

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการเพิ่มผลผลิตอ้อย
2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยการบริหารจัดการศัตรูอ้อย
กิจกรรมที่ 3 : การจัดการ โรคใบขาวแบบผสมผสาน
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : 3.11 การตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคใบอ้อยในแหล่งระบาดต่างๆ ด้วย Membrane protein translocation system genes (Sec protein genes) และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ระบุความแตกต่างของ sec gene ของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : **Differentiation of sugarcane white leaf phytoplasma from different endemic area by membrane protein translocation system (sec protein system) and development of sec gene marker for phytoplasma strain identification**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศุภิรัตน์ สงวนรังศิริกุล¹
ผู้ร่วมงาน : นางทักษิณา ศันสยะวิชัย¹ นางสาวสุนิ ศรีสิงห์²
นายธีรวุฒิ วงศ์วัฒน์¹

5. บทคัดย่อ (ภาษาไทย และภาษาอังกฤษ)

การสำรวจและศึกษาความหลากหลายของเชื้อสาเหตุของโรคใบขาวในอ้อยเป็นข้อมูลที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อเพื่อคัดกรองโรค ที่สามารถตรวจพบเชื้อหรือจำแนกชนิดของเชื้อได้ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการสำรวจตัวอย่างอ้อยที่ติดเชื้อใบขาวจากหลายแหล่งปลูกทั่วประเทศ จาก 190 ตัวอย่างที่สำรวจได้ พบอาการหลักของโรคใบขาว 3 อาการ ได้แก่ อาการใบขาวแต่ไม่แตกกอฝอย (SCWL: Sugarcane white leaf) ใบขาวร่วมกับอาการแตกกอฝอย (SCGS: Sugarcane grassy shoot) และใบเขียวแต่มีอาการแตกกอฝอย (SCGGS: Sugarcane green grassy shoot) พบเป็น SCWL 59.47% SCGS

35.27% และ SCGGS 5.26% โดยตัวอย่างจากภาคเหนือและตะวันออกพบได้ทั้ง 3 อาการ ส่วนภาคอื่นพบเพียง SCWL และ SCGS

การศึกษาความแตกต่างของเชื้อจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S-23S rDNA ในบริเวณ 16S-ITS ขนาดความยาวดีเอ็นเอ 210-219 bp ใน 99 ตัวอย่างประกอบด้วยตัวอย่างหญ้าและอ้อย เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI แบ่งเชื้อไฟโตพลาสมาออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ (1) กลุ่มไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคน้ำใบขาว และ (2) กลุ่มไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อย มีความแตกต่างระหว่าง 2 กลุ่ม 8-9 เบส ในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกลุ่มย่อย SCWL, SCGS ที่มีความใกล้เคียงกันมาก และ SCGGS ที่แยกกลุ่มจาก 2 ชนิดแรก ความแปรปรวนที่เกิดขึ้นภายในกลุ่มที่ 2 นี้ พบว่าเป็นชนิด substitution และ insertion mutation การขยายความยาวสาย 16S-23S rDNA เป็น 1770-1772 bp ครอบคลุมตั้งแต่ 16S ไปยังบางส่วนของ 23S พบว่ายังคงแบ่งกลุ่มเช่นเดิม โดย SCWL และ SCGS ยังคงใกล้เคียงกันมากเช่นเดิม

การศึกษาความแตกต่างของเชื้อจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *secA* ใน 170 ตัวอย่าง พบว่าให้เช่นเดียวกันกับการตรวจด้วย 16S-23S rDNA สามารถตรวจพบความแปรปรวนในลำดับเบสของยีน *secA* ได้ทั้งใน SCWL และ SCGS ตั้งแต่ 1-5 เบส แสดงให้เห็นว่า *secA* gene มีความละเอียดในการจำแนกความแตกต่างมากกว่า ตำแหน่ง 16S-23S ITS ที่นิยมใช้เดิม การเพิ่มความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ *secA* จาก 275 bp เป็น 377 bp พบความแปรปรวนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นจำนวน 31 ตำแหน่ง กระจายในลำดับนิวคลีโอไทด์ เป็นความแปรปรวนชนิด substitution mutation แต่ผลจากการแบ่งกลุ่มพบว่า SCWL และ SCGS อยู่คงอยู่ในกลุ่มเดียวกันเช่นเดียวกันเช่นเดิม

การศึกษาความแตกต่างของเชื้อจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน *secY*, *Tuf* gene (elongation factor-tu) และ *GroEL* gene พบว่ายังไม่ประสบความสำเร็จ ส่วนการพัฒนาวิธีการตรวจยีน *imp* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนนี้ได้สำเร็จ มีขนาดยีนที่ได้ประมาณ 700 bp แต่ยังไม่ได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีนนี้ในตัวอย่างที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ซึ่งจะดำเนินการในลำดับต่อไป เนื่องจากเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการศึกษานิวคลีโอไทด์ที่เป็นพาหะนำโรคใบขาวทั้ง 3 ชนิด

ABSTRACT

The surveying and studying of sugarcane white leaf phytoplasma diversity is essential information in developing detection tools for disease screening and identifying. 190 symptomatic sugarcane samples were collected from the surveying of this disease in different planting areas throughout the country. Majority 3 symptoms were found in relation to phytoplasma in sugarcane including (1) white leaf with no grassy shoot (SCWL: Sugarcane white leaf), (2) white leaf with white grassy shoot (SCGS: Sugarcane grassy shoot) and (3) grassy green leaves with no white leaf (SCGGS: Sugarcane green grassy shoot). The incident of each type were SCWL 59.47%, SCGS 35.27% and SCGGS 5.26%. All 3 types were found in samples collected from northern and eastern regions while SCWL and SCGS were found in other region.

Identification of genetic variations of phytoplasma by nucleotide sequencing of 16S-23S rDNA in the region 16S-ITS with 210-219 bp DNA fragment length in 99 samples including infected grasses and sugarcane in comparison with nucleotide sequence in NCBI database revealed 2 major groupings : (1) white leaf disease phytoplasma in grass and (2) phytoplasma in sugarcane, with 8-9 bases differences among these two groups. Group 2 comprised of closely related SCWL and SCGS subgroup and the distinctive SCGGG subgroup. Nucleotide variations in these two subgroups were substitution and insertion mutation. The extension of 16S-23S rDNA length to 1770-1772 bp that cover the region of 16S to partial 23S did not affect the grouping, yet SCWL and SCGS were still closely related.

Identification of genetic variations by nucleotide sequencing of partial *secA* genes in 170 samples showed the same grouping structures as by 16S-23S rDNA. 1-5 bases variation of *secA* gene in SCWL and SCGS were detected indicates better base resolution of *secA* gene for genetic identification than the 16S-23S ITS. The length extension of *secA* from 275 bp to 377 bp showed 31 bases variation among the 3 phytoplasmas. The mutations were substitution mutation. Grouping of the three phytoplasma were not affected by these bases extension.

The attempts to study other genes including *secY*, *Tuf* gene (elongation factor-tu) and *GroEL* genes were not success. The development of *imp* gene detection protocol revealed 700 bp fragments. However, sequencing of this fragment need to be done as this gene is important in studying transmission vector of the three phytoplasmas.

