

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยด้วยยีน Immunodominant membrane protein (Imp)

Detection of the phytoplasmas associated with sugarcane diseases based on Immunodominant membrane protein (Imp) gene

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล^{1*}, เบนจวรรณ รัตวัตร¹, วีรกรณ์ แสงไสย์¹, วิทยาศาสตร์ ภัคดี¹,
จุฑามาศ สอนเมือง¹, Youichi kobori² และ Shigeyuki Kakizawa²

Suchirat Sakuanrungsirikul^{1*}, Benjawan Ruttawat¹, Weerakorn Saengsai¹,

Wittaya Sripakdee¹, Chuthamart Sonmueang¹, Youichi kobori²

and Shigeyuki Kakizawa²

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น 180 ถ. มิตรภาพ ต.ศิลา อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40000

¹ KhonKaen Field Crops Research Center, 180 Mitraphap Rd., Sila, Muang, KhonKaen. Thailand 40000

² Japan International Research Center for Agricultural Sciences, 1-1 Ohwashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8686, Japan

* Corresponding author: suchirat1@yahoo.com

บทคัดย่อ: โรคใบขาว กอฝอย และโรคกอตะไคร้ เป็นโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ต่างกันสามชนิด สร้างความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมอ้อยของไทย งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาวิธีพีซีอาร์ในการตรวจเป้าหมายยีน IMP ของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งเป็นหนึ่งยีนอนุรักษ์สำคัญที่ทำหน้าที่ในส่วน host-phytoplasma interaction ตรวจพบได้ในเชื้อไฟโตพลาสมาหลายชนิด จากการทดลองพบว่า สามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจจำยีนชนิดนี้ได้ มีความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยได้ทั้ง 3 ชนิด แต่ไม่จับกับเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างจากหญ้าและมันสำปะหลัง แสดงถึงไพรเมอร์ที่ได้มีถูกต้อง แม่นยำ และจำเพาะต่อเชื้อในอ้อย สภาวะในการทำปฏิกิริยาที่ได้ทำให้สามารถตรวจพบเชื้อได้ต่ำถึง 4.26×10^1 copy/ μ l 25 นาโนกรัมในดีเอ็นเอพืช ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองโรคไฟโตพลาสมาในอ้อยก่อนการขยายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: โรคใบขาว โรคกอฝอย โรคกอตะไคร้ การตรวจคัดกรองโรค

ABSTRACT: Sugarcane white leaf (SCWL), sugarcane grassy shoot (SCGS) and sugarcane green grassy shoot (SCGGS) diseases are the most devastating diseases that impact great lost in sugarcane industries in Thailand. The objective of this study was to develop IMP of the phytoplasma This is one of the important conservative genes responsible for the host-phytoplasma interaction detected in a wide range of phytoplasma strains. The result revealed that The primers showed specificity in detection of the 3 types phytoplasmas in sugarcane but not phytoplasmas in grass and cassava. and the lowest detectable concentration of phytoplasma was equivalence to 4.26×10^1 copy/ μ l 25 ng plant DNA. This method can be used as an effective screening of the sugarcane prior to propagation.

Keywords: Sugarcane white leaf, sugarcane grassy shoot, sugarcane green grassy shoot, disease screening

บทนำ

โรคใบขาวอ้อยมีการระบาดอย่างต่อเนื่องของพื้นที่ปลูกอ้อยในประเทศไทยและส่งผลเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตอ้อย เป็นสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งเชื้อไฟโตพลาสมา เป็นจุลินทรีย์ขนาดเล็กที่ไม่มีผนังเซลล์ มีขนาดเล็ก ประมาณ 200-800 นาโนเมตร จีโนม 530-1350 กิโลเบส (Macone et al., 1999) เซลล์มีองค์ประกอบของ G+C ของดีเอ็นเอต่ำ

