

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

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

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : 3.12 การตรวจความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวด้วยเทคนิค High Resolution Melting (HRM)

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Identification of Phytoplasma Causing Sugarcane Diseases by High-Resolution Melting (HRM)

4. คณะผู้ดำเนินงาน

| | |
|-----------------|--|
| หัวหน้าการทดลอง | นางสาวศุจิรัตน์ สวงนรังศิริกุล ¹ |
| ผู้ร่วมงาน | นางทักษิณา ศันสยะวิชัย ¹ นางสาวสุนิ ศรีสิ่งหี ² นายธีรวุฒิ วงศ์วัฒน์ ¹ |

5. บทคัดย่อ

เชื้อไฟโตพลาสมาเป็นสาเหตุที่สำคัญของโรคในอ้อย ผลของการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา และการสร้าง Phylogenetic tree พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาที่ได้จากการสำรวจแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับความแตกต่างอาการของโรคที่ปรากฏ เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคใบขาวและโรคกอฝอย มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันที่ระดับ 99 % ในขณะที่เชื้อสาเหตุของโรคกอตะไคร้ มีค่าความเหมือนกับโรคใบขาวและกอฝอยที่ระดับ 85-86% ซึ่งอาจจัดเป็น subgroup ชนิดใหม่ของกลุ่ม 16SrXI group หรืออาจเป็นกลุ่มใหม่ซึ่งต้องพิสูจน์ต่อไป การพัฒนาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อการตรวจจับความแตกต่างของจีโนมไทป์ของ SNP จำนวน 2 ตำแหน่งคือ A254G, T245C ด้วยวิธี HRM พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 3 กลุ่มตามลักษณะอาการอย่างชัดเจน เทคนิคนี้จึงสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาและระบุชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ในตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยด้านการติดเชื้อมาตรฐาน และการศึกษาแมลงนำโรค เพื่อหาแนวทางลดการระบาดของโรคอ้อยที่มีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา

ABSTRACT

Phytoplasma is the causative agent of sugarcane diseases. The study of 16S rDNA gene nucleotide sequences and phylogenetic analysis of infected sugarcane samples collected from various planting areas throughout Thailand revealed correlation with different symptoms. The nucleotide

sequences of sugarcane white leaf disease (SCWL) and sugarcane grassy shoot disease (SCGS) showed 99% similarity, while the sugarcane green grassy shoot disease (SCGGS) had 85-86% similarity. That can probably be classified as new subgroup of 16SrXI or new 16S rDNA group; which remains one topic for future research. In this study, a specific primer set is developed for a HRM-based method for sugarcane phytoplasma genotyping. Two Single nucleotide polymorphisms (SNPs), A254G, T245C, were used and SCWL, SCGS and SCGGS disease were clearly separated. The asymptomatic samples of infected sugarcane were also detectable by this approach. The HRM technique provides great advantage for the studying of the cross species infection, transmission vectors and relevant areas that lead to the reduction of the devastation cause by phytoplasma infection.

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี

6. คำนำ

เชื้อไฟโตพลาสมาเป็นแบคทีเรียชนิดที่ไม่มีผนังเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคพืชมากกว่า 300 ชนิดที่ได้รับการพิสูจน์และยืนยันการตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาแล้ว (Seemüller *et al.*, 1994) รวมทั้งโรคพืชที่สำคัญของอ้อย คือโรคใบขาว (Sugarcane white leaf; SCWL) เชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุของโรคอ้อย จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrXI group, subgroup B อาศัยอยู่ในท่อน้ำลายของแมลงปากดูด หรือในท่อน้ำเลี้ยงอาหารของพืชที่ติดเชื้อ การระบาดของเชื้อจากต้นสู่ต้นเกิดจากมีเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) (Chen, 1978) และ *Yamatotettix flavovitatus* (ยุพา และคณะ, 2548) เป็นแมลงพาหะ แต่ปัญหาส่วนใหญ่เกิดจากการปลูกหรือการขยายต้นอ้อยโดยใช้ท่อนพันธุ์ที่มีปริมาณเชื้อในปริมาณสูง

