

SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูง

SecA, a New Marker for an Improved Detection Method of Sugarcane White Leaf Phytoplasma

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล^{1/} ชีรวุฒิ วงศ์วัฒน์^{1/} สุรศักดิ์ แสนโคตร^{1/}

ทักษิณา สันสยะวิชัย^{1/} สุณี ศรีสิงห์^{2/}

Suchirat Sakuanrungrsirikul^{1/} Theerawut Wongwarat^{1/} Surasak Sakot^{1/}

Taksina Sansayawichai^{1/} Sunee Srisink^{2/}

ABSTRACT

Sugarcane white leaf disease is the important disease that causes significant loss to sugarcane production in Thailand. No effective elimination method available so far. The disease spreads among plants by leafhoppers, but the most damaging incident is caused by spreading of the infected seed canes. Healthy canes and tissue culture plantlets have been employed to control the disease. Thus, an effective detection method is essential for disease screening prior to producing healthy plantlets. A diagnostic method based on nested-PCR targeted 16S-23S intergenic spacer region (ISR) of the phytoplasma rRNA gene, is being employed widely. Despite highly sensitive, it often shows false positive from contamination and primers non-specificity that leads to misdiagnosis. Moreover, it is time consuming and costly due to the requirement of double PCRs. This is the first report to develop a detection technique specified *secA* gene of sugarcane white leaf disease. The new markers set proved to be more effective by showing highly specific, faster and better resolution. Data validation by genotyping and sequencing of the resulting 275 bp PCR product showed highly specificity to sugarcane white leaf phytoplasma. Banding intensity of the product correlated with whiteleaf symptom which implicating different phytoplasma levels. The amplification condition enables detection of target DNA at the lowest concentration of 10^{-7} ng/ μ l which is better than the 700 bp but not as sensitive as the 210 bp locus of the nested-PCR. However, a higher sensitivity of *secA* detection can be achieved by performing two PCR rounds.

^{1/} ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น 180 ถนนมิตรภาพ ตำบลศิลา อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40000

^{1/} Khon Kaen Field Crops Research Center, 180 Mitraphap Rd., Sila, Muang, Khon Kaen. 40000.

^{2/} ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี ตำบลจรสามพัน อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี

^{2/} Supanburi Agricultural Research and Development Center, Jaraka Samphan, U-thong, Supanburi. 72160.

The *secA* sequences provide better resolution than ISR's by exhibiting 3-31 base mutations among 3 symptoms: whiteleaf, grassy shoot and green grassy shoot, while only 1-4 base mutations revealed from ISR. *SecA* sequences of sugarcane white leaf and green grassy shoot phytoplasmas were first reported as the result of this finding.

Key words: sugarcane whiteleaf disease, phytoplasma, *secA*, nested-PCR

บทคัดย่อ

โรคใบขาวของอ้อยเป็นปัญหาสำคัญมากในการปลูกอ้อย เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาและยังไม่มีวิธีการกำจัดเชื้อได้อย่างได้ผล แม้แมลงจะเป็นพาหะในการถ่ายเชื้อ แต่การแพร่กระจายอย่างรวดเร็วเกิดจากการใช้ท่อนพันธุ์ติดเชื้อ การใช้ท่อนพันธุ์สะอาดหรือต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นส่วนหนึ่งของการจัดการโรคนี้นี้ที่ได้ผลดี ดังนั้นวิธีการตรวจโรคที่ดีจึงเป็นขั้นตอนสำคัญในการคัดพันธุ์สะอาดหรือปลอดเชื้อเพื่อขยายพันธุ์ การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาโดยทั่วไปใช้เทคนิค nested PCR ที่ตรวจเชื้อในตำแหน่ง 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) นับเป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่ต้องใช้เวลาและค่าใช้จ่ายมากเพราะใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์สองครั้ง และมักมีปัญหาผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนและความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ ทำให้แปลผลยาก รายงานนี้เป็นรายงานแรกที่มีการนำ *secA* gene มาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่มีความจำเพาะกับโรคใบขาวในอ้อย สำหรับตรวจคัดกรองโรค มีประสิทธิภาพดีกว่าวิธีการเดิมที่ใช้อยู่ ใช้เวลาตรวจเร็วกว่า และให้ข้อมูลได้มากกว่า โดยพัฒนาไพรเมอร์ให้จำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยเท่านั้น ขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ประมาณ 275 bp ใช้สภาวะในการตรวจชนิด direct-PCR จึงลดปัญหาผลบวกปลอม ความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้ระบุระดับปริมาณเชื้ออย่างคร่าวๆ ได้ การตรวจพิสูจน์ความถูกต้องของวิธีการด้วย genotyping และลำดับเบส พบว่าวิธีการนี้มีความจำเพาะสูงกว่าวิธี nested-PCR โดยไม่ตรวจจับเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชอื่นรวมทั้งแบคทีเรีย มีความไวในการตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายดีกว่าตำแหน่ง 700 bp ของวิธี nested-PCR โดยได้ประมาณ 10^7 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แต่น้อยกว่าตำแหน่ง 200 bp มีความสามารถในการจำแนกความแตกต่างระหว่างเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว ใบขาวกอฟอย และกอตะไคร้ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสได้สูงกว่า โดยพบเบสที่แตกต่างกันตั้งแต่ 3-31 เบส ซึ่งตำแหน่ง ISR มีความแตกต่างกันเพียง 1-4 เบสเท่านั้น แม้จะมีความไวต่ำกว่าวิธี nested-PCR เล็กน้อย แต่สามารถเพิ่มความไวให้สูงขึ้นได้ด้วยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สองครั้ง วิธีใหม่นี้เหมาะสำหรับการนำไปใช้ตรวจพิสูจน์โรคใบขาวของอ้อย และการจำแนกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดนี้ ผลจากการพัฒนานี้ทำให้สามารถตรวจพบลำดับเบส *secA* gene ของเชื้อใบขาว และกอตะไคร้ได้เป็นครั้งแรก

คำหลัก: อ้อยใบขาว, ไฟโตพลาสมา

คำนำ

อ้อยเป็นพืชสำคัญอันดับต้นๆ ของไทย มีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นทุกปี จากการสำรวจของสำนักคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลพบว่าในปีการผลิต 2554/55 มีพื้นที่ปลูกอ้อยรวมประมาณ 9 ล้านไร่ ส่วนใหญ่อยู่ในภาคอีสานและภาคกลาง มีการขยายพื้นที่ปลูกเพิ่มขึ้นจากปีก่อนเฉลี่ยประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (กลุ่มงานสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล, 2555) ผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของอ้อยขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทั้งความอุดมสมบูรณ์ของดินและน้ำ รวมทั้งปัญหาด้านโรคและแมลงศัตรู โรคใบขวานับเป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างมากต่อการปลูกอ้อยเป็นเวลานานมาแล้ว โดยเฉพาะในภาคอีสาน มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรงเป็นช่วงๆ ในหลายพื้นที่ สาเหตุใหญ่เกิดจากขาดความต่อเนื่องและการบูรณาการในการแก้ปัญหาอย่างจริงจัง และที่สำคัญขาดความรู้และความเข้าใจโรคและเชื้อนี้อีกด้วย