คือประมาณ 23-29 mol% (Kollar and Seemüller, 1989) ยังพบอาศัยอยู่เฉพาะในส่วนของ sieve element ของเซลล์ท่ออาหารพืช และมีการแพร่กระจายของเชื้อจากการถ่ายทอดติดไปกับท่อนพันธุ์จากต้นที่เป็นโรค ซึ่งโรคใบขาวอ้อยแบ่งออกตามอาการที่พบเป็น 3 ชนิดได้แก่ โรคใบขาว (sugarcane white leaf: SCWL) โรคใบขาวร่วมกับอาการกอฝอย (sugarcane grassy shoot : SCGS) และโรคกอตตะไคร้ (sugarcane green grassy shoot : SCGGs) โรคทั้งสามชนิดนี้เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ต่างกัน การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยถูกพัฒนาเพิ่มมากขึ้นเพื่อควบคุมการแพร่ระบาดของโรค ซึ่งมีการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุล (genetic marker) โดยมีการพัฒนาเทคนิคต่างๆ เช่น เทคนิค conventional PCR (cPCR) หรือ Nested-PCR ตรวจจับเชื้อไฟโตพลาสมาในส่วนของยีน 16s-23s rDNA intergenic spacer region และเทคนิคนิวคลีอิกไฮบริไดเซชัน (nucleic acid hybridization) เป็นการตรวจจับเชื้อบริเวณยีนในส่วน Sec A (กาญจนนา และคณะ 2555) และเทคนิค quantification real-time PCR (qPCR) ตรวจจับเชื้อไฟโตพลาสมา บริเวณยีน Sec A (ศุจิรัตน์ และคณะ , 2556; 2558)

ในปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใด ๆ ที่สามารถแก้ไข้ปัญหาที่เกิดจากโรคใบขาวได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ วิธีการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคที่ ดีที่สุด ณ ขณะนี้ คือ การใช้ท่อนพันธุ์อ้อยที่สะอาดปราศจากโรคควบคู่กับการจัดการที่ดีในแปลงผลิตเพื่อแผ้วถางแมลงพาหะนำโรค วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ คือ หาวิธีการตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูงเข้ามาช่วยแก้ปัญหา ข้างต้น ซึ่งในปัจจุบันพบว่า *imp* gene เป็นยีนชนิดหนึ่งของ immunodominant membrane protein genes (IDPs) ที่ สามารถตรวจพบได้ง่ายภายใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อไฟโตพลาสมา เข้าทำลาย (Morton et al., 2003) ดังนั้น นักวิจัยจึงได้พยายามพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อนำมาใช้ตรวจหา *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งนับว่าเป็นยีนทางเลือกใหม่ที่มีศักยภาพสูงสำหรับพัฒนางานวิจัยทางด้านการตรวจสอบ และสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยทางด้านอินโมโนวิทยาได้ในอนาคต

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็นเอ : เก็บตัวอย่างอ้อยที่มีระดับความรุนแรงของอาการของโรคใบขาวอ้อยต่างกันคือ white leaf: SCWL, grassy shoot : SCGS และ green grassy shoot : SCGGs (Figure 1) ที่สำรวจได้จากแหล่งระบาดของโรค 3 จังหวัด คือ จังหวัดกาญจนบุรี บุรีรัมย์ และจังหวัดศรีสะเกษ จำนวนอาการละ 10 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเนื้อเยื่อใบอ้อย 3 กรัม ใส่ลงแล้วเติมไนโตเจนเหลวจากนั้นบดให้ละเอียดเป็นผงใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Li and Midmore (1999) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Nanodrop (NanoDrop Lite Spectrophotometer, ThermoScientific, USA)