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี

การจำแนกความแตกต่างของเชื้อสาเหตุของโรคต่างๆ นั้นนับว่าเป็นข้อมูลที่มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการพัฒนาวิธีการตรวจการติดเชื้อเพื่อคัดกรองโรค จากผลการทดลองผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของคณะวิจัยนี้ โดยใช้สารสกัดจากอ้อยที่เป็นโรคใบขาวที่มาจากแหล่งระบาดในจังหวัดขอนแก่น พบว่าเมื่อนำมาตรวจสอบกับตัวอย่างใหม่กลับให้ผลการทดลองที่แปรปรวนเมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยการใช้เทคนิคพีซีอาร์ สาเหตุเนื่องมาจากโมโนโคลนอลแอนติบอดีเป็นตัวตรวจสอบที่มีความจำเพาะสูงมาก จึงทำให้เกิดปัญหาเมื่อนำมาใช้ตรวจตัวอย่างที่มาจากแหล่งอื่น (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2552ก) นอกจากนี้จากการทดลองนำชุดตรวจสอบโรคใบขาวของอ้อยที่ผลิตขายในท้องตลาดแล้วซึ่งผลิตโดยการใช้เชื้อจากแหล่งระบาดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ก็ให้ผลการตรวจเช่นเดียวกัน โดยพบชุดตรวจสอบให้ผลบวกเพียง 2 ตัวอย่างจากตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาวซึ่งสำรวจในแหล่งปลูกทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ 29 ตัวอย่าง เช่นเดียวกันกับการทดลองตรวจสอบกับตัวอย่างใบขาวในแหล่งปลูกภาคกลาง แต่ชุดตรวจสอบนี้ใช้ได้ผลดีกับตัวอย่างที่มาจากแหล่งปลูกบางแหล่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น อุดรธานี ขอนแก่น ข้อมูลดังกล่าวนี้ นอกจากจะแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ระบาดในแหล่งต่างๆ ที่มีการปลูกอ้อยแล้วยังแสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของเชื้อส่งผลกระทบต่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ให้ผลแม่นยำ เชื่อถือได้ นอกจากข้อมูลการตรวจพบความแตกต่างของเชื้อที่ตรวจพบได้ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีแล้ว จากการทดลองตรวจหาเชื้อโรคใบขาวจากตัวอย่างอ้อยที่สำรวจมาจากแหล่งปลูกหลายแหล่งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ด้วยวิธี PCR 2 วิธีการ โดยวิธีที่ 1 ใช้ไพรเมอร์ชุด MLO X และ MLO Y ตรวจในช่วง 16S rDNA ถึง 23S rDNA และวิธีที่ 2 เป็น nested-PCR ใช้ไพรเมอร์เช่นเดียวกับวิธีที่ 1 ใน PCR รอบที่ 1 และรอบที่ 2 ใช้ไพรเมอร์ชุด MLO P1-P2 ซึ่งตรวจในช่วง intergenic spacer region (tRNA) (พรทิพย์, 2542) พบว่าบางตัวอย่างให้ผลบวกทั้ง 2 วิธีการ แต่บางตัวอย่างให้ผลบวกด้วยวิธีการที่ 1 แต่ตรวจไม่พบด้วยวิธีการที่ 2 ซึ่งเป็นวิธีที่มีความไวสูงมาก (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2552ข) จากการสังเกตผลการตรวจตัวอย่างอ้อยที่ส่งมาตรวจเพื่อคัดกรองโรคใบขาวจากโครงการป้องกันกำจัดโรคใบขาวที่มาจากแหล่งปลูกต่างๆ กว่า 500 ตัวอย่าง ในระหว่างปี 2551-2552 ด้วยสองวิธีการดังกล่าวข้างต้น ส่วนใหญ่พบแถบดีเอ็นเอโดยการตรวจด้วยวิธีที่ 1 มากกว่าวิธีที่ 2 แสดงให้เห็นว่ามีไฟโตพลาสมามากกว่า 1 ชนิด ในตัวอย่างที่ได้ตรวจสอบ หรือเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงไป ทำให้ไม่สามารถตรวจได้ด้วยไพรเมอร์ชุดเดิม นอกจากนี้จากการสำรวจติดตามผลการขยายพันธุ์อ้อยของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ที่นำไปปลูกในแหล่งปลูกต่างๆ ของประเทศ พบว่าอาการใบขาวที่มาจากเชื้อจากปลูกต่างแหล่ง มีอาการแตกต่างกัน บางแหล่งในภาคอีสานพบว่ามีอาการใบขาวอย่างชัดเจน แต่บางแหล่งในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบอาการใบขาวปนเขียว และเหลือง เมื่อนำพันธุ์อ้อยที่ติดเชื้อจากภาคอีสานไปปลูกในภาคกลาง พบว่ายังคง

แสดงอาการใบขาวที่ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าอาการที่แตกต่างกันนี้ น่าจะมาจากความแตกต่างของเชื้อมากกว่าเกิดจากสภาพแวดล้อมในการปลูก

การจัดจำแนกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาเดิมใช้ตรวจสอบความแตกต่างภายใน 16S rRNA และ 16S-23S rRNA spacer region เนื่องจากเป็นตำแหน่งอนุรักษ์และมี universal primer สำหรับตรวจสอบบริเวณนี้ แต่ต่อมาพบว่าการใช้ขึ้นเพียงตำแหน่งเดียวในการจัดจำแนกความแตกต่างนั้นมีข้อจำกัด ไม่สามารถระบุความแตกต่างของ subgroup รวมทั้ง strain ที่แตกต่างกันได้ จึงได้มีการศึกษายีนอื่นเพิ่มเติม เพื่อใช้ร่วมในการวิเคราะห์ความแตกต่าง มีการนำยีนในกลุ่ม Secretory (Sec) system มาใช้ ซึ่งเป็นกลุ่มที่มียีนทำงานร่วมกันอย่างเป็นขบวนการและมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย (Tjalma et al., 2000) ในยีนกลุ่มนี้ได้มีการนำ *secA* gene มาใช้ในการจำแนกชนิดเชื้อไฟโตพลาสมา (Hodgettes et al., 2008) *secA* เป็น membrane protein หนึ่งที่ทำหน้าที่ มีหน้าที่เป็น ATPase activity ส่งถ่าย preprotein-secB complex ให้กับ secYEG membrane-embedded translocon เพื่อขับ โปรตีนออกสู่ด้านนอกเซลล์ และถูกควบคุมด้วย secM signal peptide (Lycklama, et al., 2012 , Economou, 1999) พบว่าลำดับกรดอะมิโนของช่วง SecA protein ในแบคทีเรียหลายกลุ่ม มีลักษณะเป็น conserved sequence (Kakizawa, 2001) มีการโคลนยีนนี้และสร้างโปรตีนสำหรับผลิตแอนติบอดีเพื่อตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาบางชนิด เช่น apple proliferation, onion yellow เป็นต้น (Wei, 2004) ดังนั้นหากมีการนำวิธีการเหล่านี้มาใช้ในการตรวจสอบและจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย โรคคอดะไคร้ และตัวอย่างใบขาวที่พบในวัชพืชต่างๆ ในไร่อ้อย น่าจะทำให้ได้ข้อมูลการจัดกลุ่มและระบุความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาจากตัวอย่างต่างๆ ได้ละเอียดมากขึ้นกว่าวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน จะทำให้มีความรู้และเข้าใจเชื้อชนิดนี้มากขึ้น ส่งผลต่อการหาแนวทางป้องกันและกำจัดการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่ การตรวจสอบแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคในอ้อยในแหล่งระบาดต่างๆ ด้วย Membrane protein translocation system genes (Sec protein genes) ร่วมกับยีนตำแหน่งอื่น และการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลที่ระบุความแตกต่างของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ได้

7. วิธีดำเนินการ

การเก็บตัวอย่างพืชสำหรับใช้ในงานวิจัย

สำรวจและเก็บตัวอย่างอ้อยที่เป็นโรคใบขาวจากแหล่งปลูกอ้อยที่สำคัญ รวมทั้งหญ้าชนิดต่างๆ ที่แสดงอาการของโรคใบขาวจากแปลงปลูกอ้อย หรือบริเวณใกล้เคียง บันทึกรายละเอียดต่างๆ จำนวนตัวอย่างอ้อย และหญ้าที่เก็บมาได้ในแต่ละพื้นที่

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบอ้อยและหญ้าโดยวิธีดัดแปลงเทคนิค Li and Midmore, 1999 บดตัวอย่าง 0.2 กรัมใน extraction buffer 800 ul ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที โดยทุกๆ 10 นาทีให้พลิกหลอดไปมา นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 10 นาที ดูดส่วนใส่ใส่หลอดใหม่แล้วเติม Chloroform : Isoamyl (24 : 1) 500 ul ผสมให้เข้ากัน นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 10 นาที ดูดส่วนใส่ใส่หลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol 500 ul พลิกไปมาเบาๆ จนเห็นสายดีเอ็นเอ นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม 95% ethanol 500 ul คัดให้ตะกอนลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เติม 95% ethanol 500 ul อีกครั้งหนึ่ง ตากตะกอนให้แห้ง เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 180 ul 5M NaCl 20 ul และ 95% ethanol 200 ul พลิกไปมาจนกระทั่งเห็นตะกอนดีเอ็นเอ นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม 70% ethanol 500 ul คัดตะกอนให้ลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที ทำซ้ำ ตากตะกอนจนแห้ง เติม TE buffer ที่มี RNase A 40 ul