โรคใบขาวของอ้อยเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งเป็นแบคทีเรียขนาดเล็ก ในกลุ่มแกรมบวก ไม่มีผนังเซลล์ มีจีโนมขนาดเล็กที่มีปริมาณ AT สูง (ประมาณ 70-80%; Oshima *et al.*, 2004) ถูกจัดอยู่ในชั้นมอลลิควิตส (Class Mollicutes) ภายในวงศ์ไมโคพลาสมา (Family Mycoplasmataceae) ชนิด *Candidatus phytoplasma* กลุ่ม 16SrXI : Rice yellow dwarf group (Zhao, *et al.*, 2010) เชื้อนี้อาศัยอยู่ในเซลล์ที่อาหารของพืช ถ่ายทอดได้ด้วยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (Weintraub and Beanland, 2006; Hanboonsong *et al.*, 2005) เนื่องจากเชื้อนี้ไม่สามารถเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ได้ ทำให้การศึกษาทำได้จำกัด หลายชนิดยังไม่มียาระเหยและไม่สามารถจัดกลุ่มได้ เชื้อนี้มีขบวนการเมตาบอลิซึมที่ทำได้เองเพียงเล็กน้อย เกือบทั้งหมดใช้ขบวนการจากเจ้าบ้านที่มันอาศัยอยู่ เชื้อสามารถเข้าทำลายขบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ของเจ้าบ้านด้วยวิธีการที่ซับซ้อน เช่น ใช้โปรตีนเกาะผนังเซลล์ (membrane bound protein) และโปรตีนคัดหลั่ง (secreted protein) ที่เป็นโปรตีนชักนำให้เกิดโรค (virulence protein) (Sugio *et al.*, 2011) ในอ้อยเชื้อสามารถเข้าทำลายต้นได้ทุกช่วงอายุ อาการเด่นชัดเมื่ออ้อยถูกเข้าทำลาย ได้แก่ ข้อสั้น ใบแคบลง มีการแตกกอมาก ใบมีสีขาหรือขาวสลับเขียว บางครั้งจะพบหน่อใหม่เป็นสีขาว จากนั้นเริ่มแห้งและตายในที่สุด ทำให้ผลผลิตลดลง ไร่ต่อได้น้อยหรือไม่ได้เลย แม้เชื้อจะถ่ายทอดจากต้นสู่ต้นโดยแมลง แต่การแพร่กระจายที่รวดเร็วเกิดจากการใช้ท่อนพันธุ์ติดเชื้อ ในพื้นที่ดินทรายเช่นในภาคอีสาน มักพบการระบาดรุนแรง การใช้ท่อนพันธุ์ที่แข็งแรงร่วมกับการปรับปรุงดินและการให้น้ำอย่างเพียงพอพบว่าช่วยลดความเสียหายจากโรคใบขาวได้ (กอบเกียรติ และคณะ, 2554) ดังนั้นจึงมีคำแนะนำให้มีการสร้างแปลงแม่พันธุ์สะอาด เพื่อผลิตท่อนพันธุ์ที่แข็งแรงสำหรับนำไปขยายต่อ แต่ดินที่มีอาการแฉะจะไม่มีอาการใบขาว และอาการใบขาวอาจจะสับสนกับการขาดธาตุบางชนิด แยกความแตกต่างยาก จึงมีการผลิตชุดตรวจสอบขึ้นเพื่อใช้คัดกรองโรคในแปลงแม่พันธุ์ แต่ไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากเกิดผลลบปลอมเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสาเหตุหลักเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยมีหลายไอโซเลต (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2555ก; Sakuanrungsirikul *et al.*, 2012) และแอนติบอดีที่ได้ไม่ได้สร้างขึ้นจากโปรตีนที่เป็นบริเวณอนุรักษ์

(conserved region) (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2552) อีกทั้งเทคนิคที่ใช้ไม่สามารถตรวจจับเชื้อในปริมาณต่ำได้ (Viswanathan *et al.*, 2011) ปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่มีความไวและแม่นยำสำหรับใช้ตรวจเชืื่อนี้ได้ในภาคสนาม

การตรวจโรคใบขาวในอ้อยนิยมใช้วิธี nested-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูง โดยใช้ชุดไพรเมอร์สำหรับตรวจจับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR) (Srivastava *et al.*, 2006, Hanboonsong *et al.*, 2005) แต่จากประสบการณ์การใช้เทคนิคนี้พบว่าเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ซึ่งเกิดจากความไม่จำเพาะของไพรเมอร์และการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์สองชุด ทำให้ต้องมีการตรวจสอบซ้ำหลายครั้ง อีกทั้งยังมักเกิดผลบวกปลอมจากความไม่จำเพาะของชุดไพรเมอร์และตำแหน่งที่ตรวจสอบ โดยพบว่าตรวจจับไฟโตพลาสมาชนิดอื่นในพืชอื่น รวมทั้งแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ภายในต้นได้อีกด้วย เช่น *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.* และ *Bacteriodes spp.* (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2555; Harrison *et al.*, 2002) ทำให้สับสน แปลผลยาก การจัดกลุ่มเชื้อโดยใช้ความแตกต่างลำดับเบสของยีนดังกล่าวพบว่ามี ความจำกัด เพราะเป็นบริเวณแปรปรวนต่ำ อีกทั้งยังมีจำนวน 2 ชุดภายในจีโนม ซึ่งบางกลุ่มพบว่าเป็น heterozygous อีก ทำให้มีปัญหาในการจัดกลุ่มและวิเคราะห์ความเสถียรของการแบ่งกลุ่ม (De La Rue *et al.*, 2001) จากปัญหาดังกล่าว จึงทำให้มีการใช้ยีนอื่นเพิ่มเติมเพื่อให้ได้วิธีที่ดียิ่งขึ้นและเชื่อถือได้ ในระยะเวลาที่ผ่านมาได้มีการนำ *secA* gene ซึ่งเป็นยีนสำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย (Tjalma *et al.*, 2000) มาใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อไฟโตพลาสมา (Hodgetts *et al.*, 2008) *secA* เป็น membrane protein หนึ่งที่ทำหน้าที่ส่งถ่าย preprotein-secB complex ให้กับ secYEG membrane-embedded translocon เพื่อขับ โปรตีนออกสู่ด้านนอกเซลล์ และถูกควบคุมด้วย secM signal peptide (Lycklama, *et al.*, 2012) การศึกษา *secA* gene ในเชื้ออื่นเริ่มจากการใช้ลำดับเบสจากโครงการวิจัยจีโนมของ Onion yellow phytoplasma (OY) ซึ่งมีความยาว 2505 bp สามารถแปลเป็นสายเปปไทด์ความยาว 835 หน่วยกรดอะมิโน (Kakizawa *et al.*, 2001) มีการโคลนยีนนี้และสร้างโปรตีนสำหรับผลิตแอนติบอดีเพื่อตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาบางชนิด เช่น apple proliferation, onion yellow เป็นต้น (Wei *et al.*, 2004) ต่อมา Hodgetts *et al.* (2008) ได้นำลำดับเบส OY *secA* gene จัดเรียงกับ AY witches'-broom ร่วมกับตำแหน่งยีนที่สัมพันธ์กันใน coconut lethal yellowing phytoplasma ที่อยู่ในกลุ่ม 16SrIV และสร้างชุดไพรเมอร์เพื่อให้สามารถตรวจไฟโตพลาสมาครอบคลุมกลุ่มต่างๆ ได้ แต่ไม่สำเร็จ เพราะมีข้อมูลลำดับเบสที่จำกัด แต่จากงานวิจัยของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ได้มีการสำรวจและรวบรวมเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยและหญ้าบางชนิด จากหลายแหล่งทั่วประเทศ ทำให้มีฐานข้อมูลเชื้อโรคใบขาวโดยเฉพาะในอ้อยที่กว้างมาก จึงมีศักยภาพที่จะนำมาพัฒนาวิธีการตรวจนี้ได้ ซึ่งจะทำได้เครื่องหมายโมเลกุลสำหรับตรวจและจำแนกชนิดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยที่มีความจำเพาะเจาะจง ที่จะทำได้ข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำ และเชื่อถือได้ มากกว่าการตรวจด้วยตำแหน่ง ISR ที่ใช้ในปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ศึกษา : อ้อยที่เป็นโรคใบขาว ได้แก่ อาการใบขาว อาการใบขาวร่วมกับกอฟลอย อาการกอตะไคร้ จากแหล่งปลูกต่างๆ และหน่อที่มีอาการใบขาว จำนวน 90 ตัวอย่าง ตัวอย่างสุ่มสำรวจจากแปลงเกษตรกรในภาคอีสานและตะวันตกจำนวน 300 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 20 ตัวอย่าง เก็บรักษาตัวอย่างใบ ตามวิธีของ Wongwarat *et al.* (2011)