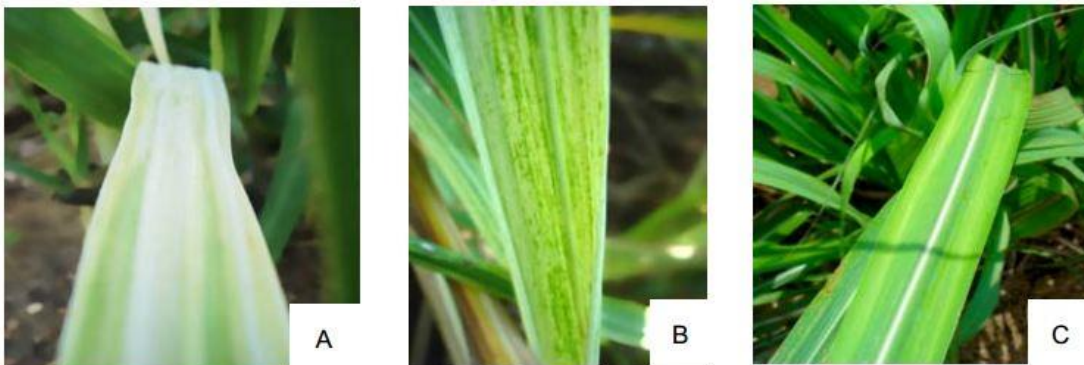


Figure 1 Sugarcane white leaf symptom expression from A) white leaf: SCWL, B) grassy shoot : SCGS and C) green grassy shoot : SCGGs

การออกแบบไพรเมอร์ IMP

ได้ใช้ลำดับเบสจากงานวิจัยของ Kakizawa et al., 2009 ซึ่งมีขนาดที่ 1250 เบส และนำดีเอ็นเอที่มี 3 เชื้อ ได้แก่ SCWL, SCGS, SCGGs มาสังเคราะห์เพื่อเพิ่มปริมาณหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sequencing ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเพื่อใช้ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยโปรแกรม Clustalx2 MEGA-X, Tm calculator ซึ่งมีตำแหน่งที่ 262 เบส เพื่อใช้ในงานวิจัยครั้งนี้

TTTTTTAAAAATAAATAATTTGKTAATGTTTTTTTATTGAATTGCTAAATTATGTTATAATTATGGTATTGAATCTTT
 ATAAAAAAGATTTAATAATAAAATAAATACAAAAAGATTAATATAGGAGGAAAAATAAAAAATATATTATGCAAATG
 AAAATTTTTGGTACACAAAAAAGGTAATAAGCTATTATTACATCTTCAGTTGTTGGTTTTTAGCAATTTTACTAAC
 TATAGCTTATTATTTAAAAKGGTGGCCTTTTTTCAAAAACACTAAACGAAAAGACAATAAAAAAATTTGAAAAAGAAATA
 GTACTTAAAAGTATAACAGAAGAAGAAGTTTCAGATGCAGATAAAGCTGAAAAGCTTTAAAAGAATTTAAAAGGAAAA
 AAGTCTCAAATAGAGAAATTGTTAGGAATAGTTGAAAACATAATAAAAAAAGCCCAGCTGACAAAAAGTAAAAGAC
 GCAACAATTGAAACATTTAATTCAATTGTAATAATCAATAGATGAACTAAAAGTAGATAAATCTAATTATACTAAATCTG
 ATTTTAAAGACAAATACAATTTAGCAGCTGATTCATCTAAATTATCCACTGCTTTTTCAAACCTAAAAAGTGATTTAGA
 AATTAATAAATAATTTAAAAATTAATTTATTTTATTATTTAAAAATTTATTTCTTTTTTTTTAAAAAAAAGTAAAAAA
 ATATGCAAAGCATATTTTTTTTTTTATTTACTATTAAAACCTTTTTTTATAGCAARAAAAATATAAACCTTTAAATAAA
 GGGATGAGGGTTAAAAGGGCC

การเพิ่มปริมาณยีน IMP

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีนดีเอ็นเอบริเวณยีน IMP โดยทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์ 15 ไมโครลิตรต่อหนึ่งหน่วยตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์ IMPfor (GGTAAAATAGCTATTATTACAT) และ IMPfor (ATGTTTCAATTGTTGCGTCTTTT) มีดังนี้ 1x PCR buffer A (500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 9.1 at 20°C) and 0.1% Triton™ X-100.; Vivantis), 0.2 ไมโครโมลาร์ dNTP Taq DNA polymerase (Vivantis) ความเข้มข้น 0.1 หน่วยต่อหนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 0.5 ไมโครโมลาร์ ผสมสารละลายให้เข้ากัน โดยนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 วินาที สังเคราะห์ ดีเอ็นเอในเครื่องพีซีอาร์ กำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามเวลาดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