การออกแบบไพรเมอร์

ค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *SecA* gene จากฐานข้อมูลใน NCBI จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้มาเรียงลำดับ (multiple alignment) ซึ่งเป็นโปรแกรมสำเร็จรูปในเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ด้วยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณอนุรักษ์ (conserve region)

secY gene ใช้ไพรเมอร์จากรายงานของ Lee et al. (2010) ดังนี้

L15F1/MapR1	CCTGGTAGTGGYAMTGGWAAAAC / ATTARRAATATARGGYTCTTCRTG
L15F1A-a/MapR1A-a	TGGWAAAAC TKCBGGWAARGG / AAGMTKYACCRATDCCATG
L15F1A-b/MapR1A-b:	GGWAAAACYTSHGGYMRVGGHCATAAAGG / CCWATMCCRTGWCCDGWAAAA

ออกแบบไพรเมอร์ *secY* โดยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *secY* จากฐานข้อมูล NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ได้แก่ >GU004341.1-Maize, >GU004337.1-Paulownia, >GU004357.1-Blueberry และ >GU004345.1-aster จัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม clustalW

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 3. เลือกบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์สายละ 20-25 bp นำแต่ละสายมาหาค่าจำนวนนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด, ค่าเปอร์เซ็นต์ของ GC content, และตรวจสอบ Self-Complementarity สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

SecY-x	GCACG TTCAGGAAAACTTTGCG
SecY-y	CCAATACCATGTCCGGTAAATTCTTC
Y1	CTCCAAACAAGCTCAAGCAGCCA
Y2	GATGTACCAATACCATGTCCGG

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับ Imp gene โดยค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Imp gene* จากฐานข้อมูลใน NCBI จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดที่ได้มาเรียงลำดับ (multiple alignments) ซึ่งเป็นโปรแกรมสำเร็จรูปในเว็บไซต์ <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ด้วยเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณอนุรักษ์ (conserve region)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ตัดชิ้นดีเอ็นเอขนาด 200 ul ออกจาก agarose gel ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 ml ที่เติม capture buffer 200 ul นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C จนกระทั่งเจลละลาย แล้วดูดใส่ลงใน spin column นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสออก เติม capture buffer 200 ul บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสออก เติม washing buffer 500 ul นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสออก (ทำซ้ำ) เติมน้ำนิ่งฆ่าเชื้อ 40 ul บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 1 นาที นำผลผลิตที่ได้ 2 ul เติมน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 8 ul มาผสมกับ loading dye ที่มี SYBER GREEN จำนวน 1.5 ul ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง ความต่างศักย์ 100 โวลต์ ใช้ 0.5X TBE เป็น buffer ในเวลาประมาณ 40 นาที แล้วนำมาผ่าน agarose gel ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต จากนั้นทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วเทียบผลกับฐานข้อมูลใน NCBI นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากตัวอย่างทั้งหมด มาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.1

การเพิ่มผลผลิต *Sec A gene* ด้วยเทคนิค direct PCR

ส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ปริมาณ 15 ul ได้แก่ 10X buffer 1.5 ul, 25 mM MgCl₂ 1.5 ul, 2.5 mM dNTP 1.2 ul, 10 uM SecA Primer Forward/Reverse 0.75 ul, 5 U Taq polymerase 0.3 ul และ DNA template 4 ul (25 ng/ul)

สภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสม ดังนี้ Pre-denaturation 94°C นาน 2 นาที ตามด้วย Denaturation 94°C นาน 30 วินาที, Annealing 60°C นาน 30 วินาที Extension 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 28 รอบ ตามด้วย Final-extension 72°C นาน 15 นาที

การเพิ่มปริมาณผลผลิต 16S-23S rDNA ด้วย nested-PCR

การตรวจสอบยีนตำแหน่ง 16S-23S rRNA ใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ พรทิพย์ และคณะ (2542) ส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ในรอบที่ 1 (direct-PCR) ปริมาณ 15 μ l ได้แก่ 10X buffer 1.5 μ l, 25 mM MgCl₂ 1.2 μ l, 2.5 mM dNTP 0.9 μ l, 10 μ M Primer MLO-X, MLO-Y 0.75 μ l, 5 U Taq polymerase 0.3 μ l และ DNA template 3 μ l สภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสม ดังนี้ Pre-denaturation 94°C นาน 5 นาที, ตามด้วย Denaturation 94°C นาน 1 นาที, Annealing 55°C นาน 30 วินาที, Extension 72°C นาน 1 นาที จำนวน 24 รอบ ตามด้วย Final-extension 72°C นาน 7 นาที

ส่วนประกอบที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณพีซีอาร์ในรอบที่ 2 (nested-PCR) ปริมาณ 15 μ l ได้แก่ 10X buffer 1.5 μ l, 25 mM MgCl₂ 1.2 μ l, 2.5 mM dNTP 0.6 μ l, 10 μ M Primer P1 / P2 0.75 μ l, 5 U Taq polymerase 0.3 μ l และ DNA template 3 μ l สภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสมดังนี้ Pre-denaturation 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94°C นาน 1 นาที, Annealing 60°C นาน 30 วินาที Extension 72°C นาน 1 นาที จำนวน 25 รอบ ตามด้วย Final-extension 72°C นาน 7 นาที

การเพิ่มปริมาณผลผลิต SecY ด้วย เทคนิค direct PCR

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ SecY-x และ SecY-y สารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 15 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 100 ng/ μ l จำนวน 4 μ l, 1x buffer, 2.17 mM MgCl₂, 0.12 mM dNTP, 0.5 μ M primer แต่ละสายของ Forward และ reverse, 0.1 U Taq DNA polymerase สภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสมดังนี้ Pre-denaturation 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94°C นาน 30 วินาที, Annealing 55°C นาน 30 วินาที, Extension 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย Final-extension 72°C นาน 10 นาที

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ SecY-x และ SecY-y สารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 15 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 100 ng/ μ l จำนวน 4 μ l, 1x buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.12 mM dNTP, 0.5 μ M primer แต่ละสายของ Forward และ reverse, 0.1 U Taq DNA polymerase สภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสมดังนี้ Pre-denaturation 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94°C นาน 30 วินาที, Annealing 55°C นาน 30 วินาที, Extension 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย Final-extension 72°C นาน 10 นาที

การเพิ่มปริมาณผลผลิต Imp gene ด้วย เทคนิค nested- PCR

ใช้ไพรเมอร์ SCWL-Imp ที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก Dr. Shigeyuki KAKIZAWA (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Bioproduction Research Institute, Japan) มีลำดับเบสของไพรเมอร์และผลผลิต PCR ดังนี้

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	ความยาวสาย	ผลผลิต PCR (bp)
--------------	----------	------------	--------------------

SCWL-Imp_F1	CCTAAAGATTTGCAAACCTGATGAAA	25	922
SCWL-Imp_R1	AGAAGAATTTGTTGAAATTATAGAG	25	
SCWL-Imp_F2	TTTTTATTGAATTGCTAAATTATGT		691
SCWL-Imp_R2	ATATGCAAAAGCATATTTTTTTACT	25	

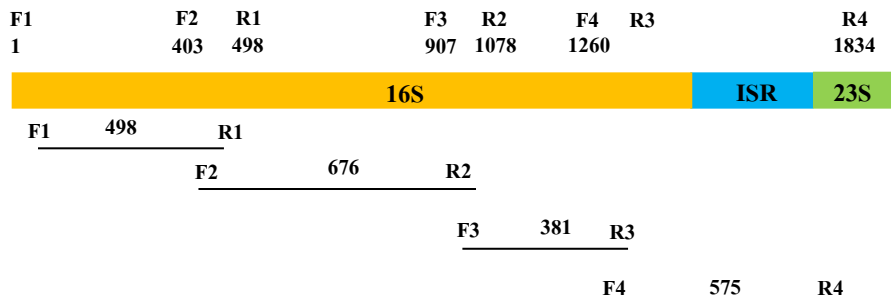
สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Imp-F1 และ Imp-R1 คือ สารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 15 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 100 ng/ μ l จำนวน 3 μ l, 1x buffer 1.5 μ l, 25 mM MgCl₂ 1.2 μ l, 2.5 mM dNTP mix 1.2 μ l, 10 μ M F-R Primer mix 0.3 μ l, *Taq* polymerase 5U/ μ l 0.3 μ l, DNA template 100 ng 3 μ l, น้ำ 7.5 μ l ใช้สภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสมดังนี้ Pre-denaturation 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94°C นาน 1 นาที, Annealing 5⁰C นาน 1 นาที, Extension 72°C นาน 40วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย Final-extension 72°C นาน 7 นาที