การสกัดดีเอ็นเอ : สกัดดีเอ็นเอจากใบโดยวิธี Li and Midmore (1999) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะการโรสเจลความเข้มข้น 1% ใน 0.5X TBE ย้อมผลด้วยสาร SYBR gold (invitrogen, USA) ใช้กระแสไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ ประมาณ 40 นาที ตรวจสอบผลแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต บันทึกผลโดยการถ่ายภาพด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอ

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาตำแหน่ง 16S-23S ISR ด้วย nested-PCR : ทำตามวิธีของ ศุภรัตน์ และคณะ (2555ก) ใช้ไพรเมอร์ (MLO-X/ MLO-Y และ P1/P2) ตามรายงานของ Hanboonsong *et al.* (2005)

การออกแบบไพรเมอร์ secA gene : ใช้ลำดับเบสจากฐานข้อมูล NCBI ซึ่งมีเพียงรายงานของเชื้อ Sugarcane grassy shoot (accession AM261835.1, AM261834.1, DQ459440) เทียบกับลำดับเบสของชิ้นส่วน secA gene ของอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 ที่เป็นโรคใบขาว และหน่อที่มีอาการใบขาว ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณตามวิธีของ Hodgetts *et al.* (2008) ทำการจัดเรียงโดยใช้ Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) ออกแบบไพรเมอร์ในบริเวณอนุรักษ์ที่แสดงความแตกต่างกันระหว่างหน่อกับอ้อย ตรวจสอบคุณภาพไพรเมอร์ที่ได้ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป “Oligo Calc” ได้ลำดับเบสของไพรเมอร์ ดังนี้ secA forward : 5’GTT TTA TAT GGA TGC TAA TCG TTT T 3’ ; secA reverse : 5’ CTA YTG TTC TTC CTG TAA ATT GAT C โดย Y คือ C หรือ T

การตรวจเชื้อด้วยไพรเมอร์ secA : เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่อง Thermocycler (Geneamp 9700, Perkin Elmer, USA) ปฏิกริยาพีซีอาร์ประกอบด้วย 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA), 3 µl DNA template (100 ng/µl) และ 0.5 µM forward และ reverse primers ในปริมาตรรวม 15 µl มีโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดังนี้ 94 °C / 2 นาที ตามด้วย 25 รอบของ 94 °C / 30 วินาที, 60 °C / 30 วินาที และ 72 °C / 45 วินาที ตามด้วย 72 °C / 10 นาที และเก็บรักษาที่ 25 °C ตรวจสอบผลด้วยการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าดังอธิบายข้างต้น

การศึกษาลำดับเบส : เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์ สกัดชิ้นดีเอ็นเอจากเจลโดยใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูป (RBC Bioscience, Taiwan) ส่งวิเคราะห์ลำดับเบส (Firstbase, Malaysia) เทียบผลกับฐานข้อมูลใน NCBI จัดเรียงข้อมูลด้วยโปรแกรม Clustal W

การศึกษา Genotyping : ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LightCycler 480 (Roche, Germany) โดยตรวจตำแหน่ง 210 bp ของ 16S-23S ISR ปฏิกริยาประกอบด้วย 0.25 μ M P1/ P2 (Hanboonsong *et al.*, 2005), 1x SYBR Green I master (LightCycler 480, Roche, Germany), 25 ng/ μ l DNA template (5 μ l) ปริมาตรรวม 20 μ l ทำการเพิ่มปริมาณดังนี้ 95°C/ 10 นาที, ตามด้วย 95°C / 20 วินาที, 62°C / 20 วินาที, 72°C / 30 วินาที จำนวน 45 รอบ วิเคราะห์ melting curve ประกอบด้วย 95°C / 5วินาที, 68°C / 10 วินาที, 77°C / 10 วินาที, cooling 40°C / 30 วินาที