การโคลนยีน IMP เชื้อไฟโตพลาสมา

นำดีเอ็นเอของยีน IMP ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GF-1 AmbiClean Kit (Gel & PCR) (Vivantis) จากนั้นนำมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTG19-T PCR Cloning Vector (PCR Cloning Vector, Vivantis) นำพลาสมิดดังกล่าวเข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α competent cells (HIT Competent Cells, RBCBioscience) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีบนอาหารแข็ง blue/white selection (X-Gal) ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลินทำการสกัดพลาสมิดด้วยน้ำยาสำเร็จรูป GF1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis) วัดความเข้มข้นพลาสมิดด้วยเครื่อง Nanodrop (NanoDrop Lite Spectrophotometer, ThermoScientific, USA) จากนั้นคำนวณจำนวน copies ตามสูตรของWhelan et al. (2003) ดังนี้

$$\text{Number of copies} = \frac{[6.02 \times 10^{23} (\text{copies mol}^{-1})] \times [\text{DNA amount (g)}]}{[(\text{DNA length (bp)} \times 650 (\text{g mol}^{-1} \text{ bp}^{-1}))]}$$

ทำการเจือจางความเข้มข้นดีเอ็นเอ 10 เท่า ตั้งแต่ 10^{10} ถึง 10^{-1} DNA copies จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ทำการเจือจางพลาสมิด pTG19-T-IMP ให้มีปริมาณเชื้อ ต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง 10^{10} ถึง 10^{-1} copies จากนั้นทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ซอฟต์แวร์ Abs Quant/2nd Derivative Max โดยตั้งค่า PCR amplification efficiency (E) เท่ากับ 2 ซึ่งทำให้มีค่า 100% efficiency ซึ่งบ่งบอกถึงควมมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 2 เท่า ในแต่ละรอบ

ผลการศึกษา

ความไว (sensitivity) ของวิธีการ IMP-PCR : จากการโคลนยีน IMP ของเชื้อไฟโตพลาสมา ขนาด 262 เบส ด้วย พลาสมิด pTG19-T PCR Cloning Vector (PCR Cloning Vector, Vivantis) เมื่อนำพลาสมิด pTG19-T-IMP ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 10 เท่า จากเริ่มต้นที่ 10^0 ถึง 10^{-10} copies มาสร้างกราฟมาตรฐาน (Figure 2) พบว่า ค่า PCR amplification efficiency (E) มีค่าเท่ากับ 1.868 (Error = 0.0942) ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกับค่าทฤษฎี (E = 2.000) แสดงถึง

ความมีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 2 เท่า ในแต่ละรอบของสร้างกราฟมาตรฐาน และยื่นเป้าหมายมีค่า T_m เท่ากับ 75.76°C จากกราฟมาตรฐานสามารถตรวจสอบค่าความลาดเอียง (slope) ซึ่งบ่งบอกถึงความสามารถในการเจือจางปริมาณดีเอ็นเอโดยเมื่อดีเอ็นเอมีความเจือจาง 10 เท่า และ ค่า E เท่ากับ 100 % จะใช้จำนวน 42 รอบ การวิเคราะห์ในครั้งนี้พบค่าความลาดเอียงเท่ากับ 3.362 แสดงให้เห็นว่าแต่ละความเข้มข้นที่ต่างกัน 10 เท่า ผลการตรวจสอบ amplification curve พบค่าที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณเชื้อจากกราฟมาตรฐานของยีน *IMP* ที่ผลผลิตขนาด 262 เบส สามารถตรวจได้ระดับต่ำถึง $4.26 \times 10^1 \text{ copy}/\mu\text{L}$

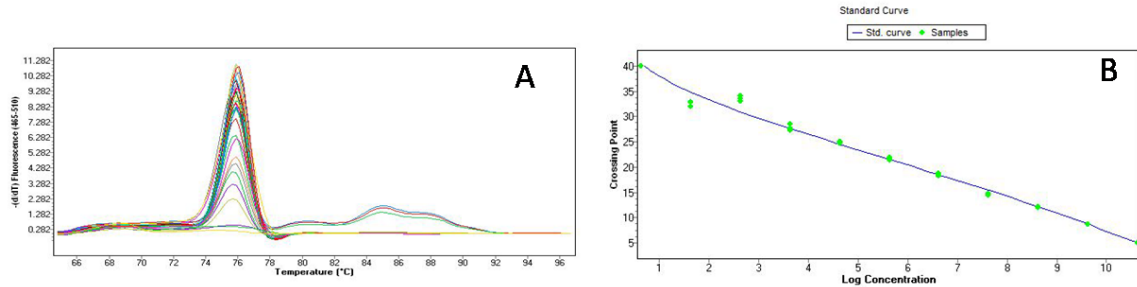


Figure 2 A. Melting temperature of dilution recombination plasmid (Insert *IMP* gene),
 B. Standard curve of dilution recombination plasmid (Insert *IMP* gene)

