัวอย่างอ้อยจากสถานีผสมพันธุ์อ้อยบ้านทิพเย อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี และศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี กรมวิชาการเกษตร อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี จากนั้นนำตัวอย่างอ้อยมาทำการศึกษาดูตามขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

การเตรียม genomic DNA (gDNA) จากเนื้อเยื่ออ้อย ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Aljanbi et al. (1999) โดยใช้เนื้อเยื่อลำต้นด้านในบริเวณข้อ หรือส่วนของกาบใบอ้อยปริมาณ 0.3-0.5 g แช่ลงในไนโตรเจนเหลว แล้วบดด้วยเครื่อง Mixer mill (Restch®, Germany) เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย CTAB 2% N-lauroyl sarcosine 5% และ polyvinyl pyrrolidone (PVP) 10% ชนิดละ 200 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นตกตะกอนด้วยความเร็วรอบ 12,396 g เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส ปริมาตร 500 µl เติมด้วยสารละลาย phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาตร 500 µl เขย่าให้เข้ากัน ปั่นแยกส่วนสารที่ความเร็วรอบ 12,396 g เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสให้หลอดใหม่ และเติมสาร isopropanol ปริมาตร 2.5 เท่าของส่วนใส เติมสารละลาย NaCl 3% ปริมาตร

50 µl แล้วพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,396 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 µl ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE + RNaseA 2 ng/µl ปริมาตร 20 µl บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 นาที ตรวจสอบ gDNA ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และวัดความเข้มข้น DNA ด้วย UV spectrophotometer และเจือจาง gDNA ให้ได้ความเข้มข้น 10 ng/µl เพื่อใช้เป็นต้นแบบ DNA ในการทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

การตรวจสอบคุณภาพ gDNA ที่สามารถนำไปทำปฏิกิริยา PCR ได้ ด้วยการนำ gDNA ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Sac18s-F2 และ Sac18s-R ที่ออกแบบในการทดลองนี้จากบริเวณ 18S rRNA ของ *Saccharum officinarum* จากฐานข้อมูลจาก GenBank accession no. AH001756.2 โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา และขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังแสดงใน Table 1 โดยใช้ gDNA จากตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบปฏิกิริยา PCR มาก่อนปริมาณ 10 ng เป็น DNA ต้นแบบของปฏิกิริยาควบคุมบวก (positive control)

การตรวจหาเชื้อ LXX จากตัวอย่างอ้อยด้วยเทคนิค conventional PCR

นำ gDNA ที่สกัดจากอ้อยปริมาณ 10 ng ไปตรวจหาเชื้อ LXX ด้วยเทคนิค conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CxxITS#5 และ CxxITS#5 ที่มีความจำเพาะกับบริเวณ ITS ของเชื้อ LXX (Fegan et al., 1998) และไพรเมอร์ Pat1-F2 และ Pat1-R2 ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะกับยีน *Pat1* ของเชื้อ LXX สายพันธุ์ CTCB07 (accession no. AE016822.1) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องต่อการเกิดอาการเหี่ยวของพืช (Fu et al., 2016) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา และขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังแสดงใน Table 1 ในการเปรียบเทียบวิธีการตรวจหาเชื้อ LXX โดยใช้ DNA ส่วนของ ITS จากเชื้อ LXX ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก Dr. Young-Bao Pan (USDA-ARS Sugarcane Research Laboratory, La, USA) และ DNA ของยีน *Pat1* ของเชื้อ LXX ซึ่งได้จากการศึกษานี้ และผ่านการทดสอบมาก่อนหน้านี้เป็น DNA

ต้นแบบในปฏิกิริยาบวก (Positive control) และใช้ gDNA ของเชื้อ *Acidovorax citrullii* เป็น DNA ต้นแบบของปฏิกิริยาลบ (negative control) และให้นำเป็นปฏิกิริยาควบคุมเชิงลบในการศึกษานี้