ผลการทดลองและวิจารณ์

ขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายและความแม่นยำของไพรเมอร์ : ในการพัฒนาวิธีการ เบื้องต้นใช้ชุดไพรเมอร์ *secA* gene ตามรายงานของ Hodgetts *et al.* (2008) ซึ่งใช้วิธี semi-nested-PCR และไพรเมอร์เป็น degenerate base ในหลายตำแหน่ง ที่รายงานว่าเป็น universal primer สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาได้หลายชนิด แต่เมื่อทดสอบกับตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาว พบว่าไม่ประสบความสำเร็จ ตรวจได้เพียงบางตัวอย่างเท่านั้นและไม่สามารถทำซ้ำเดิมได้ แม้ทำการปรับเปลี่ยนสภาวะในการตรวจใหม่ รวมทั้งเกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบ ดังนั้นจึงคัดเลือกและสกัดชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏชัดเจนในตัวอย่างที่เกิดแถบได้ นำไปศึกษาลำดับเบส และเปรียบเทียบกับข้อมูลอื่นในฐานข้อมูลสากลซึ่งมีเพียงรายงานอาการใบขาวกอฝอย (sugarcane grassy shoot) ในอ้อยเท่านั้น ไพรเมอร์ที่ได้เกิดจากการเลือกบริเวณอนุรักษ์ใน *secA* gene ที่จำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยเท่านั้นเพื่อขจัดปัญหาความสับสนจากเชื้ออื่นที่อาจไม่ใช่เชื้อก่อโรคในอ้อย จากการตรวจในตัวอย่างอ้อยใบขาว พบว่าดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 275 bp (Fig.1) และสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอนี้ได้ทุกตัวอย่างที่มาจากแหล่งปลูกต่างๆ แสดงถึงความแม่นยำของไพรเมอร์ที่สามารถตรวจได้ทุกไอโซเลตที่รวบรวมได้ จากการสำรวจอ้อยที่เป็นโรคใบขาวในแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศ พบอาการหลัก 3 อาการ ได้แก่ อาการใบขาว (white leaf) ใบขาวร่วมกับกอฝอย (grassy shoot) และกอตะไคร้ (green grassy shoot) ซึ่งไม่มีใบขาวแต่มีแตกกอฝอยคล้ายกอตะไคร้ (อัปสร และคณะ, 2540) สำหรับอาการใบขาว และใบขาวร่วมกับกอฝอย ส่วนใหญ่พบได้ในภาคอีสานและภาคกลาง ส่วนอาการกอตะไคร้ มักพบได้ที่ภาคกลางตอนบนต่อกับภาคเหนือตอนล่าง (สุจิรัตน์ และคณะ 2555ก)

ปัญหาของการใช้ 16S-23S ISR: แม้ชุดไพรเมอร์ MLO-X/MLO-Y และ P1/P2 ที่ใช้ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในตำแหน่ง 16S-23S ISR จะถูกระบุว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อย (ชานันธุ์ และคณะ, 2555) แต่จากการทดลองพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอได้กับตัวอย่างพืชอื่นที่ทดลองนำมาตรวจสอบหลายชนิดทั้งมีและไม่มีอาการโรค เช่น มันสำปะหลัง กกล้วย หนุ่ย เฝื่อน มะขาม แพงพวย ซึ่งส่วนใหญ่ให้ขนาดดีเอ็นเอใกล้เคียงกับที่พบในอ้อย ทำให้เกิดข้อสงสัยถึงความถูกต้องของผลที่ได้ และความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ (Fig. 2a) การเพิ่มอุณหภูมิช่วง annealing ให้สูงขึ้นแม้จะทำให้วิธีการมีความจำเพาะมากขึ้น แต่พบว่าเกิดผลลบปลอม ทำให้ตัวอย่างที่ตรวจไม่พบ

เชื้อด้วยวิธีดังกล่าวแสดงอาการใบขาวให้เห็นในภายหลัง ทั้งในโรงเรือนและแปลงปลูก ส่งผลกระทบต่องานทดลองและเกษตรกรที่นำอ้อยเหล่านี้ไปปลูกขยาย การตรวจตัวอย่างที่มีการติดเชื้อซ้ำซ้อนหลายชนิด พบแถบดีเอ็นเอหลายแถบ ทำให้เกิดความสับสน และแปลผลยาก (Fig. 2b,c)

การตรวจพิสูจน์ความจำเพาะของไพรเมอร์ *secA*: การทดสอบไพรเมอร์และวิธีการที่ใช้ตรวจ *secA* gene พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยสูง จากการตรวจพิสูจน์ในตัวอย่างอ้อยที่สำรวจจากแปลงเกษตรกรที่พบว่าติดเชื้อโรคราสนิมร่วมด้วย เมื่อตรวจด้วยชุดไพรเมอร์สำหรับ 16S-23S ISR พบเกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนหลายแถบ (Fig. 2b) แต่เมื่อตรวจพิสูจน์ด้วย *secA* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 275 bp ในบางตัวอย่างเท่านั้น (ไม่ได้แสดงผล) เช่นเดียวกันกับผลการตรวจตัวอย่างอ้อยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นร่วมด้วย พบดีเอ็นเอเกิดขึ้นจำนวนหลายแถบนอกเหนือจากตำแหน่ง 700 bp และ 210 bp ทำให้ไม่สามารถรายงานได้ว่าการติดเชื้อไฟโตพลาสมาหรือไม่ หรือเป็นเชื้ออื่นที่อยู่ภายในพืชเอง เมื่อตรวจพิสูจน์ด้วยชุดไพรเมอร์ *secA* พบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียว (#49) เท่านั้นที่เกิดแถบได้ (Fig. 2c, d) ผลการวิเคราะห์ genotype ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 210 bp ในตำแหน่ง 16S-23S ISR ที่มีการรายงานว่าจำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวนั้น สอดคล้องกับผลการตรวจด้วยไพรเมอร์ *secA* โดยพบว่ามีการตรวจพบจากแปลงที่ติดโรคราสนิม และตัวอย่างหมายเลข 49 จากเนื้อเยื่อเท่านั้นที่แสดงค่า melting curve ตรงกับ positive control ที่เป็นเชื้อใบขาวของอ้อย (Fig. 3a, b)

ความจำเพาะของไพรเมอร์ชุด *secA* เทียบกับ ชุดไพรเมอร์ MLO-X / MLO-Y และ P1/P2 โดยการตรวจเชื้อใบขาวในอ้อยและหญ้า 2 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ชุดหลังสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอย่างทั้งอ้อยและหญ้าได้ ในขณะที่ *secA* เกิดแถบดีเอ็นเอเฉพาะในอ้อยเท่านั้น (Fig. 4a, b) เมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจหญ้าพบว่ามีลำดับเบสตรงกับ Golden beard grass white leaf phytoplasma (AB642601.1) และ Malaysia Bermuda grass white leaf phytoplasma (EU294011.1) ในฐานข้อมูลของ NCBI ส่วนชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจได้จากอ้อย พบว่าตรงกับ Sugarcane white leaf phytoplasma (AB646271.1 และ HQ917068.1)) ข้อมูลที่ได้นี้จึงยืนยันถึงความถูกต้องและความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ *secA* ที่สร้างขึ้นต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย

ข้อมูลเชิงปริมาณและความไวในการตรวจดีเอ็นเอเป้าหมาย : จากการสังเกตพบว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการตรวจด้วย *secA* แปรเปลี่ยนตามความรุนแรงของอาการใบขาว ซึ่งจากการศึกษาของ สุจิรัตน์ และคณะ (2554) พบว่าปริมาณเชื้อในกลุ่มตัวอย่างที่มีอาการใบขาว ใบขาวเขียว และใบเขียว มีมากไปน้อยตามลำดับ และแถบดีเอ็นเอที่ได้มีความเข้มแสงจากมากไปน้อยเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอขนาด 700 bp ที่ได้จากการตรวจด้วย 16S-23S ISR ที่สามารถใช้ในการประเมินปริมาณเชื้อได้ (สุจิรัตน์ และคณะ, 2554) ร่วมกับแถบของ *secA* พบว่ามีแนวโน้มไปในทางเดียวกัน และสามารถเกิดแถบดีเอ็นเอในกลุ่มใบเขียวซึ่งเป็นกลุ่มที่มีเชื้อ