ในประเทศไทย โรคอ้อยที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา ได้แก่ 1) โรคใบขาวในอ้อย (Sugarcane white leaf; SCWL) มีลักษณะอาการที่พบได้แก่ อาการใบขาว (white leaf; WL) และอาการกอฝอย (grassy shoot; GS) 2) โรคกอตะไคร้ ซึ่งอ้อยจะแสดงอาการคล้ายกอตะไคร้ (green grassy shoot; SCGGS) (Wongwarat, 2012) จากการสำรวจโรคใบขาวของอ้อยตามพื้นที่ต่างๆ และนำแต่ละไอโซเลทมาหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าแต่ละไอโซเลทมีความเหมือนกัน 99-100% (สุภาพร และ คณินันต์, 2551) ในขณะที่มีการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S intergenic spacer region (ITS) ระหว่างจีเอ็นเอของ SCWL และ SCGS พบว่ามีความแปรปรวนชนิดการแทนที่เบส (Base substitution) ของลำดับ นิวคลีโอไทด์ (Sakuanrungrasirikul *et al.*, 2012) แต่จากการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ด้วยใช้ข้อมูล ITS นั้นพบว่าจีเอ็นเอจาก SCWL และ SCGS มีความเหมือนกัน จนไม่สามารถแยกออกเป็นกลุ่มได้ ตรงข้ามกับ SCGGS ถูกแยกออกมาเป็นอีกกลุ่มอย่างชัดเจน (Wongwarat, 2012, Sakuanrungrasirikul *et al.*, 2012) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาข้อมูลลำดับนิ

วคลิโอดีของยีน 16S-23S rDNA ทั้งสาย และนำข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมนี้ที่อาจมีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียงนิวคลีโอไทด์เดียว แต่มีผลต่อฟีโนไทป์ หรือ สนิป (single nucleotide polymorphism, SNP) มาพัฒนาเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสนิป ร่วมกับการใช้เทคนิคการวิเคราะห์ค่าการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (high-resolution melting analysis; HRM) ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถใช้ตรวจสอบความผิดปกติของยีน และใช้หาจีโนมไทป์ของยีนของเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งเป็นประโยชน์ในการจำแนกกลุ่มอาการของโรค ในต้นอ้อยที่ไม่แสดงอาการ และเพื่อหาแนวทางลดการระบาดของโรคอ้อยที่มีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา

7. วิธีดำเนินการ

1. การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่ออ้อย

1.1 เก็บตัวอย่างอ้อยสำหรับใช้เป็นตัวอย่างมาตรฐาน ได้แก่อ้อยที่แสดงอาการใบขาว, ใบขาวกอลอย และกอลอยโคร จากพื้นที่ปลูกอ้อยจำนวนอาการละ 10 ตัวอย่าง จากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย

1.2 เก็บตัวอย่างอ้อยสำหรับการทดสอบ ได้แก่อ้อยที่ไม่แสดงอาการ โรคอ้อยจำนวน 30 ตัวอย่าง จากภูมิภาคต่างๆของประเทศไทย

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อใบอ้อยจาก 1.1 และ 1.2 จำนวนตัวอย่างละ 3 กรัมใส่ลงโกร่งแล้วเติมไนโตรเจนเหลวจากนั้นบดให้ละเอียดเป็นผงใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเอของ Li and Midmore (1999) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง nanodrop spectrophotometer (Maestrogen, Taiwan)

2. การสร้าง Phylogenetic tree

2.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S-23S rDNA

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา Acc. No. AB741630 จากฐานข้อมูล NCBI เป็นต้นแบบสำหรับการออกแบบไพรเมอร์ ได้ไพรเมอร์จำนวน 4 คู่ได้แก่ 16S-23S F1/R1, 16S-23S F2/R2, 16S-23S F3/R3, 16S-23S F4/R4 ได้ความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น 498, 676, 381, 575 bp ตามลำดับ

2.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และการส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยแต่ละปฏิกิริยามีปริมาตรสุทธิ 15 μ l มีความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนผสมดังนี้ 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA), 0.34 μ M Primer และ 20 ng/ μ l สารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ แล้วนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Perkin Elmer PE 9700 Thermo Cycler, USA) มีขั้นตอนดังนี้ Pre-denaturing 94 °C นาน 5 นาที, denaturing 94 °C นาน 40 วินาที, annealing 52 °C นาน 40 วินาที, extension 72 °C นาน 1 นาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 35 รอบ) และ final extension 72 °C นาน 7 นาที นำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis และนำมาทำให้ผลผลิต PCR บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (RBCBioscience, Taiwan) ส่งผลผลิต PCR บริสุทธิ์ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดย Solegent (Korea)