การตรวจเชื้อ LXX จากตัวอย่างอ้อยด้วยเทคนิค qPCR-HRM

นำ gDNA ที่สกัดจากอ้อยปริมาณ 10 ng ไปตรวจหาเชื้อ LXX โดยใช้ไพรเมอร์ LayF และ LayS ซึ่งจำเพาะกับเชื้อในจีนัส *Leifsonia* spp. โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Young (2017) ด้วยเทคนิค qPCR-HRM โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา และขั้นตอนการทำปฏิกิริยาดังแสดงใน Table 1 โดยใช้ DNA ส่วนของ ITS จากเชื้อ LXX เป็น DNA ต้นแบบในปฏิกิริยาบวก (Positive control)

การยืนยันเชื้อ LXX ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ ITS และยีน *Pat1*

คัดเลือกตัวอย่างที่ให้ผลบวกจากการตรวจด้วย 3 วิธี มาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยวิธีการ conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในการทดลองนี้คือ Lxx16s-F และ Lxx23s-R ซึ่งครอบคลุมบริเวณ ITS ทั้งหมด จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้ไปสกัดด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป GeneP H low™ Gel/PCR Kit (Geneaid®, Taiwan) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ และนำ DNA ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซีย

นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มาเปรียบเทียบกับ DNA จากฐานข้อมูลใน GenBank ตามวิธีการของ Young and Nock (2017) โดยใช้การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี MUSCLE วิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วย Tamura 3-parameter algorithm ที่ค่า Bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยวิธี maximum likelihood ด้วยโปรแกรม MEGA7 (Kumar et al., 2016) จากนั้นนำผลจากวิธีการตรวจหาเชื้อ LXX ทั้งสามวิธีมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกัน และแสดงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม GeneDoc (Nicholas et al., 1997)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างอ้อย และการเตรียม gDNA จากสารสกัดอ้อย

จากการเก็บตัวอย่างจากสถานีผสมพันธุ์อ้อย บ้านทิพuye อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี ได้จำนวน 220 ตัวอย่าง และศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี ได้จำนวน 20 อย่าง รวมทั้งหมดจำนวน 240 ตัวอย่าง จากการสกัด gDNA จากอ้อยทั้งหมด จำนวน 240 ตัวอย่าง และนำมาตรวจสอบคุณภาพ

gDNA ในการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ Sac18S-F2/Sac18S-R พบว่า gDNA จากอ้อยทุกตัวอย่างสามารถทำปฏิกิริยา PCR ได้ โดยพบแถบ DNA ที่ตรงกับปฏิกิริยาควบคุมบวก (positive control) ที่ใช้การศึกษาในครั้งนี้ โดยให้ปฏิกิริยาลบกับปฏิกิริยาควบคุมลบ คือ DNA ของเชื้อ *Acidovorax citrulli* และน้ำ (Figure 1) แสดงว่าวิธีการที่ใช้สกัดและคุณภาพของ gDNA ที่ได้รับจากวิธีการข้างต้นมีคุณภาพดี นำมาใช้ตรวจหาเชื้อได้

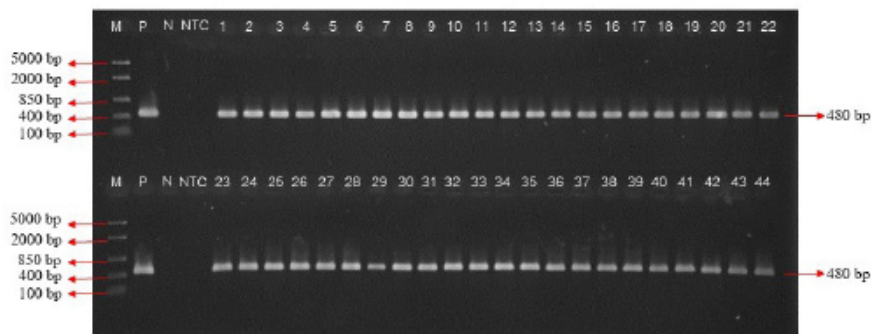


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of amplicon amplified by Sac18S-F2/Sac18S-R primers from gDNA of sugarcane samples (P = sugarcane gDNA, N = gDNA of *Acidovorax citrulli*, NTC = Non template control (dH₂O) and Lane 1-44 = gDNA of sugarcane samples)

