พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ
Development of the Detection Phytoplasma of Sugarcane White Leaf Disease by Nucleic Acid Probe

กาญจนา วาระวิชะนี วันเพ็ญ ศรีทองชัย
ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์
กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

อ้อยเป็นพืชอุตสาหกรรมหลักอีกชนิดหนึ่งของประเทศไทยที่นำรายได้เข้าประเทศในปีหนึ่งๆ มากกว่าหมื่นล้านบาท และในปัจจุบันอ้อยยังเป็นวัตถุดิบที่สำคัญอย่างหนึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล จากศักยภาพดังกล่าวจึงต้องมีการขยายพื้นที่ปลูกให้เพิ่มมากขึ้นซึ่งส่วนใหญ่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยพื้นที่ปลูกกลับมีแนวโน้มลดลง ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้อ้อยสูญเสียผลผลิตไปมาก คือ ปัญหาของโรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ในปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใดที่สามารถแก้ไขปัญหานี้ได้ ดังนั้นวิธีการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคที่ดีที่สุด คือ การปลูกอ้อยโดยใช้ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรค ควบคู่กับการจัดการในแปลงผลิต ดังนั้น วิธีการตรวจสอบที่มีความแม่นยำจึงสามารถตรวจการปนเปื้อนโรคโดยทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย คือ ยีนในส่วน Sec A gene โดยออกแบบไพร์เมอร์ 2 คู่ คือ SecA-F & SecA-R และ SecAfor1 & SecArev3 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 เบส และ 800 เบส ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือนมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ จึงทำการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ให้ได้ขนาดยีนของ Sec A ที่ยาวขึ้น เพื่อประโยชน์สำหรับการหาตำแหน่งที่เหมาะสมของการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ และหายีนตำแหน่งอื่นๆ เพิ่มเติม พร้อมหายีนใหม่มาเพื่อประโยชน์สำหรับการหาตำแหน่งที่เหมาะสมของการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจและนำเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของกรดนิวคลีอิกตัวตรวจในส่วน 16 SDNA ต่อไปในปีงบประมาณ 2556

รหัสการทดลอง **03-04-54-04-03-02-07-54**

คำนำ

โรคใบขาวอ้อยเกิดจากเชื้อไฟโตรพลาสมามีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียขนาดเล็กที่สุด แต่ไม่มีผนังเซลล์ รูปร่างไม่แน่นอนมีขนาด 80-900 นาโนเมตร มีแมลงพาหะคือเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล สามารถพบเชื้ออยู่ในกลุ่มเซลล์ท่ออาหารของต้นอ้อย อ้อยที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะมีใบสีขาว ต้นแคระแกรน ใบแคบ เรียวเล็กกว่าปกติ แตกหน่อเร็ว ส่วนหน่อที่แตกใหม่จะมีสีขาวมีลักษณะคล้ายกอตะไคร้ หากเป็นมากอ้อยจะตายภายใน 2-4 เดือน โรคใบขาวอ้อยสามารถติดไปได้กับท่อนพันธุ์ จึงเป็นปัญหาอย่างมากถ้าอ้อยมีอาการแฝงของโรคอยู่ หากเกษตรกรนำอ้อยที่มีอาการแฝงไปขยายพันธุ์จะทำให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคอย่างกว้างขวางและรวดเร็วมากขึ้นหากเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาลช่วยถ่ายทอดโรคในสภาพแปลงปลูก ซึ่งในขณะนี้วิธีการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคที่ดีที่สุด คือ การใช้ท่อนพันธุ์ที่สะอาดปราศจากโรค จึงเป็นที่มาของวิจัยเพื่อพัฒนากรดนิวคลีอิกตัวตรวจโรคใบขาวในอ้อยขึ้น เรียกว่าเทคนิคนิวคลีอิกไฮบริไดเซชั่น (nucleic acid hybridization) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถตรวจหาดีเอ็นเอเป้าหมายได้ถึงระดับยีนโดยอาศัยหลักการจับคู่กันของลำดับเบสคู่สม โดยทั่วไปวิธีการนี้มีไวและความจำเพาะสูงในการตรวจจับกรดนิวคลีอิกของไฟโตรพลาสมาถึงแม้ว่าเชื้อจะมีปริมาณน้อยกรดนิวคลีอิกตัวตรวจก็มีประสิทธิภาพในการตรวจจับได้ดี เมื่อทำการผลิตกรดนิวคลีอิกตัวตรวจมาแล้วยังสามารถเก็บไว้ได้นานและสามารถเพิ่มปริมาณได้ง่ายเมื่อต้องการใช้งาน และที่สำคัญกรดนิวคลีอิกตัวตรวจนี้สามารถใช้จำแนกเชื้อสาเหตุได้ถึงระดับสายพันธุ์ (พรทิพย์ และคณะ 2541) (Klinkong *et. al.*, 1993) แต่อย่างไรก็ตามก่อนการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจที่มีประสิทธิภาพสูงนั้นต้องหายีนที่เหมาะสมก่อนเพื่อให้สามารถตรวจจับเชื้อสาเหตุโรคได้อย่างแม่นยำ จึงต้องทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะสูงกับเชื้อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย แล้วนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แล้วนำไปผลิตเป็นกรดนิวคลีอิกตัวตรวจที่มีความจำเพาะสูงเป็นลำดับต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างโรคอ้อยใบขาว
2. อุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ โรงเรือน กระถาง ตระกร้า ดิน ถุงปลูก ปุ๋ย และป้ายชื่อ
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้แช่แข็ง -20°C อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) เครื่องชั่งละเอียด เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) เครื่อง Thermal cycler และเครื่อง Gel electrophoresis
4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ เช่น ไนโตรเจนเหลว สารประกอบ CTAB buffer เอ็มไซด์ (Roch) Chlorofrom และ Ethanol