น้อยได้ (Fig. 4) เช่นเดียวกับการใช้ nested-PCR ตรวจที่ตำแหน่ง 16S-23S ISR แต่ในกรณีปริมาณเชื้อต่ำมาก *secA* จะไม่สามารถตรวจได้ ต้องใช้การทำพีซีอาร์สองครั้ง

การทดสอบความไว (sensitivity) โดยการเจือจางผลผลิตพีซีอาร์เป้าหมาย พบว่าสามารถตรวจปริมาณ *secA* ได้ต่ำสุดประมาณ 10^{-7} ng/ μ l ซึ่งต่ำกว่าตำแหน่ง 700 bp ของวิธี nested-PCR ที่ตรวจได้ต่ำสุดประมาณ 10^{-3} ng/ μ l ในขณะที่ตำแหน่ง 210 bp ที่เกิดจากการนำผลผลิตจากพีซีอาร์ชุดที่หนึ่งมาใช้ในชุดที่สองในการทำ nested-PCR นั้นพบว่าสามารถตรวจได้ต่ำถึงระดับ 10^{-10} ng/ μ l (Fig.5) การศึกษาเบื้องต้นเพื่อคาดคะเนจำนวนเซลล์ไฟโตพลาสมาด้วย 700 bp โดยใช้พลาสมิดที่มีชิ้นยีนเป้าหมาย (ตำแหน่ง 700 bp ของ ISR) ที่ทราบความเข้มข้นเป็นตัวเปรียบเทียบในปฏิกิริยา สามารถคาดคะเนได้ว่ามีเชื้ออยู่ประมาณ 500 cells/ μ l ดังนั้น *secA* สามารถตรวจได้จำนวนต่ำกว่านี้อีกเล็กน้อย ทั้งนี้จากการทดลองวิเคราะห์เพิ่มเติมด้วย Realtime PCR และใช้พลาสมิดที่มีชิ้น ISR ดังกล่าวเป็นตัวตรวจสอบ ร่วมกับการวิเคราะห์ตัวควบคุม (18S rRNA gene) เพื่อศึกษาถึงจำนวนเชื้อในกลุ่มตัวอย่างอาการต่างๆ ที่อยู่ในดีเอ็นเอพืชในปริมาณที่เท่ากันพบว่าตัวอย่างกลุ่มใบเขียวมีเชื้อไฟโตพลาสมาประมาณ 10-100 เซลล์ในดีเอ็นเอพืชปริมาณ 1 นาโนกรัม กลุ่มใบขาวเขียว มีประมาณ 1,000-10,000 เซลล์ และในกลุ่มใบขาวมีประมาณมากกว่า 100,000 เซลล์ แต่ในขณะนี้ยังไม่สามารถระบุช่วงรอยต่อที่ชัดเจนได้เนื่องจากอยู่ระหว่างดำเนินการ เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ได้จากการตรวจสอบปริมาณต่ำสุดทำให้คาดคะเนได้ว่าวิธี *secA* นี้ น่าจะตรวจเชื้อได้ปริมาณต่ำสุดในช่วงปริมาณ 100-1000 เซลล์ต่อดีเอ็นเอพืช 1 นาโนกรัม หากใช้การตรวจด้วยเครื่องพีซีอาร์ทั่วไป

ความละเอียดของข้อมูลลำดับเบส

จากรายงานของ ศุภิรัตน์ และคณะ (2555ก) ที่ใช้ลำดับเบสตำแหน่ง 16S-23S ISR จำแนกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พบว่าโรคใบขาวทั้งสามอาการดังกล่าวเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ต่างกัน โดยกลุ่มอาการใบขาวมีลำดับเบสตรงกับ SCWL phytoplasma (HQ917068.1) ในฐานข้อมูล NCBI กลุ่มอาการใบขาวร่วมกับกอฟอยตรงกับ SCGS phytoplasma (AB243298.1) ส่วนกลุ่มอาการกอตะไคร้เป็นชนิดใหม่ยังไม่มีรายงาน และคณะวิจัยนี้ได้รายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองตำแหน่งนี้ไปยัง NCBI (JX987239.1 และ JX987242.1) โดยใช้ชื่อว่า sugarcane green grassy shoot (SCGGS) phytoplasma ตาม อัปสร และคณะ (2540) ซึ่งได้รายงานอาการดังกล่าวไว้ การเปรียบเทียบจำนวนความแตกต่างของลำดับเบสของไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิดนี้ รวมทั้งไอโซเลต SCWL ที่มีความแปรปรวน (KAL001-2) ด้วยตำแหน่ง 16S-23S ISR พบความแปรปรวนเพียง 4 จุดเท่านั้นจากสายดีเอ็นเอความยาว 209-212 bp ระหว่าง SCWL และ SCGS พบการขาดหายไปของเบส (deletion) ส่วน SCGGS ไม่พบ deletion แต่มีการแทนที่เบสชนิด Transversion (A/T) (Table 1) แต่ลำดับเบสของ *secA* ในตัวอย่างดังกล่าวพบว่ามีความแปรปรวนสูงถึง 31 จุดจากความยาวสาย 275 bp ซึ่งทั้ง 31 จุดนี้ทำให้ SCGGS แตกต่างจาก SCWL และ SCGS โดยเป็นการแทนที่เบสชนิด Transition (G/A, C/T) จำนวน 24 จุด และชนิด Transversion (C/A, T/A) จำนวน 7 จุด ส่วนความแตกต่างระหว่าง SCWL

และ SCGS มีความแตกต่างกันทั้งสิ้น 3 จุด เป็นชนิด Transition ทั้งสิ้น ในธรรมชาติการแทนที่เบสชนิด Transition พบได้ดีกว่าชนิด Transversion ความแตกต่างเหล่านี้อาจมีส่วนสัมพันธ์กับยีนที่ควบคุม Effector protein ของไฟโตพลาสมา (Sugio, *et al.*, 2011) และความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อทั้ง 3 ชนิดนี้ ผลจากการศึกษาลำดับเบสดังกล่าวนี้จึงแสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง *secA* gene สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการจัดจำแนกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยได้ละเอียดยิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีตรวจโรคใบขาวของอ้อยวิธีใหม่ในตำแหน่ง *secA* gene พบว่าได้ไพรเมอร์ชุดใหม่ที่ได้ขึ้นยีนขนาด 275 bp ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยโดยไม่จับกับไฟโตพลาสมาในพืชอื่นหรือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น การวิเคราะห์ขึ้นยีนที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค genotyping พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน และการตรวจข้อมูลลำดับเบสของขึ้นยีนนี้ที่ได้เทียบกับลำดับเบสในฐานข้อมูลสากลพบว่าถูกต้อง วิธีการใหม่นี้ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์ประมาณ 1 ชั่วโมงครึ่ง ทำให้สามารถรู้ผลการตรวจได้ภายใน 2-3 ชั่วโมง และไม่มีปัญหาปนเปื้อนในปฏิกิริยาควบคุม ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการตรวจโรคใบขาวในอ้อยได้อย่างแม่นยำ ถูกต้อง และรวดเร็ว เมื่อเทียบกับวิธีการเดิมที่ตรวจเชื้อที่ตำแหน่ง 16S-23S ISR ที่พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอได้กับเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่อยู่ภายในพืชได้ ซึ่งอาจไม่ใช่เชื้อก่อโรค ไม่จำเพาะกับชนิดพืช และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รวมประมาณ 6-7 ชั่วโมง ใช้เวลารวมในการรายงานผลทั้งสิ้นประมาณ 1-2 วัน หากไม่มีปัญหาเรื่องผลลบปลอมในหลอดควบคุมซึ่งมักเกิดขึ้นได้บ่อยครั้ง อย่างไรก็ตามความไวของวิธีการใหม่ที่ได้นี้ต่ำกว่าวิธีเดิมที่ใช้เทคนิค nested-PCR เล็กน้อยซึ่งสามารถเพิ่มความไวได้ด้วยการใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์สองครั้ง หรือใช้การตรวจด้วย Realtime PCR