การตรวจเชื้อ LXX จากตัวอย่างอ้อยด้วยเทคนิค conventional PCR

จากการตรวจหาเชื้อ LXX ในตัวอย่างอ้อย ที่เก็บตัวอย่างจากสถานีผสมพันธุ์อ้อยบ้านทิพuye และศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี รวม 240 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CxxITSf#5/CxxITSr#5 ที่จำเพาะกับบริเวณ ITS ให้ผลปฏิกิริยาเป็นบวกโดยพบแถบ DNA ขนาดประมาณ 305 bp จำนวน 61 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 25.42 โดยตรวจพบจากสถานีผสมพันธุ์อ้อยบ้านทิพuye 51 ตัวอย่าง และศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี 10 ตัวอย่าง (Figure 2A) และการตรวจหาเชื้อ LXX ด้วยไพรเมอร์ Pat1-F2/Pat1-R2 ที่จำเพาะกับยีน

Pat1 พบปฏิกิริยาเป็นบวกโดยพบแถบ DNA ขนาดประมาณ 597 bp จำนวน 29 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 12.08 โดยตรวจพบจากสถานีผสมพันธุ์อ้อยบ้านทิพuye เท่านั้น (Figure 2B) จากการศึกษาพบว่าไพรเมอร์ CxxITSf#5/CxxITSr#5 มีประสิทธิภาพในการตรวจหาเชื้อ LXX จากตัวอย่างอ้อยได้ดีกว่าไพรเมอร์ Pat1-F2/Pat1-R2 (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sun et al. (2019) ที่พบว่าไพรเมอร์ CxxITSf#5/CxxITSr#5 ให้ความไวในการตรวจหาเชื้อ LXX ได้ต่ำถึง 1 pg ของ gDNA ซึ่งดีกว่าไพรเมอร์ Pat1-F2/Pat1-R2 ถึง 10 เท่า ซึ่งตรวจหา gDNA ของเชื้อ LXX ได้ต่ำสุดเพียง 10 pg

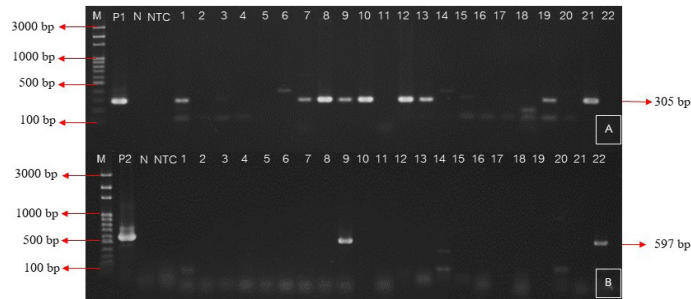


Figure 2 Agarose gel electrophoresis of amplicons from sugarcane gDNA using two set primers of conventional PCR (A) CxxITSf#5/CxxITSr#5 primers and (B) Pat1-F2/Pat1-R2 primers (P1 = DNA of ITS fragment, P2 = DNA of *Pat1* gene, N = gDNA of *Acidovorax citrulli*, NTC = Non template control (dH₂O) and Lane 1-22 = gDNA of sugarcane samples)

การตรวจเชื้อ LXX จากตัวอย่างอ้อยด้วยเทคนิค qPCR-HRM

จากการศึกษาการใช้เทคนิค qPCR-HRM ตรวจหาเชื้อ LXX ในตัวอย่างอ้อยในประเทศออสเตรเลียพบว่า ตัวอย่างอ้อยที่มีเชื้อ LXX จะมีค่า melt peak ของผลผลิต qPCR ที่อุณหภูมิ 83.6 °C ซึ่งเมื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต qPCR พบว่าทุกตัวอย่างที่ให้ผลบวก จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS เหมือนกับเชื้อ LXX สายพันธุ์ DNPRC108 (accession no. DQ232616.2) ในขณะที่เชื้อที่ให้ค่า melt peak ที่ต่างไป จะเป็นเชื้อ *Leifsonia* spp. (Young, 2017)

ในการศึกษาครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับผลการตรวจเชื้อ LXX ในอ้อย ด้วยเทคนิค qPCR-HRM ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Young (2017) โดยพบตัวอย่างอ้อยที่มีผลผลิต qPCR มีค่า melt peak ที่อุณหภูมิ 83.6 °C จำนวน 96 ตัวอย่าง เช่นเดียวกับอุณหภูมิ melt peak ของบริเวณ ITS ของเชื้อ LXX ที่ใช้เป็นตัวอย่างควบคุมบวก (Table 2 และ Figure 3) ซึ่งตัวอย่างที่ตรวจพบคิดเป็นร้อยละ 40 โดยตรวจพบในตัวอย่างจากสถานีผสมพันธุ์อ้อยบ้านทิพเย 91 ตัวอย่าง และศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี 5 ตัวอย่าง