ความถูกต้อง (accuracy) และความครอบคลุม (broad spectrum) ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยของชุดไพรเมอร์ *IMP* gene

ความถูกต้องและความแม่นยำของไพรเมอร์ : ในการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยไพรเมอร์ยีน *IMP* พบว่า สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาได้ดีในอ้อย และไม่สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดอื่น จากงานวิจัยนี้ได้ใช้อ้อยป่า (*Saccharum spontaneum* L.) มาศึกษาและใช้ยีน *Actin* ศึกษาเปรียบเทียบเพื่อเป็นยืนยันอ้างอิงจากตัวอย่างอ้อยป่าทั้ง 4 ตัวอย่าง โดยใช้ ยีน *Actin* พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอได้ และใช้ ไพรเมอร์ยีน *IMP* ไม่สามารถเกิดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวได้ (Figure 3) นอกจากนั้นไพรเมอร์ยีน *IMP* ยังระบุความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยได้ดี เมื่อเทียบกับยีน *16s-23s* rDNA ด้วยชุดไพรเมอร์ MLO-X/MLO-Y และ P1/P2 พบว่า การเกิดแถบ ดีเอ็นเอของไพรเมอร์ยีน *IMP* มีแถบเดียว ส่วนไพรเมอร์ยีน *16s-23s* rDNA มีการเกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบ (Figure 4)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *IMP* ไปเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *IMP* จำนวน 262 เบส (base) มีความแตกต่างกัน 22 ตำแหน่ง และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ไปสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม MEGA รุ่น 7.0 จะได้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.0037 – 0.0199 distance จากนั้นสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม 4 วิธี โดยทดสอบวิธีการจัดกลุ่มทุกวิธี คือ maximum likelihood, maximum parsimony, neighbor joining และ UPGMA แล้วเลือกวิธีการจัดกลุ่มที่ให้ผลการจำแนกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ 1 อการโรคใบขาวเชื้อไฟโตพลาสมา ได้แก่ โรคใบขาว (sugarcane white leaf: SCWL) โรคใบขาวร่วมกับอาการแตกกอฝอย (sugarcane grassy shoot : SCGS) ทั้งสองโรคนี้อาการใบอ้อยมีสีขาว กับ ชาวบเนเขียว กลุ่มที่ 2 โรคกอตตะไคร้ (sugarcane green grassy shoot : SCGS) โรคนี้อาการใบอ้อยจะไม่มีสีขาวแต่แสดงอาการโดยแตกกอฝอยคล้ายกอตตะไคร้ (Figure 5)

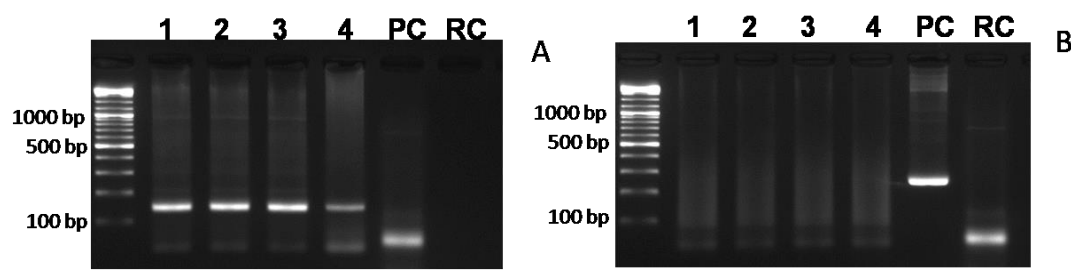


Figure 3 PCR products illustrating detection sensitivity in the diluted DNA samples extracted from leaves *Saccharum spontaneum* L. Lane 1: 1 kb DNA molecular weight. Lanes 2-5: samples

with DNA *Saccharum spontaneum* L. A: *Actin* gene PCR products. B: *IMP* gene PCR products (PC = Positive control RC = reaction control)