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ Imp-F2 และ Imp-R2 คือ สารละลายในปฏิกิริยาพีซีอาร์ปริมาตรรวม 15 μ l ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 100 ng/ μ l จำนวน 3 μ l, 1x buffer 1.5 μ l, 25 mM MgCl₂ 1.2 μ l, 2.5 mM dNTP mix 1.2 μ l, 10 μ M F-R Primer mix 0.3 μ l, *Taq* polymerase 5U/ μ l 0.3 μ l, DNA PCR template dilute 1:100, 1:200, 1:500 และ 1:1,000 , 3 μ l, น้ำ 7.5 μ l ใช้สภาวะพีซีอาร์ที่เหมาะสมดังนี้ Pre-denaturation 94°C นาน 5 นาที ตามด้วย Denaturation 94°C นาน 1 นาที , Annealing 5⁰C นาน 1 นาที, Extension 72°C นาน 40วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย Final-extension 72°C นาน 7 นาที ตรวจสอบการทดลองด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใช้สี SYBR Gold ในการย้อม DNA บันทึกภาพด้วย Gel Documentation

การขยายความยาวสายดีเอ็นเอตำแหน่ง 16S-23S rDNA

ออกแบบไพรเมอร์ใหม่จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Candidatus Phytoplasma cynodontis* (AB741630.1) จากฐานข้อมูล NCBI ได้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ มีตำแหน่งของไพรเมอร์ดังแสดงในภาพที่ 1 และ ลำดับเบสไพรเมอร์ดังนี้

16S-23S F1 :	AGTTTGATCCTGGCTCAGGATA	16S-23S R1:	CATAGTTTGCCGGGGCTTA
16S-23S F2	GAACGATGAAGTATTTTCGGTA	16S-23S R2	GCTCGTTTTAGGACTTAACCTAAC
16S-23S F3	GCACAAGCGGTGGATCATG	16S-23S R3	TGTGTACAAACCCCGAGAACG
16S-23S F4	GCAGTCTCAGTTCGGATTGA	16S-23S R4	CCGTTAATTGCGTCCTTCA



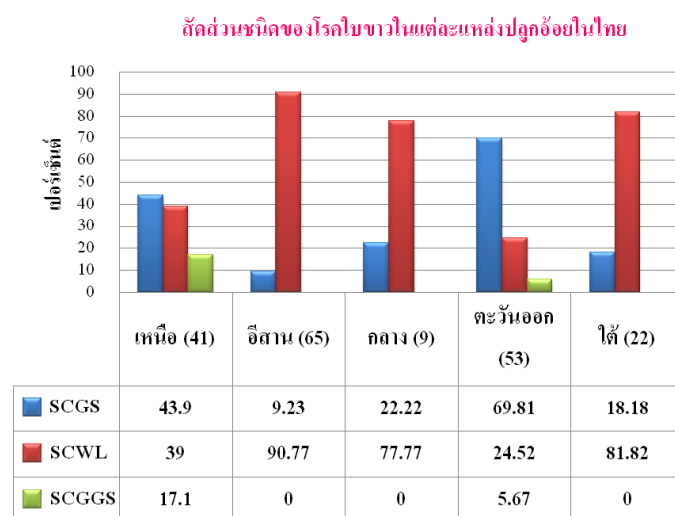
ภาพที่ 1 ตำแหน่งการเกาะจับของไพรเมอร์บนสายดีเอ็นเอ 16S-23S rDNA ที่ได้จากการออกแบบเพื่อขยายขนาดความยาวใหม่เป็น 1770 bp

เวลาและสถานที่ : ระยะเวลา 2554-2558 สถานที่ดำเนินการ : ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสำรวจอาการโรคใบขาวจากแหล่งปลูกในประเทศ

จากตัวอย่าง 190 ตัวอย่างที่สำรวจจากแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศ พบอาการหลักของโรคใบขาว 3 อาการ ได้แก่ ใบขาวไม่แตกกอฝอย (SCWL: Sugarcane white leaf) ใบขาวและแตกกอฝอย (SCGS: Sugarcane grassy shoot) และ ใบเขียวและแตกกอฝอย (SCGGS: Sugarcane green grassy shoot) โดยตัวอย่างที่สำรวจได้พบ SCWL 59.47% SCGS 35.27% และ SCGGS 5.26% โดยตัวอย่างจากภาคเหนือและตะวันออกพบได้ทั้ง 3 อาการ ส่วนภาคอื่นพบเพียง SCWL และ SCGS อาการ SCGGS ตรวจพบยาก เนื่องจากไม่แสดงใบขาว (ภาพที่ 2)



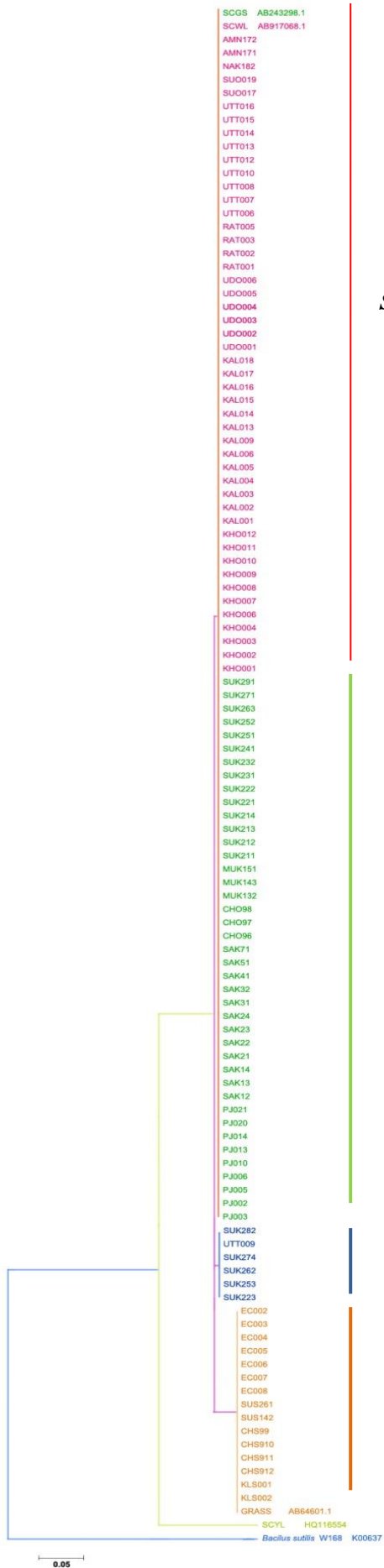
ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์ชนิดของโรคใบขาวสำรวจจากอาการในตัวอย่าง 190 ตัวอย่างที่ได้จากแหล่งปลูกอ้อยในไทยตามภาคต่างๆ SCGS : Sugarcane grassy shoot, SCWL: sugarcane white leaf, SCGGS : sugarcane green grassy shoot

2. การตรวจลำดับเบสเพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อโรคใบขาว

ความแตกต่างของเชื้อจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S-23S rDNA : เป็นยีนที่นิยมนำมาศึกษาหาความแตกต่างทางลำดับเบสของเชื้อไฟโตพลาสมา และแบคทีเรียอื่นๆ อีกหลายชนิด โดยมีรายงานการศึกษายีนนี้จำนวนมาก นอกจากนี้ในการจัดจำแนกไฟโตพลาสมาด้วยลำดับเบส ใช้ลำดับเบสของยีนตำแหน่งดังกล่าวเป็นหลักในการจัดแยกกลุ่ม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษายีนนี้ประกอบด้วยเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับรายงานอื่น จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาทั้ง 99 ตัวอย่างใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ซึ่งเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 210 bp ด้วยเทคนิค nested-PCR แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดมาจัดเรียงและเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI โดยกับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและหญ้าในการเปรียบเทียบ ได้แก่ HQ917068.1 (sugarcane white leaf; SCWL), AB243298.1 (sugarcane grassy shoot; SCGS), AB642601.1 (Bermuda grass white leaf; BGWL) และใช้ K00637 (*Bacillus subtilis*) เป็น out group นั้น พบว่า Phylogenetic tree ที่ถูกสร้างขึ้นแบ่งเชื้อไฟโตพลาสมาออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ (1) กลุ่มไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคหญ้าใบขาว และ (2) กลุ่มไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อย (ภาพที่ 3) โดยมีความแตกต่างกันประมาณ 8-9 เบส และมีขนาดสายดีเอ็นเอในตำแหน่งที่เพิ่มปริมาณยาวกว่าของเชื้อในอ้อยโดยมีขนาด 219 เบส การจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยด้วยตำแหน่งดีเอ็นเอที่ทำการทดสอบนี้พบว่ามี ความใกล้เคียงกันมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SCWL และ SCGS ส่วน SCGS แยกกลุ่มออกจาก SCWL และ SCGS ชัดเจน สอดคล้องกับอาการที่ไม่แสดงอาการใบขาว