Table 2 Comparison of PCR based methods and primer pairs for the detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LXX) in sugarcane samples

Method	Primer pair	PCR product size or melt peak (°C)	Target region	Number of LXX detection/total
qPCR-HRM	LayF/LayS	128 bp/83.6°C	ITS of <i>Leifsonia</i> generic	96/240
conventional PCR	CxxITSf#5/CxxITSr#5	305 bp	ITS of LXX	61/240
	Pat1-F2/Pat1-R2	597 bp	<i>Pat1</i> of LXX	29/240

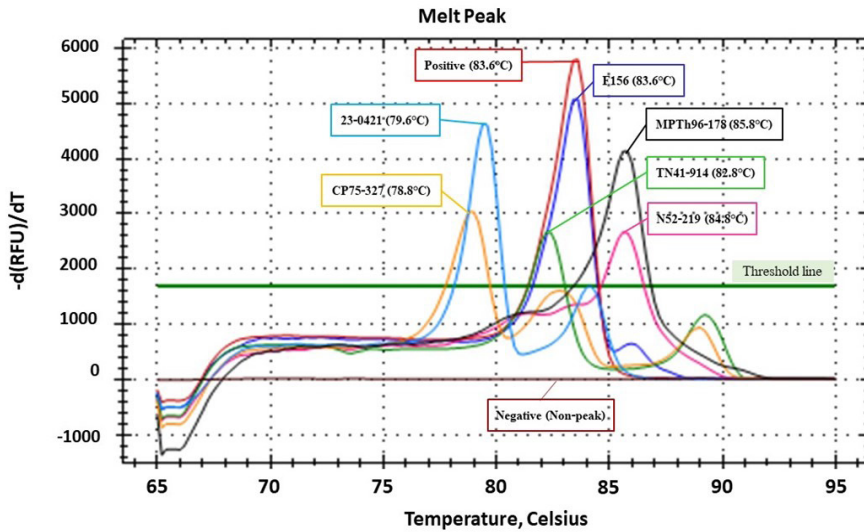


Figure 3 Melt peak data of qPCR product amplified with LayF/LayS primers of sugarcane samples in this study. Binned peak corresponds to LXX at 83.6 °C

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อการยืนยันเชื้อ LXX

เพื่อตรวจสอบความใช้ได้ของวิธี (validation) ในการตรวจหาเชื้อ LXX ด้วยเทคนิค qPCR-HRM จากตัวอย่างย่อย เมื่อสุ่มตัวอย่างย่อยที่ให้ผลบวกกับวิธีการ qPCR-HRM จำนวน 5 ตัวอย่างคือ CP110 CO285 F156 Ph156-266 และ YuanJeing2 มาศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ขนาด 606 bp ครอบคลุมตำแหน่งของไพรเมอร์ LayF/LayS ของผลิตภัณฑ์ qPCR-HRM และจัดกลุ่มความสัมพันธ์จากความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าทุกตัวอย่างในการทดลองนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS มีความเหมือน 100% และจัดกลุ่มความสัมพันธ์จาก

ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS อยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อสายพันธุ์อ้างอิง LXX สายพันธุ์ CTCB07 (accession no. AE016822.1) และเชื้อ LXX สายพันธุ์ DNPRC108 (accession no. DQ232616.2) (Figure 4 และ Figure 5) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Young and Nock (2017) ที่ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ LXX จำนวน 24 ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับเทคนิค qPCR-HRM พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของทุกตัวอย่างเหมือนกัน 100% กับเชื้อ LXX สายพันธุ์ DNPRC108 เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเทคนิค qPCR-HRM ให้ผลในการตรวจหาเชื้อ LXX ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ

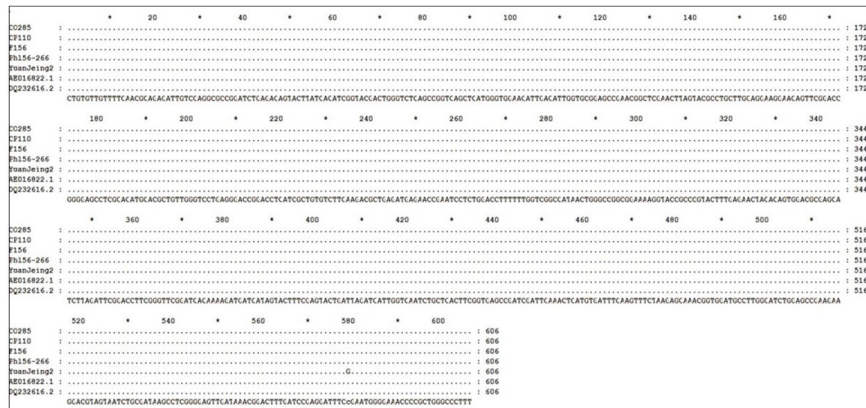


Figure 4 Aligned sequences of the ITS sequence (606 bp) of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LXX) from this study (CO285, CP110, F156, Ph156-266 and YuanJeing2) with the ITS reference sequences of LXX strain CTCB07 and DNPRC108 from GenBank by program GeneDoc (Nicholas et al., 1997)

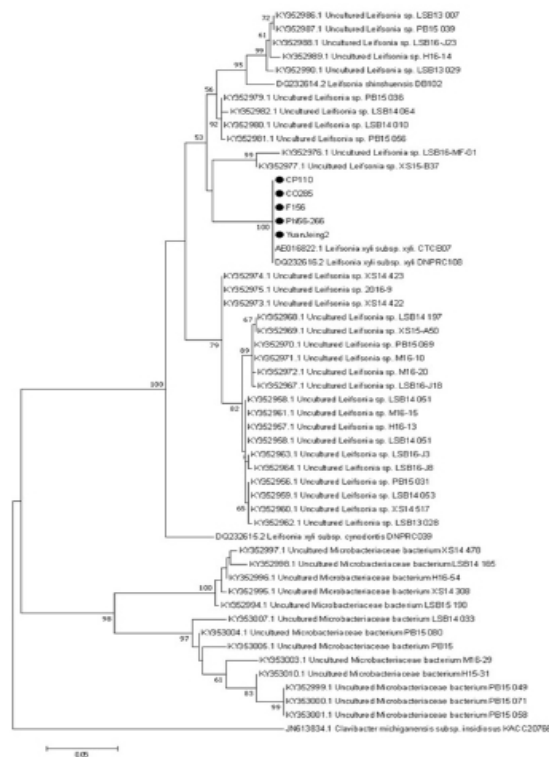


Figure 5 Maximum likelihood tree based on 606 bp of 16S-23S ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) sequence of *Leifsonia* spp. and their relative species. The phylogenetic tree was tested by 1,000 bootstrap replications, with node support greater than 50% indicated. Samples in this study labeled by the black circle

การเปรียบเทียบผลวิธีการตรวจหาเชื้อ LXX ด้วยเทคนิค conventional PCR qPCR และ qPCR-HRM

จากการเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ LXX ในตัวอย่างอ้อยที่เก็บจากสถานีผสมพันธุ์อ้อยบ้านทิพย์ อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี และศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี รวมทั้งหมอดจำนวน 240 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค conventional PCR และ qPCR-HRM จากการทำปฏิกิริยา qPCR ด้วยไพรเมอร์ LayS/LayF โดยยังไม่วิเคราะห์ค่า melt peak ของผลผลิต PCR พบตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก 197/240 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยากับเชื้อในจีนัส *Leifsonia* ที่ไม่ได้จำเพาะกับเชื้อ LXX เท่านั้น แต่เมื่อใช้เทคนิค qPCR ร่วมกับ HRM (qPCR-HRM) โดยการวิเคราะห์ค่าอุณหภูมิของผลผลิต PCR หรือค่า melt peak ตามการทดลองของ Young (2017) พบว่าตัวอย่างที่มีเชื้อ LXX จะมีค่า melt peak ที่อุณหภูมิ 83.6 °C ในขณะที่ตัวอย่างที่มีเชื้อ *Leifsonia* spp. ชนิดอื่น ๆ จะมี melt peak ที่ต่างออกไป โดยเทคนิค qPCR-HRM นี้สามารถตรวจพบเชื้อ LXX ได้มากกว่าวิธีการ conventional PCR ด้วยไพรเมอร์ CxxITS#5/CxxITS#5 (61/240) และไพรเมอร์ Pat1-F2/Pat1-R2 (29/240) ดังนั้นจากผลการศึกษาจึงทำให้สรุปได้ว่าวิธีการตรวจด้วยเทคนิค qPCR-HRM มีประสิทธิภาพดีกว่าการตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR เนื่องจากสามารถตรวจตัวอย่างที่ให้ผลบวกมากกว่าวิธีการอื่น ๆ โดยยืนยันความถูกต้องของผลการตรวจด้วยผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต qPCR-HRM ตรงกับเชื้ออ้างอิง วิธีการตรวจด้วยเทคนิค qPCR-HRM สามารถตรวจตัวอย่างอ้อยและยืนยันผลการตรวจผ่านการวิเคราะห์อุณหภูมิของ melt peak ได้เสร็จในการทำงานในหลอดระบบปิดเพียงขั้นตอนเดียว นอกจากนี้ เนื่องจากไพรเมอร์ LayF/LayS ไม่ได้จำเพาะกับเชื้อ LXX เท่านั้น ดังนั้นอาจมีการพัฒนาไพรเมอร์ให้จำเพาะ โดยพัฒนาจากคู่ไพรเมอร์ Cxx1/Cxx2 และ CxxITS#5/ CxxITS#5 (Fegan et al., 1998) ซึ่งพบว่ามีค่าจำเพาะที่สูงกว่า และมีความไวในการตรวจหาเชื้อ LXX ที่ดีกว่าไพรเมอร์ Pat1-F2/Pat1-R2 (Sun et al., 2019) มาใช้ร่วมกันเทคนิค qPCR-HRM ซึ่งคาดว่าจะให้ความไวในการตรวจหาเชื้อที่ดีขึ้นและตรวจสอบความถูกต้องของผลผลิต PCR ได้

สรุป

การตรวจหาเชื้อ LXX ในตัวอย่างอ้อยด้วยเทคนิคบนพื้นฐาน PCR พบว่าการตรวจด้วยเทคนิค qPCR-HRM ด้วยไพรเมอร์ LayS/LayF มีความไวสูง สามารถตรวจหาเชื้อ LXX ได้ถึง 96 ตัวอย่างจากทั้งหมด 240 ตัวอย่าง รองลงมาคือตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR ด้วยไพรเมอร์ CxxITS#5/CxxITS#5 ที่มีความจำเพาะกับบริเวณ ITS ตรวจพบ 61 ตัวอย่าง และด้วยไพรเมอร์ Pat1-F2/Pat1-R2 ที่มีความจำเพาะกับยีน *Pat1* ตรวจพบ 29 ตัวอย่าง เทคนิค qPCR-HRM ให้ความแม่นยำสูงในการตรวจหาเชื้อ LXX นอกจากให้ผลผลิต PCR ที่คาดไว้ ยังใช้การวิเคราะห์อุณหภูมิ melt peak ของผลผลิต PCR ที่มีค่าอุณหภูมิจำเพาะที่ 83.6 °C เป็นการยืนยันความถูกต้องของการตรวจ และใช้ปฏิกิริยาในหลอดทดลองปิดเพียงขั้นตอนเดียวของการตรวจ และใช้ปฏิกิริยาในหลอดทดลองปิดเพียงขั้นตอนเดียว

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือวิจัย และงบประมาณประจำปี 2560 ภายใต้โครงการ “การสำรวจเฝ้าระวังโรคต่อแคระแกร็นของอ้อย” รหัสโครงการ AG-BIO/60-006-003 จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และ ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ตามทิศทางการยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562 ขอขอบคุณสถานีผสมพันธุ์อ้อยบ้านทิพย์ อ.ทองผาภูมิ จ.กาญจนบุรี และศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี กรมวิชาการเกษตร อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างอ้อย และขอขอบคุณ Dr. Young-Bao Pan จาก USDA-ARS, Sugarcane Research Laboratory, Louisiana, USA ที่ให้ความอนุเคราะห์ DNA จากผลผลิต PCR ที่ใช้เป็นตัวควบคุมบวกในการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