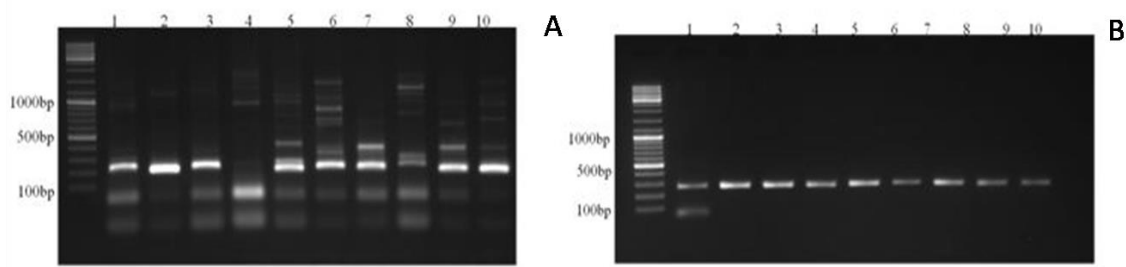


Figure 4 PCR products illustrating detection sensitivity in the diluted DNA samples extracted from leaves sugarcane. Lane 1: 1 kb DNA molecular weight. Lanes 2-10: samples with DNA SCWL SCGS and SCGG A: 16S-23S rDNA gene PCR products. B: IMP gene PCR products

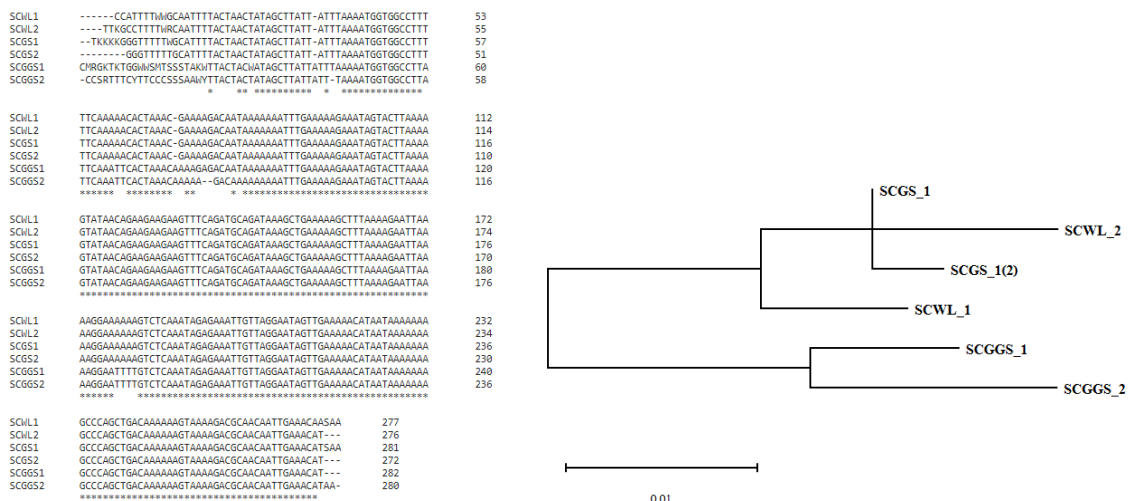


Figure 5 Alignment and Phylogeny sequencing phytoplasma of sugarcane infected with SCWL, SCGS and SCGG