วิธีการ

1.ทำการออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนยีนที่มีศักยภาพเหมาะสมจาก GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) เพื่อนำมาออกแบบไพร์เมอร์โดยอาศัยโปรแกรม GeneFisher (http://www.bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher/)

2. ทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในส่วน 16s ribosomal RNA โดย universal primer 2 คู่ คือ P1/P7 และ R16F2/R2 ที่ขนาด และ ในส่วน Sec A โดย primer 1 คู่ คือ SecA-F/ SecA-R

3. ตรวจสอบผล PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

4.โคลนยีนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เข้าพาหะ pGEM-T Easy (Promega) และฝากแบคทีเรีย *E. coli* ด้วย heat shock transformation

5. ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลGenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) เพื่อยืนยันว่าไพร์เมอร์ที่ออกแบบไว้มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุจริง

6. รวบรวม วิเคราะห์ และรายงานผลการทดสอบ

7. สรุปผลและเขียนรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2554-กันยายน 2555

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนยีนที่มีศักยภาพเหมาะสมจาก GenBank สำหรับนำมาออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย คือ ยีนในส่วน Sec A โดยออกแบบไพร์เมอร์ 2 คู่ คือ SecA-F/ SecA-R และ SecAfor1 / SecArev3 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 เบส และ 800 เบส ตามลำดับ ซึ่งคู่ไพร์เมอร์นี้สามารถตรวจเชื้อใบขาวอ้อยได้

ทำการเลือกโคลน Sec A ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ขนาดประมาณ 400 เบส และ 800 เบส ด้วยพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) เพื่อนำเพื่อนำไปส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือนมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ จึงทำการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ให้ได้ขนาดยีนของ Sec A ที่ยาวขึ้น เพื่อประโยชน์สำหรับการหาตำแหน่งที่

เหมาะสมของการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ และหายีนตำแหน่งอื่นๆ เพิ่มเติม พร้อมหายีนใหม่มาเพื่อประโยชน์สำหรับการหาตำแหน่งที่เหมาะสมของการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจและนำเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของกรดนิวคลีอิกตัวตรวจในส่วน 16 SDNA ต่อไปในปีงบประมาณ 2556

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

สามารถนำมาสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพร์เมอร์ 2 คู่ ในส่วน Sec A ไพร์เมอร์คู่ที่ 1 คือ SecA-F/ SecA-R ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 400 เบส และ ไพร์เมอร์คู่ที่ 2 คือ SecAfor1/SecArev3 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 800 เบส และทำการโคลน Sec A ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน genbank พบว่าเหมือนมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ไพร์เมอร์ทั้ง 2 คู่นี้สามารถตรวจเชื้อใบขาวอ้อยได้เหมือนไพร์เมอร์ ในส่วน 16s ribosomal RNA คือ P1/P7 และ R16F2/R2 ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,200 เบส จึงทำการออกแบบไพร์เมอร์ใหม่ให้ได้ขนาดยีนของ Sec A ที่ยาวขึ้น เพื่อประโยชน์สำหรับการหาตำแหน่งที่เหมาะสมของการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจ และหายีนตำแหน่งอื่นๆ เพิ่มเติม พร้อมหายีนใหม่มาเพื่อประโยชน์สำหรับการหาตำแหน่งที่เหมาะสมของการสร้างกรดนิวคลีอิกตัวตรวจและนำเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของกรดนิวคลีอิกตัวตรวจในส่วน 16 SDNA ต่อไปในปีงบประมาณ 2556

เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ วงศ์แก้ว, ยุพา หาญบุญทรง พิศาล ศิริธร สมคิด บุญครอง และชุตินันท์ ชูสาย. 2541. การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระดับไร่โดยวิธี DNA probe. รายงานการประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติครั้งที่ 3, หน้า 50-61. กรุงเทพฯ. สมาคมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติร่วมกับสำนักคณะ กรรมการอ้อยและน้ำตาล.

Klinkong, S. and E. Seemuller, 1993. Detection and differentiation of the mycoplasmalike organism associated with sugarcane white leaf disease using cloned extrachromosomal DNA probe. Kasetsart J.27 : 98-103.

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.