จากการจัดกลุ่ม พบว่าในกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาจากอ้อย มีการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ กลุ่มย่อยที่ 1 ประกอบด้วย SCWL มีขนาด 210 เบส และ SCGS มีขนาด 211 เบส และกลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย SCGS ซึ่งอ้อยที่ติดเชือนี้จะไม่มีอาการใบขาวแต่มีลักษณะกอลฝอยและใบมีสีเขียว

สำหรับตัวอย่างเชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าที่เก็บรวบรวมได้จาก ขอนแก่น สุโขทัย ชลบุรี และกาฬสินธุ์ ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 100% สอดคล้องกับรายงานของ Wongkaew et al., (1997) ซึ่งศึกษาไฟโตพลาสมาจากหญ้า 3 ชนิดพบว่าเชื้อมีความใกล้เคียงกันสูงมาก จากรายงานของ รุ่งโรจน์ (2543) ซึ่งทำการศึกษาคความหลากหลายของไฟโตพลาสมาจากภูมิภาคต่างๆ ของประเทศไทย ด้วยเทคนิค RFLP พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ต้องใช้ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (Similarity coefficient) ระดับ 0.90 จึงจะสามารถแบ่งกลุ่มอ้อยและหญากับอ้อยได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีความใกล้เคียงกันมาก อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการถ่ายทอดเชื้อระหว่างหญากับอ้อย (Wongkaew et. al., 1997)



SCWL

SCGS

SCGGS

**Grass
white leaf**

ภาพที่ 3 Phylogenetic tree สร้างจาก Neighbor –joining ที่ได้จากการจำแนกความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S-23S rDNA ในบริเวณตำแหน่ง 16S- ITS ของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคลใบขาวของอ้อยและหญ้า ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 210 bp จากอ้อย 99 ตัวอย่าง หญ้า 15 ตัวอย่าง เทียบกับข้อมูลลำดับเบสใน NCBI : HQ917068.1 (sugarcane white leaf; SCWL), AB243298.1 (sugarcane grassy shoot; SCGS), AB642601.1 (Bermuda grass white leaf; BGWL) and K00637 (*Bacillus subtilis* W168)

นอกจากนี้แล้ว ผลการทดลองที่ได้ยังสอดคล้องกับรายงานอื่นที่ศึกษา Wongkaew et al., (1997) ได้ใช้เทคนิค RFLP และเอนไซม์ Hpa II แยกไฟโตพลาสมาออกเป็นกลุ่มของ SCWL, SCGS และกลุ่ม gramineous weed ได้ Lee et. al., (1997) รายงานว่าจากการตัดด้วยเอนไซม์ Alu I ไม่พบแถบดีเอ็นเอที่แสดงความแตกต่างกันของไฟโตพลาสมา SCGS-In1, RYD-In1, SCWL, BGWL และ ABGWL รายงานของ Sdoodee et. al., (1999) พบว่า SCWL และ SCGS มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูงและเรียกกลุ่มนี้ว่า white leaf cluster และ Rao, et al., (2008) รายงานผลของการสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ยีน 16S และ 16S-23S ITS ของไฟโตพลาสมา SCGS แหล่งต่างๆจากประเทศอินเดีย ใต้หวัน และไทย ว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันสูงมาก แต่พบความแปรปรวนของไฟโตพลาสมา SCGS-T จากประเทศไทย ซึ่งสอดคล้องกับในรายงานวิจัยนี้ที่พบความแปรปรวนของไฟโตพลาสมาจาก 7 ตัวอย่างในจำนวนไฟโตพลาสมาที่สำรวจได้ทั้งหมด โดยเป็นตัวอย่างที่สำรวจได้จากแหล่งปลูกบริเวณเดียวกันในจังหวัดกาฬสินธุ์ ซึ่งความแปรปรวนที่พบนี้เกิดจาก deletion mutation ในตำแหน่งที่ 12 ที่ไม่พบนิวคลีโอไทด์ G ในลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างดังกล่าว (ภาพที่ 4) สำหรับไฟโตพลาสมา SCWL และ SCGS นั้น ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม rice yellow dwarf (RYD) หรือ 16SXI (Lee et al., 1997) แต่ขณะนี้ยังไม่มีรายงานลำดับเบสของเชื้อ SCGS ในฐานข้อมูล NCBI จากการศึกษาในรายงานนี้พบว่าไฟโตพลาสมา SCGS ถูกจัดออกมาเป็นอีกหนึ่งกลุ่มย่อย และเมื่อนำไฟโตพลาสมา SCWL, SCGS และ SCGS มาจัดเรียงกันพบว่ามีความแปรปรวนแบบ substitution mutation ในตำแหน่งที่ 72 โดยที่ไฟโตพลาสมา SCWL, SCGS เป็นนิวคลีโอไทด์ A แต่ SCGS เป็น T นอกจากนี้ในยังเกิด insertion mutation คือพบนิวคลีโอไทด์ A เฉพาะในไฟโตพลาสมา SCGS เท่านั้นในตำแหน่งที่ 134 ดังนั้นรายงานวิจัยนี้จึงถือได้ว่าเป็นงานวิจัยแรกที่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟโตพลาสมา SCGS (ภาพที่ 5) ทั้งนี้ความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์เหล่านี้อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความรุนแรงและการแสดงอาการโรคที่แตกต่างกันได้

```

KAL001      GTCGTAACAAG-TATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATA 59
KAL002      GTCGTAACAAG-TATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATA 59
KAL004      GTCGTAACAAG-TATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATA 59
KAL009      GTCGTAACAAG-TATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATA 59
CHO91-SCWL  GTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATA 60
SAK12-SCGS  GTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAA-TA 59
*****

KAL001      ATTTTTTAAATATTCATCTTCAGTTTGTGAAAGACTTAGTTCCTTATAAGTTTTTCTTTTTT 119
KAL002      ATTTTTTAAATATTCATCTTCAGTTTGTGAAAGACTTAGTTCCTTATAAGTTTTTCTTTTTT 119
KAL004      ATTTTTTAAATATTCATCTTCAGTTTGTGAAAGACTTAGTTCCTTATAAGTTTTTCTTTTTT 119
KAL009      ATTTTTTAAATATTCATCTTCAGTTTGTGAAAGACTTAGTTCCTTATAAGTTTTTCTTTTTT 119
CHO91-SCWL  ATTTTTTAAATATTCATCTTCAGTTTGTGAAAGACTTAGTTCCTTATAAGTTTTTCTTTTTT 120
SAK12-SCGS  ATTTTTTAAATATTCATCTTCAGTTTGTGAAAGACTTAGTTCCTTATAAGTTTTTCTTTTTT 119
*****

KAL001      AAGGAAAAGAAAAATGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAAGCGTGAG 179
KAL002      AAGGAAAAGAAAAATGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAAGCGTGAG 179
KAL004      AAGGAAAAGAAAAATGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAAGCGTGAG 179
KAL009      AAGGAAAAGAAAAATGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAAGCGTGAG 179
CHO91-SCWL  AAGGAAAAGAAAAATGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAAGCGTGAG 180
SAK12-SCGS  AAGGAAAAGAAAAATGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAAGCGTGAG 179
*****

KAL001      GTCGATGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCA 210
KAL002      GTCGATGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCA 210
KAL004      GTCGATGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCA 210
KAL009      GTCGATGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCA 210