2.3 การสร้าง Phylogenetic tree

ทำการจัดลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ถูกต้องด้วยโปรแกรม BioEdit และ Clustal W จากนั้นทำการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA ver. 5.05 ด้วยวิธี Neighbor-Joining โดยใช้โมเดล Kimura 2-parameter ด้วยการสุ่มข้อมูล (bootstrap) จำนวน 1,000 ครั้ง

3. การวิเคราะห์ SNP ด้วยวิธี High-resolution melting (HRM)

3.1 ออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจหา SNP

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างแต่ละอาการนั้น มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม Clustal W ทำการออกแบบไพรเมอร์ครอบคลุมบริเวณตำแหน่ง SNP ได้เป็นชุดไพรเมอร์ Phyto7-1 F/R

3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR และการวิเคราะห์ HRM

นำสารละลายดีเอ็นเอ (20 ng/ μ l) ที่สกัดได้ มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 16S-23S F1/R1 ทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามข้อ 2.2 จากนั้น นำผลผลิตที่ได้มาเจือจางอัตราส่วน 1:200 สำหรับเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำ nested-PCR ปริมาตรสุทธิ 15 μ l ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้ 1X PCR buffer, 2.0 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA) 0.2 μ M Phyto7 F/R และ 3.34 μ M Syto9 dye

วิเคราะห์ค่าการคลายเกลียวของสายดีเอ็นเอ (melting temperature; T_m) ที่ติดตั้งอยู่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (LightCycler[®] 480 Real-time PCR, Roche, Germany) มีขั้นตอนดังนี้ initial-denaturing 94°C นาน 5 นาที, denaturing 94°C นาน 30 วินาที, annealing 64°C นาน 30 วินาที, extension 72°C นาน 40 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 40 รอบ) จากนั้นทำการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 65°C ถึง 95°C โดยเพิ่ม 0.03°C/วินาที เมื่อสิ้นสุดให้ลดอุณหภูมิลงที่ 40°C นาน 30 วินาที วิเคราะห์ melting peak ด้วยโปรแกรม T_m calling และสร้าง Normalized melting curves โดยโปรแกรม Gene Scanning 1.5.0 (Roche Diagnostics, Germany)

เวลาและสถานที่ : ระยะเวลา 2557-2558 สถานที่ดำเนินการ : ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การจัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างอ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา และแสดงอาการของโรคได้แก่ 1) อาการใบขาว ลักษณะเด่นคือ ใบอ้อยมีสีขาว, ขาวปนเหลือง, เหลืองอ่อน หรือเขียวปนขาว พบได้ทั้งจากอ้อยที่เจริญเป็นลำแล้ว และหน่ออ้อยที่เพิ่งแตกออกมาใหม่ 2) อาการกอลฝอย ลักษณะเด่นคือมีการแตกหน่อเร็ว และมากกว่าปกติ ใบแคบเรียว ใบมีสีขาว, ขาวปนเหลือง, เหลืองอ่อน 3) อาการกอลตะไคร้ ลักษณะเด่นคือมีการแตกหน่อเร็ว และแตกมากกว่าปกติ หน่อไม่เจริญเป็นลำ ใบแคบเรียว ใบมีสีเขียวปกติ

จากการทำปฏิกิริยา PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความยาวของเชื้อไฟโตพลาสมาจากตัวอย่างโรคใบขาว, กอฝอย และกอตะไคร้ เท่ากับ 1770, 1771 และ 1772 bp ตามลำดับ เมื่อนำมาสร้าง Phylogenetic tree (Figure 1) พบว่าสามารถจัดกลุ่มตัวอย่างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว และกอฝอย กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคกอตะไคร้ เมื่อพิจารณาค่าความเหมือน (% similarity) พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวและโรคกอฝอย มีระดับความเหมือนกัน 99% ในขณะที่เชื้อไฟโตพลาสมาโรคกอตะไคร้ มีความเหมือนกันกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวและกอฝอย ที่ระดับ 85-86% ตามลำดับ จึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อไฟโตพลาสมาโรคกอตะไคร้อาจเป็น subgroup ใหม่ของกลุ่ม 16SrXI group (*Candidatus* Phytoplasma oryzae; Rice yellow dwarf group) หรืออาจเป็นกลุ่มใหม่ของ 16Sr group ซึ่งต้องทำการพิสูจน์ต่อไป