การนำไปใช้ประโยชน์

1. ใช้ในการตรวจเชื้อเพื่อการขยายพันธุ์และการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

(1.1) ใช้ตรวจเชื้อโรคใบขาวของอ้อยในตัวอย่างอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อขยายพันธุ์อ้อยปลอดโรค (1.2) ใช้ตรวจประเมินการติดเชื้อในแปลงทดสอบ ผลการกำจัดเชื้อในท่อนพันธุ์อ้อยด้วยวิธีต่างๆ และการฟื้นฟูต้นอ้อยติดเชื้อด้วยธาตุอาหารชนิดต่างๆ (1.3) ใช้ประเมินปริมาณเชื้อสำหรับคัดเลือกแปลงแม่พันธุ์สะอาดในการขยายพันธุ์อ้อย (1.4) ใช้ตรวจพิสูจน์ยืนยันผลในตัวอย่างที่มีการติดเชื้อซ้ำซ้อน

ในระหว่างเดือน มีนาคม 2555-กุมภาพันธ์ 2556 มีการส่งตัวอย่างอ้อยเพื่อตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาตามจุดประสงค์ดังกล่าวจำนวน 1197 ตัวอย่าง โดยมีการหน่วยงานที่นำผลการตรวจไปขยายผลต่อจำนวน 15 หน่วยงาน ในระหว่าง มีนาคม-กันยายน ปี 2556 มีการติดต่อขอตรวจเชื้ออีกประมาณ 860 ตัวอย่าง จาก 16 หน่วยงาน

- ใช้ในการจำแนกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวจากแหล่งต่างๆ ด้วยลำดับเบส โดยตรวจแล้วจำนวน 90 ตัวอย่างจาก 220 ตัวอย่าง เพื่อการพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อวิธีใหม่ด้วยการพัฒนาชุดไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไอโซเลตต่างๆ
- มีการเผยแพร่ผลงานในงานประชุมของสถาบันวิจัยพืชไร่ในปี 2555 งานประชุม The International Conference on Tropical and Sub-tropical Plant Diseases 2012 ที่จังหวัดเชียงใหม่ในปี 2555 และงานประชุมแสดงผลงานวิจัยร่วมระหว่างศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และ JIRCAS ในปี 2555 ผลงานได้รับการตอบรับให้นำเสนอในงานประชุม ISSCT Congress ที่ประเทศบราซิลปี 2556
- ได้เผยแพร่ลำดับเบสของ secA ของไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยในประเทศไทยในฐานข้อมูลสากล (NCBI) สำหรับการอ้างอิงในระดับนานาชาติ ได้แก่ JX987247.1; JX987245.1; JX987243.1; JX987241.1; JX987244.1; JX987248.1; X987246.1 ; JX987242.1; JX987240.1

คำขอขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่โรงงานน้ำตาลไทยเอกสิทธิ์ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างอ้อยเพื่อการศึกษา และนำสำรวจตัวอย่างที่เป็นโรคในเขตที่โรงงานรับผิดชอบ ขอขอบคุณคุณรังมี เจริญสถาพร และคณะที่สำรวจตัวอย่างอ้อยจากแปลงเกษตรกร และนำมาให้ตรวจวิเคราะห์รวมทั้งให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ และขอขอบคุณ ดร.กษิณิษ คิชฐบรรจง ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการตรวจวิเคราะห์และศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มงานสารสนเทศอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาล. 2555. สำนักนโยบายอุตสาหกรรมการอ้อยและน้ำตาล สำนักคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาล รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2554/55. แหล่งที่มา <http://www.ocsb.go.th/upload/journal/fileupload/923-3963.pdf>
- กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ สุภกาญจน์ ล้วนมณี สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และเกษม ชูสอน. 2554. ปัจจัยทางการเกษตรที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวของอ้อย. หน้า 63-68. ใน: เอกสารประกอบการประชุมเสวนาวิชาการอ้อย “วิกฤติและโอกาสอ้อยไทยในเวทีโลก” 30-31 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร.
- ชนาณัฐ แก้วมณี ยุพา หาญบุญทรง และ ทศนีย์ แจ่มจรรยา. 2555. ผลของอุณหภูมิต่อแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* นำโรคใบขาวอ้อย. ว. เกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3: 274-280.
- สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ชัชชัย ตะยาภิวัฒนา วันเพ็ญ ศรีทองชัย ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุณี ศรีสิงห์ และ มัทนา วานิชย์. 2552. การโคลนนิ่งโมโนโคลนลินี้นส์จากบีเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อพัฒนาชุดตรวจสอบโรคใบขาวในอ้อย. รายงานผลงานวิจัยปี 2552 ฉบับที่ 1 ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร หน้า 349-360.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ชีรวุฒิ วงศ์วรรณ์ ปิยะดา ชีรกุลพิสุทธิ ทักษิณา ศันสยะวิชัย สุณี ศรีสิงห์ นิลุลล ทวีกุล นฤทัย วรสถิตย์ และรังสี เจริญสถาพร. 2554. วิธีประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. หน้า 74-80. ใน: เอกสารประกอบการประชุมเสวนาวิชาการอ้อย “วิกฤติและโอกาสอ้อยไทยในเวทีโลก” 30-31 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ชีรวุฒิ วงศ์วรรณ์ สุณี ศรีสิงห์ และ ปิยะดา ชีรกุล พิสุทธิ. 2555ก. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้าบางชนิดของประเทศไทย จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region. ว. เกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3: 231-240.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ชีรวุฒิ วงศ์วรรณ์ ทักษิณา ศันสยะวิชัย วีระพล พลภักดี และ สุณี ศรีสิงห์. 2555 ข. การตรวจสอบแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคในอ้อยในแหล่งระบาดต่าง ๆ ด้วย Membrane protein translocation system genes (Sec protein genes) และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ระบุความแตกต่างของ sec gene ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ. ยังไม่ตีพิมพ์. อัปสร เปลี่ยนสินไชย, นงลักษณ์ ศรีนทุ, สิริภัทร์ พรามณีย์, ฐิติกานต์ ธนวรรณ และ มนตรี ยิ้มสะอาด. 2540. ศึกษาอาการเกิดโรค สาเหตุของอาการกอดะไคร้ของอ้อย การถ่ายทอด และการป้องกันกำจัด, หน้า 399-406. ใน “การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35” สาขาพืช ส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร, อุดสาหกรรมเกษตร, 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

De La Rue, S., A. Padovan, and K. Gibb. 2001. *Stylosanthes* is a host for several phytoplasma, one of which show unique 16S-23S intergenic spacer region heterogeneity. J. Phytopath. 149, 613-619.

