วิธีประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์

Estimation of Sugarcane White Leaf Disease Phytoplasma Using Conventional PCR Technique

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[1/] ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์[1/] ปิยะดา ธีระกุลพิสุทธิ์[2/]
ทักษิณา ศันสยะวิชัย[1/] สุนี ศรีสิงห์[3/] นิลุบล ทวีกุล[1/]
นฤทัย วรสถิตย์[4/] รังสี เจริญสถาพร[5/]

บทคัดย่อ

การวัดปริมาณเชื้อหรือปริมาณสารพันธุกรรมตำแหน่งที่ต้องการ มักใช้การคำนวณจำนวน copy number ของสารพันธุกรรมที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณในสภาพจริง (Real time PCR) ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ราคาแพงมาก ห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่ไม่มีเครื่องมือชนิดนี้ ผลงานที่นำเสนอนี้เป็นการพัฒนาวิธีการประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยเครื่องพีซีอาร์ทั่วไป ผลการทดลองพบว่าสามารถพัฒนาวิธีการตรวจจับดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาได้สองตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง 700 คู่เบส ในบริเวณ 16S-23S rRNA ตรวจด้วยวิธี direct PCR เป็นตำแหน่งที่พบในเชื้อไฟโตพลาสมาทั่วไป และตำแหน่ง 210 คู่เบส ที่อยู่บริเวณ 16S-23S intergenic spacer region (ITS) ตรวจด้วยวิธี nested-PCR เป็นตำแหน่งจำเพาะต่อเชื้อโรคใบขาวในอ้อย ผลการนำดีเอ็นเอของเชื้อในตำแหน่ง 700 คู่เบส ที่ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm แล้วคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอ มาใช้เป็นดีเอ็นเอมาตรฐานในการประเมินปริมาณเชื้อในตัวอย่างใบอ้อย โดยเจือจางปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นตั้งแต่ 10 ถึง 10^{-6} ng/ul ทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี direct PCR พบว่าผลผลิตพีซีอาร์ปรากฏความเข้มแสงที่แตกต่างกัน โดยมีค่าความสัมพันธ์ (R^2) ระหว่างผลผลิตพีซีอาร์และปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นกับผลผลิตพีซีอาร์เท่ากับ 0.994 แสดงให้เห็นว่าสามารถนำวิธีการนี้วิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นของเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างอ้อยได้ ผลการทดลองทดสอบวิธีการนี้กับต้นอ้อยที่ติดเชื้อใบขาว พบว่าปริมาณเชื้อที่ประเมินได้ สัมพันธ์กับอาการใบขาวของต้นอ้อย โดยต้นที่แสดงอาการใบขาว ตรวจพบ

[1/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่

[2/] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[3/] ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี สถาบันวิจัยพืชไร่

[4/] ศูนย์วิจัยพืชไร่อุบลราชธานี สถาบันวิจัยพืชไร่

[5/] สถาบันวิจัยพืชไร่

ปริมาณเชื้อมากกว่าต้นที่ไม่แสดงอาการแต่มีการติดเชื้อแล้ว ได้มีการนำวิธีที่พัฒนาได้นี้ไปประเมินระดับปริมาณเชื้อในแปลงพันธุ์อ้อย และตัวอย่างสุ่มตรวจแล้วจำนวนมากกว่าสองพันตัวอย่าง วิธีการนี้ทำให้ได้ข้อมูลที่ทำให้ผู้ดำเนินงานทราบถึงความรุนแรงของเชื้อในแปลง รวมทั้งเป็นข้อมูลสำคัญในการตัดสินใจว่าควรเลือกแปลงใด ต้นใด หรือตำแหน่งใดภายในกอ สำหรับการขยายพันธุ์ในกรณีที่ไม่สามารถหาท่อนพันธุ์สะอาดในการขยายพันธุ์ได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ความสัมพันธ์กันระหว่างปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นกับผลผลิตพีซีอาร์ ในการประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างพืชได้