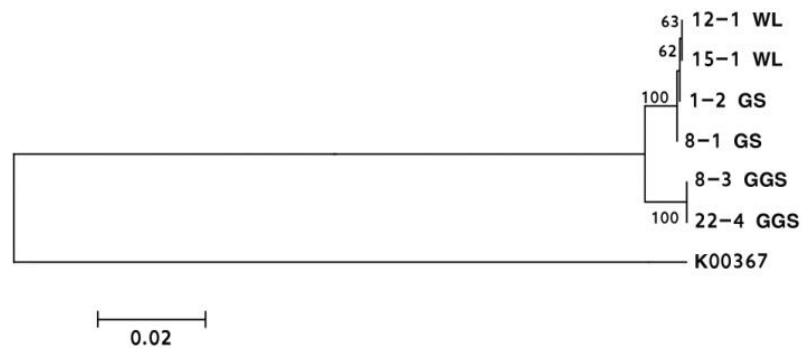


Figure 1 Phylogenetic tree constructed by the Neighbor-Joining method of 16S-23S rDNA sequences from phytoplasma in sugarcane leaf samples showing symptoms of white leaf (WL), grassy shoot (GS) and green grassy shoot (GGS). *Bacillus sp.* (K00367) used as the outgroup. Numbers on the branches are confidence values obtained for 1,000 replication. The bar represents a phylogenetic distance of 1%.

2. การจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี HRM

จากการตรวจสอบความแปรปรวนของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวและกอฝอย พบตำแหน่ง SNP คือ A254G ซึ่งมีผลทำให้การแปลรหัสพันธุกรรมเป็นกรดอะมิโนเปลี่ยนจากไลซีนเป็นอาร์จินีน ในขณะที่เชื้อไฟโตพลาสมาโรคกอตะไคร้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากเชื้อใบขาวกับกอฝอย ที่ตำแหน่ง T245C ซึ่งมีผลทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งนี้เปลี่ยนจากแอสปาร์ทิกเป็นอะลานีน การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้เป็นผลมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไป ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมีผลทำให้ลำดับและชนิดของกรดอะมิโนเปลี่ยนไป ส่งผลต่อสมบัติของโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นแตกต่างไปจากเดิม

ผลการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้ครอบคลุมกับตำแหน่ง SNP จากตัวอย่างจำนวน 38 ตัวอย่าง มีทั้งแสดงและไม่แสดงอาการจากการติดเชื้อ นำผลผลิต PCR มาวิเคราะห์ค่าการกลายเกลียว

ของสายดีเอ็นเอ (melting temperature; Tm) ด้วยโปรแกรม Tm calling (Figure 2 a) ได้ค่าเฉลี่ย Tm ของกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาว, กอฝอย และกอตะไคร้ เป็น 80.30, 80.75 และ 79.92°C ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกันมากจนแยกไม่ออก

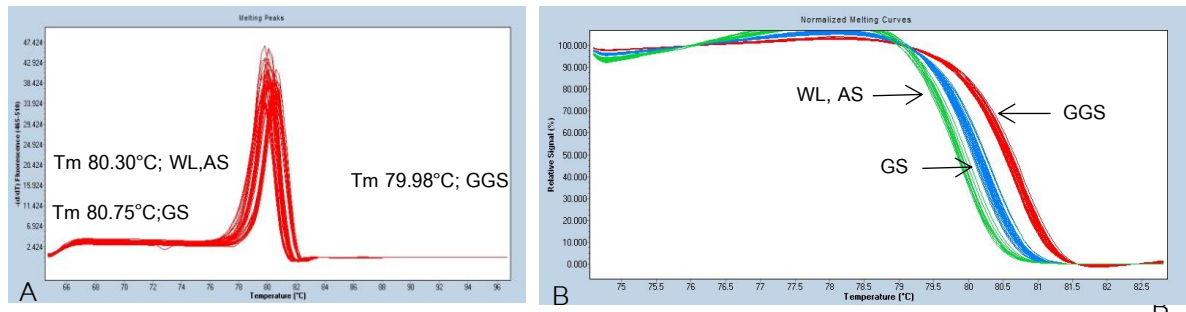


Figure 2 (A) Melting curve analysis of real-time PCR amplification products. The sugarcane white leaf (WL), sugarcane grassy shoot (GS) and sugarcane green grassy shoot (GGS) peaks showed 80.30°C, 80.75°C and 79.98°C, respectively. (B) Normalized Melting curve analysis of PCR amplicon of the 16S-23S rRNA from different symptomatic and asymptomatic samples. The melting curve in red and blue line are sugarcane green grassy shoot (GGS) and sugarcane grassy shoot (GS), respectively. The sugarcane white leaf (WL) and asymptomatic (AS) are shown by green line.

การจำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์ จากการสร้างกราฟ Normalized melting curve ด้วยโปรแกรม Gene Scanning (รูปที่ 2 b) พบว่าสามารถแยกตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม อย่างชัดเจนดังนี้ 1) กลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาโรค กอฝอย 2) กลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาโรคกอตะไคร้ และ 3) กลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวและตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการ แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการนั้นติดเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวแล้ว และจากการทดลองจะเห็นได้ว่าการแสดงลักษณะอาการของโรคอ้อยที่แตกต่างกันนั้นเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่แตกต่างกัน

การใช้วิธี HRM สามารถตรวจและจำแนกเชื้อที่เป็นสาเหตุของลักษณะอาการ ทำให้แก้ปัญหาเรื่องการจำแนกอาการโรคอ้อยโดยเฉพาะ โรคใบขาวและกอฝอย ซึ่งมีลักษณะที่คล้ายกันมากออกจากกันได้ มีรายงานการวิจัยใช้เทคนิค PCR และวิเคราะห์ผลผลิตด้วย HRM ทำให้สามารถแยกจีโนไทป์ของเชื้อ *Mycoplasma gallisepticum* 30 ไอโซเลทได้อย่างรวดเร็ว (Seyed *et al.*, 2010) การศึกษาจีโนไทป์ของยีน *SNRPN* จากตัวอย่างเลือด ด้วยเทคนิค real-time PCR ร่วมกับการวิเคราะห์ผลด้วยวิธี melting curve พบว่าเทคนิคนี้เป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ทั้งคุณภาพและปริมาณ (Chia-Cheng *et al.*, 2011) การคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ที่กลายพันธุ์ระดับยีน (point mutation) ด้วยวิธี qPCR-HRM สามารถนำมาประยุกต์ใช้สร้างวิธีการตรวจสอบการกลายพันธุ์ระดับยีนสาเหตุของมะเร็งได้อย่างแม่นยำ (Etienne *et al.*,

2009) การวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR ด้วยวิธี HRM ไม่จำเป็นต้องรู้ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเป็นวิธีที่ให้ผลการทดลองเร็ว สามารถทำได้ง่าย มีความไวของปฏิกิริยาสูง เหมาะสำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างจำนวนมากในแต่ละครั้ง (Chia-Cheng et al., 2011; Etienne et al, 2009) มีค่าใช้จ่ายที่ประหยัดกว่าการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตัวอย่าง และนำมาสร้าง phylogenetic tree

การใช้วิธี HRM มีประโยชน์ในการตรวจสอบและจำแนกเชื้อในตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการของโรค อ้อย และงานวิจัยด้านการติดเชื้อข้ามชนิด การศึกษาแมลงนำโรค เพื่อหาแนวทางลดการระบาดของโรค อ้อยที่มีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เชื้อไฟโตพลาสมาเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในอ้อย จากการสร้างกราฟ Phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S rDNA พบว่าสามารถจัดกลุ่มเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) เชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวและกอลฝอย ซึ่งระดับความเหมือนกันที่ 99% 2) เชื้อไฟโตพลาสมาโรคกอดะไคร้ มีระดับระดับความเหมือนกันกับเชื้อโรคใบขาวและกอลฝอยที่ 85-86% ซึ่งเป็นไปได้ว่าจะเป็น subgroup ของ 16SrXI group หรืออาจเป็นกลุ่มใหม่ใน 16Sr group

การจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้พบตำแหน่ง SNP ของเชื้อโรคใบขาวกับกอลฝอยคือ A254G และเชื้อโรคกอดะไคร้กับใบขาวและกอลฝอยคือตำแหน่ง T245C ความแปรปรวนนี้มีผลทำให้การแปลเป็นกรดอะมิโนเปลี่ยนไป ส่งผลต่อการสร้างโปรตีนให้เปลี่ยนไปด้วย และการแสดงออกของโรคมีความแตกต่างกัน