วิจารณ์

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยปัจจุบันใช้เทคนิค PCR-based ซึ่งรวมถึง quantitative polymerase chain reaction (qPCR) โดยยื่นเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจ ได้แก่ 16S rRNA gene และ *secA* gene (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Cai et al., 2008, Lee et al., 2012, Bertaccini et al. 2014, Sakuanrungsirikul et al, 2013, Hanboonsong et al, 2006, Hodgetts et al., 2008) โดยที่ *secA* gene เป็น single-copy gene ในจีโนมของเชื้อไฟโตพลาสมา และ rRNA นั้นมีรายงานว่า มี 2copies วิธีการตรวจแต่ละวิธีที่ใช้ในปัจจุบันมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป การวิเคราะห์จำนวน copy number ต่ำสุดของเชื้อไฟโตพลาสมาที่สามารถตรวจจับได้ ทดสอบโดยใช้พลาสมิตลูกผสม pUC1318 ที่มีชิ้นยีนขนาด 262 bp นำมาเจือจาง ตรวจวัดความเข้มข้นของ พลาสมิตที่ได้ และคำนวณจำนวน copy number และเปรียบเทียบกับ Nested-PCR ผลการทดลองพบว่า ยีน *IMP* มีความไวกว่า nested-PCR ที่ผลผลิตขนาด 700 เบส ตรวจได้ที่ 2.66×10^2 copies/ μ l ซึ่ง nested-PCR ที่ผลผลิตขนาด 210 เบส สามารถตรวจได้ระดับต่ำถึง 1.27×10^1 copy/ μ l

ความจำเพาะของไพรเมอร์ชุด *IMP* ยีน เทียบกับ ยีน 16s-23s rDNA ชุดไพรเมอร์ MLO-X/MLO-y และ P1/P2 โดยการตรวจเชื้อใบขาวอ้อย พบว่า ไพรเมอร์ชุดหลังเกิดแถบดีเอ็นเอหลายขนาด ในขณะที่ยีน *IMP* เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดเดียว ถึงแม้ยีน 16s-23s rDNA จะถูกระบุว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อ ไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย (ชานานัฐ และคณะ, 2555) การจำแนกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย จากรายงานของ ศุจิรัตน์ และคณะ (2555ก) ที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตำแหน่ง 16s-23s rDNA พบว่า โรคใบขาวทั้งสามอาการดังกล่าวเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาต่างกัน โดยกลุ่มอาการใบขาวมี ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ SCWL phytoplasma (HQ917068.1) ในฐานข้อมูล NCBI กลุ่มอาการใบขาวร่วมกับกอตะไคร้ ตรงกับ SCGS phytoplasma (AB243298.1) ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับในงานวิจัยในครั้งนี้ ตาม (อัปสร และคณะ, 2540) ได้รายงานอาการดังกล่าวไว้ การเปรียบเทียบจำนวนความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิดนี้ รวมทั้งไอโซเลต SCWL ที่มีความแปรปรวนด้วยตำแหน่ง 16s-23s rDNA พบความแปรปรวนเพียง 4 จุดเท่านั้น จากสายดีเอ็นเอยาว 209-212 เบส และจากรายงาน ศุจิรัตน์ และคณะ (2556) พบความแปรปรวนด้วยตำแหน่ง SecA สูงถึง 31 จุด จากความยาวสาย 275 เบส แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ IMP gene ในตัวอย่างดังกล่าว พบว่ามีความแปรปรวนอยู่ที่ 22 จุด ที่มีความยาวสาย 262 เบส จากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวนี้จึงแสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง IMP gene สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการจัดจำแนกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยได้ละเอียดยิ่งขึ้น

สรุป

การพัฒนาวิธีตรวจโรคใบขาวของอ้อยวิธีใหม่ในตำแหน่ง IMP gene พบว่าได้ไพรเมอร์ชุดใหม่ที่ได้ขึ้นยีนขนาด 262 เบส ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยโดยไม่จับไฟโตพลาสมาในพืชอื่นหรือเชื้อจุลินทรีย์ ชนิดอื่น การวิเคราะห์ขึ้นยีนที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค genotyping พบว่า ให้ผลสอดคล้องกัน และการตรวจข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ของขึ้นยีนดีเอ็นเอได้เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากลพบว่าถูกต้อง วิธีการใหม่นี้ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที ทำให้สามารถรู้ผลการตรวจได้รวดเร็ว และไม่มีกระบวนการปนเปื้อนใน ปฏิภาณควบคุม ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการตรวจโรคใบขาวอ้อยได้อย่างแม่นยำ ถูกต้อง และรวดเร็ว เมื่อเทียบกับวิธี nested-PCR ตรวจเชื้อบริเวณตำแหน่ง 16s-23s rDNA พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอได้กับเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่อยู่ภายใน พืชได้ ซึ่งอาจไม่ใช่ก่อโรคได้ และไม่จำเป็นต้องชนิดพืช และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รวมประมาณ 5 ชั่วโมง