- วีรกรรม์ แสงไทย, ศุภรัตน์ สงวนรังศิริกุล และ Yong-Bao Pan. 2561. การตรวจสอบเชื้อ *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* สาเหตุโรคตอแคะแกระแกร็นของอ้อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของไทยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. เกษนเกษตร. 46: 202-211.
- Aljanbi, S.M., L. Forget, and A. Dookun. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol-free sugarcane DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1–8.
- Bradbury J.F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International Mycological Institute, Wallingford.
- Evtushenko, L.I., L.V. Dorofeeva, S.A. Subbotin, J.R. Cole, and J.M. Tiedje. 2000. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of 'Corynebacterium aquaticum' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. nov., nom. rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. MicR.* 50: 371-380.
- Falloon, T., E. Henry, M.J. Davis, E. Fernandez, J.C. Girard, P. Rott, and J.H. Daugrois. 2006. First report of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* causal agent of ratoon stunting of sugarcane in Jamaica. Available: <https://doi.org/10.1094/PD-90-0245B>. Accessed Feb.21, 2019.
- Fegan, M., B.J. Croft, D.S. Teakle, A.C. Hayward, and G.R. Smith. 1998. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane with a polymerase chain reaction based assay. *Plant Pathol.* 47: 495–504.
- Fu, H.Y., S.R. Sun, J.D. Wang, K. Ahmad, H.B. Wang, R.K. Chen, and S.J. Gao. 2016. Rapid and quantitative detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane stalk juice using a real-time fluorescent (TaqMan) PCR assay. *Biomed Res. Int.* Article ID 2681816. Available: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/2681816/>. Accessed Nov.14, 2019.
- Grisham, M.P., Y.-B. Pan, and E.P. Jr Richard. 2007. Early detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 91: 430-434.
- Kumar, S., G. Stecher, and K.Tamura. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870–1874.
- Lee, M.S., T.Y. Su, Y.Y. Lien, and S.C. Sheu. 2017. The development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid authentication of five forbidden vegetables in strict vegetarian diets. Available: <https://www.nature.com/articles/srep44238.pdf>. Accessed Nov.14, 2019.
- Liu, J., L.P. Xu, J.L. Guo, R.K. Chen, M.P. Grisham, and Y.X. Que. 2013. Development of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane. *Biomed Res. Int.* Article ID 357692. Available: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/357692/>. Accessed May.17, 2019.
- Nicholas, K.B., H.B. Nicholas, and D.W. Deerfield. 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW.NEWS* 4:14. Available: <https://www.scienceopen.com/document?vid=fef1e5ea-46ec-4711-a8ad->

- e83537a49429. Accessed Jan.9, 2020.
- Pelosi C.S., M.V. Lourenço, M. Silva, A.Z. Santos, S.C. França, and M. Marins. 2013. Development of a Taqman real-time PCR assay for detection of *Leifsonia xyli* subsp *xyli*. Tropical Plant Pathol. 38: 343-345.
- Sun, S.R, J.L.Chen, Y.Y. Duan, N. Chu, M.T. Huang, H.Y.Fu, and S.J.Gao. 2019. Improved primers for the specific detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane using a conventional PCR assay. Plant Dis. 103: 3251-3258.
- Wu Q.B., Y.B. Pan, D.G. Zhon, M.P. Grisham, S.W. Gao, Y.C. Su, J.L. Guo, L.P. Xu, and Y.X. Que. 2018.A comparative study of three detection techniques for *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, the causal pathogen of sugarcane ratoon stunting disease. Biomed Res. Int. Article ID 2786458. Available: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2018/2786458/>. Accessed Sep.21, 2019.
- Young, A.J. 2017. Validation of LSB-PCR diagnostic for ratoon stunting disease and characterisation of non-*Lxx* strains of *Leifsonia* associated with sugarcane: final report 2014/086. Available: <https://elibrary.sugarresearch.com.au/handle/11079/16949>. Accessed Aug.18, 2019.
- Young, A.J., and C.J. Nock. 2017. Molecular detection of diverse *Leifsonia* strains associated with sugarcane. Plant Dis. 101: 1422-1431.