```

ภาพที่ 4 การจัดเรียงลำดับเบสของยีน 16S-23S rDNA บริเวณ 16S-ITS ขนาดขึ้นดีเอ็นเอ 210 bp แสดงจุดที่เกิด deletion mutation ของเบส G ที่ตำแหน่ง 12 ในตัวอย่างหมายเลข KAL001, 002, 004, 009 เทียบกับลำดับเบสของตัวอย่าง หมายเลข CHO91 ที่เป็น SCWL และ SAK12 ที่เป็น SGCS

```

PJ002-SCGS  GTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAA-TA 59
KHO01-SCWL  GTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATA 60
SUK262-SCGGS GTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAATA 60
*****

PJ002-SCGS  ATTTTTTAAATATTCATCTTCAGTTTGTGAAAGACTTAGTTCCTTATAAGTTTTTCTTTTTT 119
KHO01-SCWL  ATTTTTTAAATATTCATCTTCAGTTTGTGAAAGACTTAGTTCCTTATAAGTTTTTCTTTTTT 120
SUK262-SCGGS ATTTTTTAAATATTCATCTTCAGTTTGTGAAAGACTTAGTTCCTTATAAGTTTTTCTTTTTT 120
*****

PJ002-SCGS  AAGGAAAAGAAAA-TGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAAGCGTGA 178
KHO01-SCWL  AAGGAAAAGAAAA-TGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAAGCGTGA 179
SUK262-SCGGS AAGGAAAAGAAAAATGGGCCTATAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAAGCGTGA 180
*****

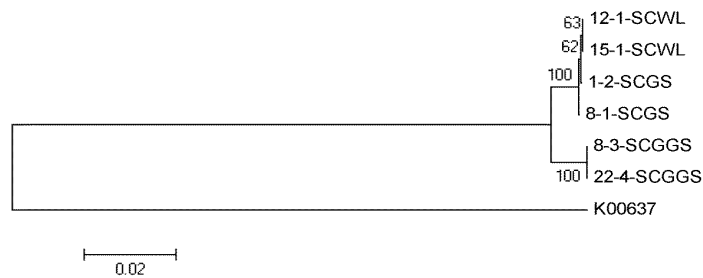
PJ002-SCGS  GTCGATGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCA 210
KHO01-SCWL  GTCGATGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCA 211
SUK262-SCGGS GTCGATGGTTCAAGTCCATTTAGGCCACCA 212
*****

```

ภาพที่ 5 การจัดเรียงลำดับเบสของยีน 16S-23S rDNA บริเวณ 16S-ITS ขนาดขึ้นดีเอ็นเอ 210 bp ของตัวอย่าง SCGS, SCWL และ SCGGS แสดงตำแหน่ง substitution mutation ของเบส A และ T ที่ตำแหน่ง 72 และ insertion mutation ของเบส A ที่ตำแหน่ง 134 ในตัวอย่าง SCGS (PJ002) และตัวอย่าง SCWL (KH001) เปรียบเทียบกับ SCGS (SUK262).

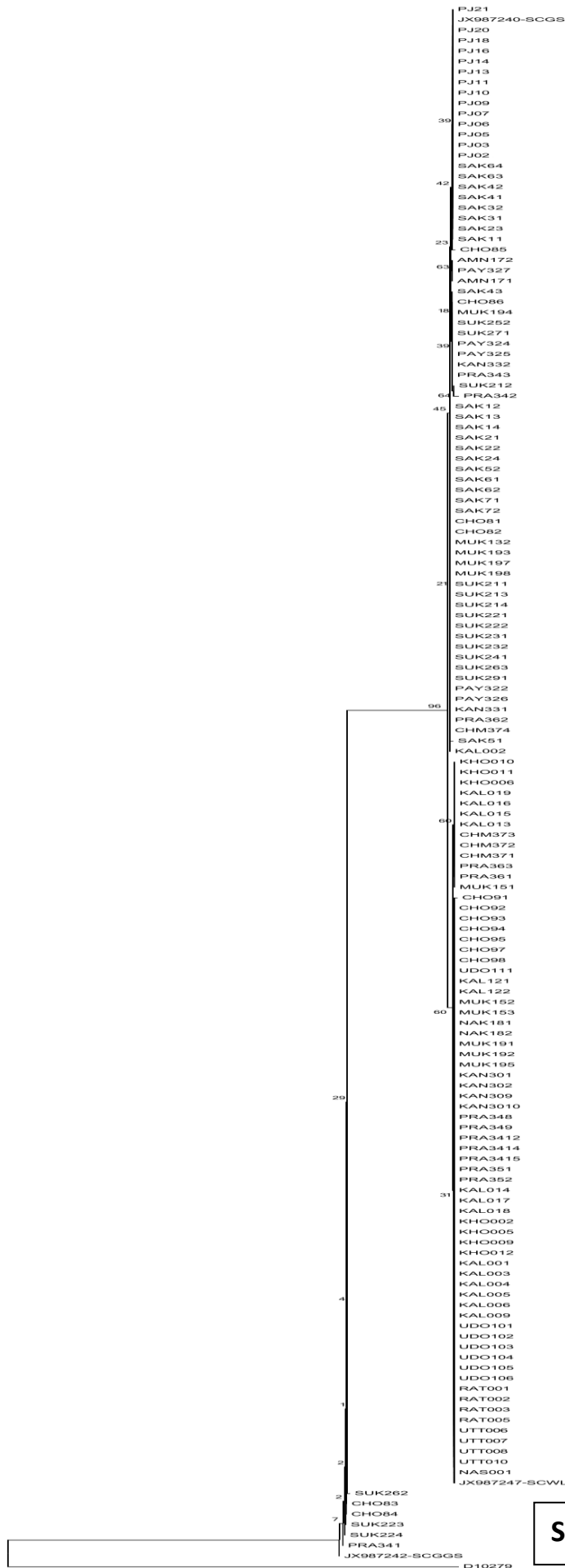
การขยายความยาวสายดีเอ็นเอตำแหน่ง 16S-23S rDNA ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ใหม่จำนวน 4 คู่ ให้มีความยาวขึ้นจากเดิม 210 bp ที่ครอบคลุมเพียงบางส่วนของ 16S ถึงบางส่วนของ ITS ให้เป็น 1770-1772 bp ที่ครอบคลุมตั้งแต่ 16S ส่วนต้น ผ่าน ITS ไปยังบางส่วนของ 23S เมื่อทำการทดสอบในตัวอย่าง อากาเร SCWL, SCGS, SCGGS และหญ้าอากาเรใบขาวบางตัวอย่างจำนวน 7 ตัวอย่าง และศึกษาลำดับนิวคลี

โอไทด์ พบว่ายังคงแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มเช่นเดิม คือ 1) กลุ่มอ้อยอาการ SCWL และ SCGS 2) กลุ่มอ้อยอาการ SCGGS และ 3) กลุ่มหญ้าอาการใบขาว โดยกลุ่มที่ 1 พบความแตกต่างระหว่าง SCWL และ SCGS ได้เช่นกัน แต่ค่อนข้างใกล้เคียงกันมากเช่นเดิม (ภาพที่ 6) แสดงว่าเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีความใกล้เคียงกันมาก ส่วน SCGGS อาจจัดให้เป็นเชื้อชนิดใหม่ได้ เนื่องจากลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากทั้ง 2 ชนิดนี้อย่างชัดเจน รวมทั้งอาการของอ้อยที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ยังขาดการตรวจแมลงพาหะดังกล่าวแล้วข้างต้น



ภาพที่ 6 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์จากค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ของไฟโตพลาสมาชนิด Sugarcane white leaf (SCWL), sugarcane grassy shoot (SCGS) และ Sugarcane green grassy shoot (SCGGS) ขนาดความยาว 1770-1772 bp ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.1 และใช้ K00637 (*Bacillus subtilis* W168) เป็น out group ในการเปรียบเทียบ ตัวเลขที่ตำแหน่งแยกกิ่งแสดงถึงเปอร์เซ็นต์ความซ้ำจากการทดสอบ Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ

ความแตกต่างของเชื้อจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ *secA* gene : ผลจากการวิเคราะห์ลำดับเบสของ *secA* gene ใน 170 ตัวอย่างที่สำรวจได้จากแหล่งปลูกต่างๆ 15 จังหวัด และนำมาจัดเรียงแสดงความแตกต่าง พบว่า SCWL และ SCGS ยังอยู่ในกลุ่มใหญ่เดียวกัน แสดงถึงความใกล้เคียงกัน ในขณะที่ SCGGS แยกกลุ่มชัดเจน สอดคล้องกับผลการตรวจด้วย 16S-23S rDNA (ภาพที่ 7) การแยกกลุ่มด้วย *secA* พบว่ามีการจัดกลุ่มตามอาการที่แสดงออก ในกลุ่มตัวอย่างที่พบอาการใบขาว และกอตะไคร้ใบขาวมักพบในบริเวณภาคอีสานและเหนือตอนล่าง ส่วนตัวอย่างกอตะไคร้พบในตัวอย่างจากสุโขทัย ในกลุ่มใบขาวพบความแปรปรวนของ *secA* ระดับต่ำ (1-3 เบส) ในกลุ่มใบขาวกอตะไคร้พบ (1-5 เบส) ส่วนกอตะไคร้นั้นพบว่ามีลำดับเบสแตกต่างจากทั้งใบขาวและใบขาวกอตะไคร้ มากจึงทำให้แยกกลุ่มอย่างชัดเจน การตรวจลำดับเบสของ *secA* gene ในตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดชลบุรีและสระแก้ว พบว่ามีความแตกต่างกัน โดยบางตัวอย่างที่แตกต่างกันด้วย *secA* นี้ พบว่าในตำแหน่ง 16S-23S ITS ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า *secA* gene มีความละเอียดมากกว่า สามารถจำแนกความแตกต่างได้มากกว่าตำแหน่ง 16S-23S ITS ที่นิยมใช้เดิม (ตารางที่ 1)



SCGS

SCWL

SCGGS

ภาพที่ 7 Phylogenetic tree สร้างจาก Neighbor-joining ที่ได้จากการจำแนกความแตกต่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secA* ของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 275 bp จากอ้อย 170 ตัวอย่าง เทียบกับข้อมูลลำดับเบสใน NCBI : JX987240-SCGS (sugarcane grassy shoot), JX987247-SCWL (sugarcane white leaf), JX987242-SCGGS (sugarcane green grassy shoot) และ D10279 (*Bacillus subtilis* W168)

ตารางที่ 1 ตำแหน่งเบส (Nt. pos.) ของยีน 16S-23S ITS และ *secA* gene ที่แสดงความแปรปรวน

SCWL : Sugarcane white leaf phytoplasma; SCGS : Sugarcane grassy shoot phytoplasma ; SCGGS :

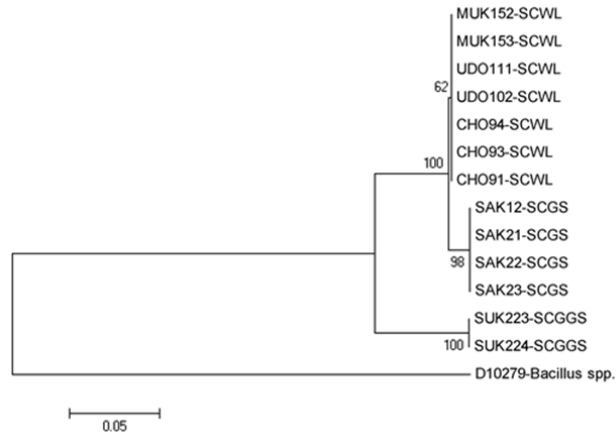
Sugarcane green grassy shoot phytoplasma

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

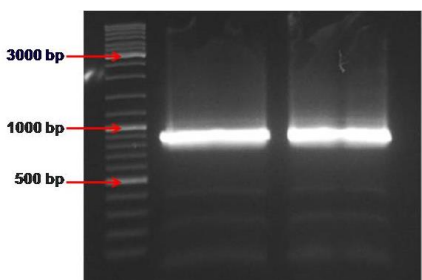
<i>secA</i> Nt. pos.	12	30	32	68	69	70	73	79	82	85	97	103	109	115	121
CHO91-1 SCWL	G	A	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	T	C	C
KAL001-2 SCWL	A	A	A	G	C	T	T	T	A	G	G	G	T	C	C
SAK12-1 SCGS	A	A	A	G	C	T	T	T	A	G	G	A	T	C	C
CHO83-1 SCGGS	A	G	G	A	A	C	C	C	G	A	A	A	A	A	T

การเพิ่มความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ *secA* จาก 275 bp เป็น 377 bp พบความแปรปรวนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิดนี้เป็นจำนวน 31 ตำแหน่ง กระจายในลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นความแปรปรวนชนิด substitution mutation ในขณะที่ระหว่าง SCWL กับ SCGS พบตำแหน่งที่มีความแปรปรวน 5 ตำแหน่ง ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า SCWL และ SCGS อยู่ในกลุ่มเดียวกันเช่นเดียวกับการเปรียบเทียบด้วย 16S-23S rDNA (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 8 Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์จากค่าความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *secA* gene ของไฟโตพลาสมาชนิด sugarcane white leaf (SCWL), sugarcane grassy shoot (SCGS) และ Sugarcane green grassy shoot (SCGGS) ขนาดความยาว 377 bp ด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้โปรแกรม MEGA version 5.1 และใช้ D10279 (*Bacillus* spp.) เป็น out group ในการเปรียบเทียบ ตัวเลขที่ตำแหน่งแยกกิ่ง แสดงถึงเปอร์เซ็นต์ความซ้ำจากการทดสอบ Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ

ความแตกต่างของเชื้อจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ *secY* และ *imp* genes : *secY* เป็นโปรตีนที่ทำงานร่วมกับ *secA* และโปรตีนกลุ่ม *sec* system อื่นอีก (*secYEG*) ที่ทำหน้าที่ในการส่งออกสารคัดหลั่งจากไฟโตพลาสมาสู่เซลล์เจ้าบ้าน ส่วน *imp* เป็นโปรตีนที่พบว่ามีความจำเพาะต่อแมลงนำโรค แต่จากผลของความพยายามในการตรวจวิเคราะห์ *secY* โดยการทดลองใช้ไพรเมอร์หลายคู่พบว่ายังไม่ประสบผลสำเร็จ โดยชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้ตรงกับส่วนของอ้อย (*Saccharum* hybrid cultivar BAC clone sh 197G04,cv R570) อีกทั้งไม่มีรายงานยีนทั้งสองชนิดนี้ในอ้อย ทำให้ต้องใช้ฐานข้อมูลยีนจากพืชชนิดอื่น จึงทำให้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ไม่มีความจำเพาะต่อพืช ส่วนการพัฒนาเทคนิคการตรวจ *imp* gene นั้น พบว่าไพรเมอร์ชุดจาก Dr. Kawizawa สามารถเพิ่มปริมาณยีนนี้ได้สำเร็จในช่วงปี 2558 ตัวอย่างอ้อยใบขาวชนิด SCWL ด้วย nested-PCR โดยมีขนาดยีนที่ได้ประมาณ 700 bp (ภาพที่ 9) ทั้งนี้ยังไม่ได้ทำการศึกษาลำดับเบสของยีนนี้ในตัวอย่างที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆ ซึ่งจะดำเนินการในลำดับต่อไป เนื่องจากเป็นยีนที่มีความสำคัญต่อการศึกษานิชของแมลงที่เป็นพาหะนำโรคใบขาวทั้ง 3 ชนิด



ภาพที่ 8 ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ *imp* gene ในตัวอย่าง SCWL ในใบอ้อย