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ในความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำ การทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- ศุจิรัตน์ สวงรังศิริกุล อีรุฒิ วงศ์รัตน์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์ รังสี เจริญสถาพร ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ และ กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ . 2558. วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์ผลงานวิจัย . ดิเด่นกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า .69-89.
- ศุจิรัตน์ สวงรังศิริกุล อีรุฒิ วงศ์รัตน์ สุรศักดิ์ แสนโคตร ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์. 2556. SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูงผลงานวิจัยดิเด่นกรมวิชาการเกษตร . ประจำปี2555. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า .1-15.
- ศุจิรัตน์ สวงรังศิริกุล อีรุฒิ วงศ์รัตน์ สุนี ศรีสิงห์ ปิยะดา อีระกุลพิสุทธิ . 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรม ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้าบางชนิดของประเทศไทย จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region. แกนเกษตร. 40(ฉบับพิเศษ 3): 231-240.
- Abeyasinghe, S., C. Kanatiwela-de Silva, P. D. Abeyasinghe, P. Udagama, K. Warawichanee, N. Aljafar, P. Kawicha, and M. Dickinson. 2016. Refinement of the taxonomic structure of 16SrXI and 16SrXIV phytoplasmas of gramineous plants using multilocus sequence typing. Plant Disease Journal . 100: 2001-2010
- Bastien, P., G.W. Procop, and U. Reischl. 2008. Quantitative Real-Time PCR is not more sensitive than “Conventional” PCR. Journal of Clinical Microbiology . Vol. 46, No. 6. p. 1897–1900
- Bertaccini A, B. Duduk, S. Paltrinieri, and Contaldo, N. 2014. Phytoplasmas and phytoplasma diseases: a severe threat to agriculture. American Journal of Plant Sciences. 5: 1763–1788.
- Cai, H., W. Wei, R.E. Davies, H. Chen, and Y. Zhao. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches' broom

- phytoplasma group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 1448–1457.
- Hanboonsong, Y., C. Choosai, S. Panyim, and S. Damak. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). *Insect Molecular Biology*. 11: 97–103.
- Hanboonsong, Y., W. Ritthison, C. Choosai, and P. Sirithorn. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. *Journal of Economic Entomology*. 99: 1531–1537.
- Hodgetts, J., N. Boonham, R. Mumford, N. Harrison, and M. Dickson. 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of 'Candidatus Phytoplasma'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 1826–1837.
- IRPCM .2004 . 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54(4): 1243–1255.
- Kakizawa, S., K. Oshima, Y. Ishii, A. Hoshi, K. Maejima, H.Y. Jung, Y. Yamaji, and S. Namba. 2009. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their *in planta* expression. *FEMS Microbiology Lett*; 293
- Lee I-M, K.D. Bottner-Parker, Y. Zhao, A. Bertaccini, and R.E. Davis. 2012. Differentiation and classification of phytoplasmas in the pigeon pea witches' broom group (16SrIX): an update based on multiple gene sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62: 2279–2285.
- Li, M. and D.J. Midmore. 1999. Estimating the genetic relationships of chinese water chestnut (*E. dulcis* Burm. (f) Hensch) cultivated in Australia, using RAPD. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 74(2): 224–231.
- Matsumoto T., C.S. Lee, and W.S. Teng.1968. Studies on sugarcane white leaf disease of Taiwan with special references to transmission by leafhopper, *Epitettix hiroglyphicus* Mats. *Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists* 13: 1090–1418.
- Marcone, C. 2002. Phytoplasma diseases of sugarcane. *Sugar Tech*. 4: 79–85.
- Rao, G.P., S. Mall, and C. Marcone. 2012. Recent Biotechnological Approaches in Diagnosis and Management of Sugarcane Phytoplasma Diseases. *Functional Plant Science and Biotechnology*. 6(Special issue 2): 19–29.
- Sakuanrungrasirikul, S., T. Wongwarat, S. Sankot, K. Kawabe, Y. Kobori, and S. Ando. 2013. Sugarcane white leaf and sugarcane grassy shoot diseases in Thailand and the detection methods. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists*. 28