ผลการจำแนกความแตกต่างของจีโนมไทป์ของเชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยวิธี HRM ทำให้สามารถแยกเชื้อไฟโตพลาสมาตามอาการของโรคที่ปรากฏได้อย่างชัดเจน นอกจากจะใช้ตรวจหาเชื้อแล้วยังระบุชนิดของเชื้อในตัวอย่างที่ยังไม่แสดงอาการได้อีกด้วย วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว แม่นยำ ทำได้ครั้งละจำนวนมาก (high-throughput)

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ให้ระบุผลงานที่สิ้นสุด ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร พัฒนาต่อหรือถ่ายทอด 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 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และ วันที่ 23-25 มิถุนายน 2558 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี

10.4 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการแสดงโปสเตอร์ความรู้เรื่องโรคใบขาวในอ้อย ในงานเปิดบ้านกรมวิชาการเกษตร ปีงบประมาณ 2558

10.5 เผยแพร่ข้อมูลในงานประชุมวิชาการเกษตรแห่งชาติ ปี 2558 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10.6 ขยายผลโยกย้ายมาใช้ตรวจจำแนกชนิดเชื้อใบขาว ในการตรวจตัวอย่างอ้อยใบขาวโครงการร่วมกับหน่วยงานภายในกรมวิชาการเกษตร (สวพ. 3, สวร. ขก. และ สวร.) และ โครงการความร่วมมือกับ JIRCAS ในปี 2557, 2558

10.8 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการประชุม JIRCAS-KKU-KKFCRC Collaborative Workshop on Sugarcane IPM Project, 16 กันยายน 2558

11. คำขอขอบคุณ : ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานกลุ่มวิจัยโรคใบขาว จากสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร ดร. ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ ผชช. กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ อาจารย์รังสี เจริญสถาพร ที่ให้ข้อมูล และคำปรึกษา ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ที่ร่วมกันดำเนินงานอย่างจริงจัง ทำให้งานวิจัยคล่องไปด้วยดี และสำเร็จตามเป้าหมายเป็นอย่างดี

12. เอกสารอ้างอิง

ยุพา หาญบุญทรง, วรรณภา ฤทธิสนธิ์ และ ชุตินันท์ ชูสาย. 2548. การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเปลี้ยจ๊กจั่นและการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. วารสารวิจัย มข. 10(1): 13- 21.

สุภาพร คงกลิ่น และ คะนิงนิษฐ์ เจริญวารการ. ข้อมูลความหลากหลายในระดับโมเลกุลของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวซึ่งเป็นสำคัญของอ้อย ใน ชุดโครงการสร้างองค์ความรู้และพัฒนาอ้อย. 2551. 80 หน้า.

Chen, C.T. 1978. Vector pathogen relationships of sugarcane whote leaf disease. Taiwan Sugar Journal 25: 50-54.

Chia-Cheng H, Shin-Yu L, Shuan-Pei L, Chin-Ping C, Lang-Yao C, Chien-Nan L and Yi-Ning S. 2011. Quantitative and Quanlitative analysis of the *SNRPN* gene using real-time PCR with melting curve analysis. The journal of molecular diagnostics. 13(6): 609-613.

Etienne R, Cédric L, Violaine B, Florence C, Tetsuro N, Florent S, Ivan B, Sylviane O, Hagay S and Rosette L. 2009. Quantitative PCR High-Resolution Melting (qPCR-HRM) curve

analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in lynch syndrome. *Human Mutation*. 0(0): 1-9.

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.

Seemüller E, Schneider B, Murer R, Ahrens U, Daire X, Kison H, Lorenz K.-H, Hoffmann A, Firrao G, Avinet L, and Stackebrandt E. 1994. Phylogenetic Classification of Plant pathogenic mycoplasmas by sequence analysis of 16S rDNA. *IOM letter*. 3:224-225.

Wongwarat T. Molecular detection and gene-based variation of sugarcane white leaf phytoplasma. Doctor of philosophy degree Thesis. 147 pp.

Sakuanrungsirikul S, Wongwarat T, Srisink S, and Theerakulpisut P. Genetic diversity of phytoplasma associated with diseases of sugarcane and some grasses in Thailand based on sequencing analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer region. The international conference on tropical and sub-tropical plant diseases 2012. February 7-10, 2012. The Empress hotel, Chiang Mai, Thailand.

Sayed AG, Amir HN, and Phiip FM. 2010. Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using PCR and high-resolution melting curve analysis. *Microbiology*. 156: 1019-1029.