การพัฒนาเครื่องหมายสำหรับยีนอื่น : นอกจากกลุ่ม *sec gene* และ *imp gene* แล้ว ในงานวิจัยนี้ ได้ทดลองวิธีการตรวจสอบความแตกต่างทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคในอ้อยใน แหล่งระบาดต่างๆ ด้วยยีนในกลุ่มอื่น ได้แก่ *Tuf gene* (elongation factor-tu) ที่พบในแบคทีเรียหลายชนิด และ *GroEL gene* ซึ่งเป็นยีนในกลุ่ม chaperonin จากการสืบค้นข้อมูล พบว่ายังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนเหล่านี้ในเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อย การทดลองออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาอื่นๆ เป็นต้นแบบ พบว่ายังไม่ประสบความสำเร็จ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การจัดกลุ่มโรคใบขาวด้วย 16S-23S rDNA และ *secA gene* ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่สอดคล้องกับชนิดของเชื้อในพืช และอาการหลัก คือ กลุ่มเชื้อในอ้อย และกลุ่มเชื้อในหญ้า เชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวชนิด SCWL และ SCGS พบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก ไม่ว่าจะแยกด้วยวิธีการใด ในขณะที่เชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยชนิด SCGGS มีความแตกต่างจาก 2 ชนิดนี้อย่างชัดเจน ทั้งนี้สามารถจัดเป็นกลุ่มใหม่ได้เนื่องจากอาการของโรคที่ไม่แสดงอาการใบขาว เชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในพืชอาศัยเช่น หญ้าซึ่งถูกจัดเป็นเชื้อที่แตกต่างออกไป อาจไม่สามารถถ่ายทอดสู่อ้อยได้ แต่ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงแมลงพาหะ อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ สามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาชนิด SCWL ในหญ้าได้ แต่มีเพียง 2 ตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งไม่ได้มีการแสดงผลในรายงานนี้ เนื่องจากต้องทำการศึกษาลำต้นและสำรวจตัวอย่างเพิ่มเพื่อยืนยันผล

การจำแนกความแตกต่างของเชื้อด้วยยีน *secA* มีความละเอียด (resolution) ที่สูงกว่าการแยกด้วย 16S-23S rDNA เนื่องจากสามารถตรวจพบความแปรปรวนของเบสมากกว่า แต่อย่างไรก็ตามจุดที่แสดงความแปรปรวนของเบสภายในยีน *secA* ค่อนข้างกระจุกกระจายทั่วทั้งสาย ซึ่งจะส่งผลต่อการออกแบบไพรเมอร์เพื่อหาตำแหน่งในการสร้างเครื่องหมายโมเลกุลที่ใช้ในการตรวจจับยีนนี้

การตรวจหายีน *secY*, *GroEL* และ *Tuf gene* ยังไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากยังไม่มีรายงานในฐานข้อมูล การตรวจยีนในกลุ่ม *secYEB* มีความสำคัญต่อการตรวจแยกชนิดของเชื้อในอ้อย ซึ่งอาจจะนำไปใช้ตรวจชนิดของเชื้อในพืชอาศัยได้ ในขณะที่ยีน *imp* จะทำให้สามารถขยายผลไปยังการหาแมลงพาหะของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยได้

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ให้ระบุผลงานที่สิ้นสุด ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร พัฒนาต่อ หรือถ่ายทอด หรือเผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย (ระบุเป็นข้อๆ)

10.1 เป็นข้อมูลประกอบในผลงานวิจัยดีเด่นของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2558

10.2 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการฝึกอบรมนักวิชาการ สวพ. 3 เรื่องการจัดทำแปลงพันธุ์ อ้อยสะอาด วันที่ 11 มีนาคม 2558

10.3 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการฝึกอบรมนักวิชาการและเกษตรกร หลักสูตร การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อยโรงงาน จำนวน 2 รุ่น ระหว่างวันที่ 9-11 มิถุนายน 2558 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ ขอนแก่น และ วันที่ 23-25 มิถุนายน 2558 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี

10.4 ถ่ายทอดข้อมูลบางส่วนในรายการ ก้าวไกลกับกรมวิชาการเกษตร เรื่องโรคใบขาวของอ้อย ออกอากาศทางโทรทัศน์ ینگประมาณ 2558

10.5 ถ่ายทอดข้อมูลบางส่วน เรื่องโรคใบขาวของอ้อย ออกอากาศทางวิทยุ ینگประมาณ 2558

10.6 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการแสดงโปสเตอร์ความรู้เรื่องโรคใบขาวในอ้อย ในงานเปิดบ้านกรม วิชาการเกษตร ینگประมาณ 2558

10.7 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการแสดงโปสเตอร์ความรู้เรื่องโรคใบขาวในอ้อย ให้แก่เกษตรกรจากแหล่ง ต่างๆ ที่มาดูงานที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ینگประมาณ 2558

10.8 แลกผลงานในงานประชุมอ้อยแห่งชาติ ประจำปี 2555 ณ โรงแรมเซนทารา จ. ขอนแก่น และ ตีพิมพ์ผลงานในวารสารแก่นเกษตร (Khon Kaen Agr.J. 40 Supplement 3 : 231-240 (2012))

10.9 แลกผลงานในการประชุมร่วมระหว่าง JIRCAS-KKU-KKFCRC ในวันที่ 19 ธันวาคม 2556 เรื่อง development of quantitative method of SCWL by realtime PCR ณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

10.10 แลกผลงานและตีพิมพ์ในงานประชุม International Society of Sugarcane technology (ISSCT) 2013 ใน Congress Proceeding : BP27 Sugarcane white leaf and Sugarcane Grassy Shoot Diseases in Thailand and Their Detection Methods. ณ ประเทศบราซิล

10.11 เผยแพร่ลำดับเบสของ SCWL, SCGS และ SCGGS ของยีนตำแหน่ง 16S-23S rDNA และ secA ในฐานข้อมูล NCBI

11. คำขอขอบคุณ : ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยทุกคนที่ช่วยให้การดำเนินงานประสบความสำเร็จด้วยดี
ขอขอบคุณ JIRCAS : Mr. Ando Shataro, Dr. Kawabe, Dr. Kobori Youishi, Mr. Yoshifumi Terajima ที่ให้
การสนับสนุน และขอขอบคุณ Dr. Shigeyuki Kakizawa จาก National Institute of Advanced Industrial
Science and Technology (AIST), Bioproduction Research Institute ประเทศญี่ปุ่น ที่ให้คำปรึกษาและ
ออกแบบไพรเมอร์ imp gene ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา

12. เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ
มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา. ขอนแก่น. 219 หน้า

รุ่งโรจน์ อุทพันธ์. 2543. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อย
และหญ้าบางชนิดในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศุภรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ชัชชัย ตะขากวีวัฒนา, วันเพ็ญ ศรีทองชัย, ทักษิณา ศันสยะวิชัย, สุนี ศรีสิงห์ 2552
ก. การโคลนนิ่งโมโนโคลนาล์นยีนส์จากบีเซลล์ที่สร้างแอนติบอดีต่อเชื้อไฟโตพลาสมาเพื่อพัฒนาชุด
ตรวจสอบโรคใบขาวในอ้อย. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็มประจำปี 2552 ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น
กรมวิชาการเกษตร

ศุภรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ทักษิณา ศันสยะวิชัย, สุนี ศรีสิงห์. 2552ข. การตรวจสอบความแตกต่างของเชื้อไฟ
โตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยและ host อื่นจากแหล่งระบาดต่างๆ. รายงานความก้าวหน้า
โครงการวิจัยปีงบประมาณ 2552 รอบ 9 เดือน กรมวิชาการเกษตร.

Economou, E. 1999. Following the leader : Bacterial protein export to through the Sec pathway. Trends
Microbiol. 7: 315-320.

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.
- Lee, I.-M., M. Pastore, M. Vibio, A. Danielli, S. Attathom, R.E. Davis and A. Bertaccini. 1997. Detection and characterization of a phytoplasma associated with annual blue grass (*Poa annua*) white leaf disease in southern Italy. *Eur J Plant Pathol* 103, 251–254.
- Lee, I-M., K.D. Bottner-Parker, Y. ZHAO, R.E. Davis, N.A. Harrison. 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *Int.J.of Syst. and Evol. Microbiol.*, 60: 2887-2897.
- 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 Biotec.* 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
- Rao, G.P., S. Srivastava, P.S. Gupta, S.R. Sharma, A. Singh, S. Singh, M. Singh and C. Marone. 2008. Detection of sugarcane grassy shoot phytoplasma infecting sugarcane in India and its phylogenetic relationships to closely related phytoplasmas. *Sugar tech* 10(1):74-80.
- Sdoodee, R., B. Schneider, A.C. Padovan, and K.S. Gibb. 1999. Detection and genetic relatedness of phytoplasma associated with plant diseases in Thailand. *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* 3(2):133-140.
- 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.
- 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.

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.

Wongkaew, P., Y. Hanboonsong, P. Sirithorn, C. Choosai, S. Boonkrong, T. Tinnangwattana, R. Kitchareonpanya, and S. Damak. 1997. Differentiation of phytoplasmas associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing. *Theo.and Appl. Genet.* 95: 660-663.