Hanboonsong, Y., W. Ritthison, and C. Choosai, 2005. Molecular detection and transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in leafhopper. KKU Res. J. 10(1): 13-21.

Harrison, N.A., M. Womack, and M.I. Carpio. 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. Plant Disease. 86, 676-681.

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.

Kakizawa, S., K. Oshima, T. Kuboyama, H. Nishigawa, H.-Y. Jung, T. Sawayanagi, T. Tzuchizaki, S. Miyata, M. Ugaki and S. Namba. 2001. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein traslocation genes. Mol. Plant-Microbe. Interact. 14: 1043-1050.

- 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. *J. of Hort. and Biotech.* 74(2): 224-231.
- Lycklama A., J.A. Nijeholt and A.J. Driessen. 2012. The bacterial Sec-translocase: structure and mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:1016-28 Review
- Oshima, K., S. Kakizawa, H. Nishigawa, H-Y. Jung. W. Wei. S. Suzuki, R. Arashida, D. Nakata, S. Miyata, M. Ugaki, and S. Namba. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics.* 36, 27-29.
- Sakuanrungsirikul, S., S. Saenkot, T. Wongwarat, and S. Srisink. 2012. Differentiation of phytoplasma infecting sugarcane and some grasses by PCR-RFLP. In Abstract of TPS 2012. The International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases : Plant Diseases in Agriculture and Food Security” February 7-10, 2012. Chiangmai. Thailand. 75.
- Srivastava, S., V. Singh, P.S. Gupta, O.K. Sinha, and A. Baitha. 2006. Nested PCR assay for detection of sugarcane grassy shoot phytoplasma in the leafhopper vector *Deltocephalus vulgaris*: a first report. *Plant Pathol.* 55: 25-28.
- Sugio, A., H.N. Kingdom, A.M. MacLean, V.M. Grieve, and S.A. Hogenhout. 2011. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis. *PNAS* 108 (48) 1254-1263.
- Thompson J.D, D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 (22):4673-80.
- Tjalma, H., A. Bolhuis, J.D.H. Jongbloed, S. Bron, and J.M. van Dijl. 2000. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*, a genome-base survey of the secretome. *Microbiol and Mol. Biol. Rev.* 64, 515-547.
- Viswanathan, R., C. Chinnaraja, R. Karuppaiah, V. G. Kumar, J.J. Rooba, and P. Malathi. 2011. Genetic diversity of sugarcane grassy shoot (SCGS) – phytoplasma causing grassy shoot disease in India. *Sugar Tech.* 13(3): 220-228.
- Wei, W., S. Kakizawa, H-Y. Jung, S. Suzuki, M. Tanaka, H. Nishizawa, S. Miyata, K. Oshima, M. Ugaki, T. Hibi and S. Namba. 2004. An antibody against the SecA membrane protein of one phytoplasma reacts with those phylogenetically different phytoplasmas. *The Am. Phytopath. Soc.* 94 (7) : 683-686.
- Weintraub, P.G., and L. Beanland. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, 51: 91-111.

Wongwarat, T., S. Sakuanrungririkul and P. Theerakulpisut. (2011). Effective method of preserving SCWL-diseased sugarcane leaves for genomic DNA extraction and molecular detection of phytoplasma. *Afr. J. Biotechnol.* 10(53):10871-10876.

Zhao, Y., W. Wei, R.E. Davis, and I.M. Lee. 2010. Recent advances in 16SrRNA Gene-based Phytoplasma Differentiation, Classification and Taxonomy. In : *Phytoplasma: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. P.G. Weintraub and P. Jones (eds.). CABI, UK. 329 p.

Table 1. Nucleotide mutation position (Nt. pos.) of 16S-23S ISR and *secA* gene.

SCWL : Sugarcane white leaf phytoplasma; SCGS : Sugarcane grassy shoot phytoplasma ;
SCGGS : Sugarcane green grassy shoot phytoplasma; Alphabetical code : phytoplasma isolate

16S-23S ISR (Nt. pos.)	12	58	70	134
CHO91-1 SCWL	G	A	A	-
KAL001-2 SCWL	-	A	A	-
SAK12-1 SCGS	G	-	A	-
CHO83-1 SCGGS	G	A	T	A

<i>secA</i> Nt. pos.	126	128	142	147	150	152	163	169	187	204	223	227	229	230	237	247
CHO91-1 SCWL	T	C	A	T	T	T	G	T	A	A	G	T	T	A	A	A
KAL001-2 SCWL	T	C	A	T	T	T	G	T	A	A	G	T	T	A	A	A
SAK12-1 SCGS	T	C	A	T	T	T	G	T	G	A	A	T	T	A	A	A
CHO83-1 SCGGS	C	T	G	A	C	C	A	C	A	G	A	A	A	G	G	T

<i>secA</i> Nt. pos.	12	30	32	68	69	70	73	79	82	85	97	103	109	115	121
CHO91-1 SCWL	G	A	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	T	C	C
KAL001-2 SCWL	A	A	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	T	C	C
SAK12-1 SCGS	A	A	A	G	C	T	T	T	A	G	G	A	T	C	C
CHO83-1 SCGGS	A	G	G	A	A	C	C	C	G	A	A	A	A	A	T

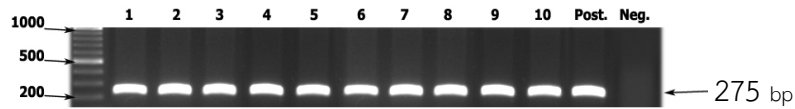


Figure 1. Fragment size of *secA* gene derived from the PCR amplification of sugarcane with whiteleaf symptom using the presented *secA* primer pairs

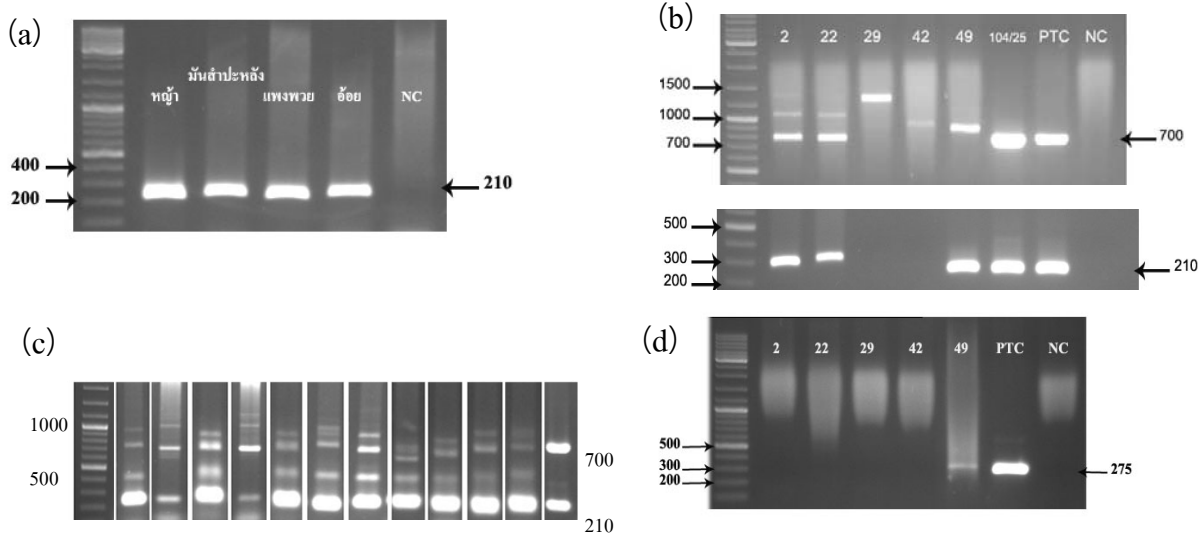


Figure 2. Nested- PCR amplification products at 16S-23S ISR of phytoplasma in (a) grass with whiteleaf symptom, cassava, periwinkle with phylloidy and sugarcane with whiteleaf symptom. (b) Sugarcane tissue culture samples with bacterial contamination. (c) Field samples of sugarcane co-infection with rust. (d) Detection of samples in (b) with *secA* gene. 700: amplification fragment derived first PCR that indicates phytoplasma dosage in the sample. 210: amplification fragment of second PCR that indicates phytoplasma infection. Far left lane : molecular weight (bp) PTC: positive control using sugarcane with whiteleaf symptom NC : negative control using water to replace DNA

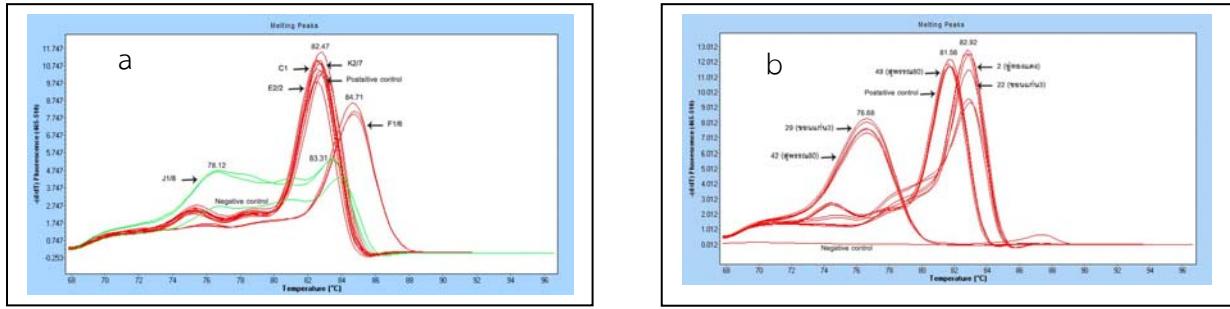


Figure 3. Melting curve genotype of fragment 210 bp in 16S-23S ISR of phytoplasma using primer sets MLO-X/MLO-Y and P1/P2 to amplify (a) sugarcane samples collected from field that showed coinfection with rust (b) sugarcane tissue culture samples with bacterial contamination. Positive control is sugarcane with whiteleaf symptom. Negative control used water to replace DNA

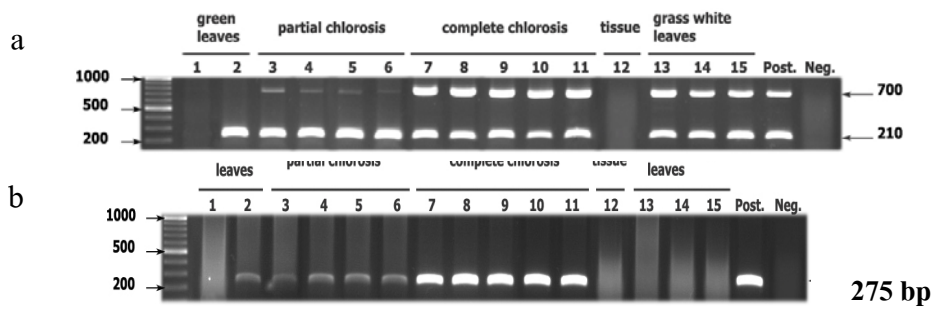


Figure 4. Detection of phytoplasma in sugarcane showing various level of whiteleaf symptom i.e. green leaf partial chlorosis and complete chlorosis, tissue culture and grass with white leaf by (a) 16S-23S ISR using nested-PCR and (b) *secA* gene

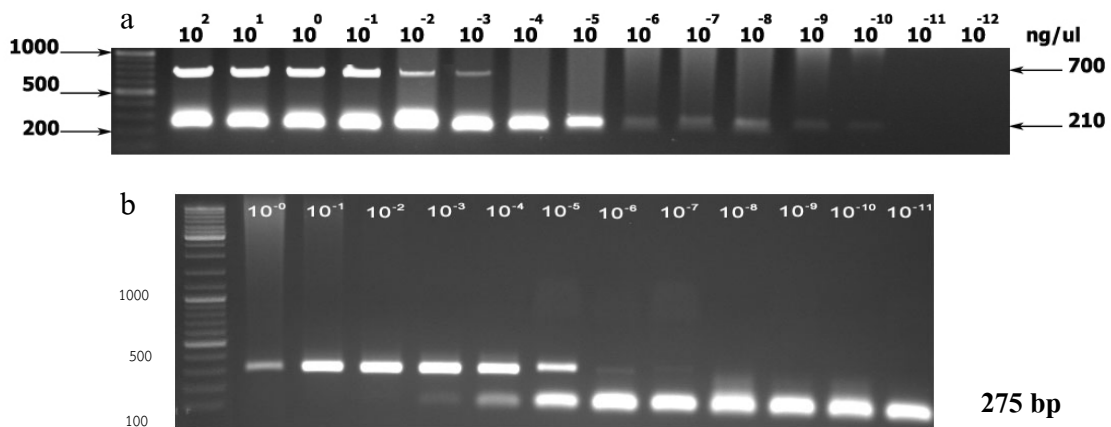


Figure 5. Sensitivity of phytoplasma detection by (a) Nested-PCR using serial dilution 700 bp fragment and (b) *secA* using serial dilution of *secA* fragment