รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

   กิจกรรม : -

   กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : พัฒนาเทคนิคการตรวจหา immunodominant membrane protein genes (IDPs) ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of immunodominant membrane protein genes (IDPs) associated with Sugarcane White Leaf Diseases by Molecular Biology

   คณะผู้ดำเนินงาน

   หัวหน้าการทดลอง : กาญจนา วาระวิชะนี สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

   ผู้ร่วมงาน : แสนชัย คำหล้า สังกัด สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

4. **บทคัดย่อ**

ยีน imp ของเชื้อไฟโตพลาสมา เป็นยีนชนิดหนึ่งของ immunodominant membrane protein genes (IDPs) ได้ออกแบบคู่ไพร์เมอร์ IMP-F2/IMP-R2 โดยอาศัยฐานข้อมูล GenBank เมื่อสังเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,185 bp ที่ครอบคุลมลำดับนิวคลีโอไทด์ imp gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยครบยีนจำนวน 492 bp นำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Candidatus* Phytoplasma oryzae, 16SrXI (Accession No. AB469012) ด้วย Clustal Omega programs พบมีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกัน (Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำที่ 58.57 เปอร์เซ็นต์ 36.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากปัจจุบันยังไม่มีข้อมูล imp gene ของไฟโตพลามาสเหตุโรคใบขาวอ้อยในฐานข้อมูล GenBank แต่อย่างไรก็ตามเมื่อสังเคราะห์ด้วยคู่ไพร์เมอร์ IMP-F2/IMP-R2 พบชนิดยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่ยีนที่แทรกอยู่โดยอ้างอิงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Candidatus* Phytoplasma oryzae (Accession No. AB469012) ซึ่งอยู่กลุ่ม 16SrXI เช่นเดียวกับ Sugarcane White Leaf (SWL)

คำสำคัญ : เชื้อไฟพลาสมา โรคใบขาวอ้อย ออกแบบไพร์เมอร์

ABSTRACT

Phytoplasma's *imp gene* appertain to immunodominant membrane protein genes (IDPs). IMP-F2/IMP-R2 was designed based on available data on the GenBank database and confer an PCR amplicon about 1,185 bp covering 492 bp of Sugarcane white leaf phytoplasma's imp gene. Nucleotide alignment with *Candidatus* Phytoplasma oryzae, 16SrXI (Accession No. AB469012) using Clustal Omega programs showed a relatively low percentage of identity of nucleotide and amino acid at 58.57% , 36.88% respectively. As currently there is no *imp* gene available in the GenBank. Intron and exon are located in the nucleotide sequence using IMP-F2/IMP-R2 primer in reference to *Candidatus* Phytoplasma oryzae (Accession No. AB469012) belonging to the 16SrXI group the same as Sugarcane White leaf (SWL).

Key words : Phytoplasma, Sugarcane White leaf (SWL), immunodominant membrane protein genes (IDPs), imp gene, Double Antibody-sandwich Enzyme-linked Immunosorbent (DAS-ELISA), RT-PCR, nucleocapsid protein

5. คำนำ

อ้อยเป็นสินค้าเกษตรที่นำรายได้เข้าประเทศไทยในปีหนึ่งๆ มากกว่าหมื่นล้านบาท แต่ผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยพื้นที่ปลูกกลับมีแนวโน้มลดลง ปัญหาการระบาดของโรคเป็นหนึ่งสาเหตุหลักทำให้ผลผลิตอ้อยในภาพรวมของประเทศตกต่ำ โดยเฉพาะปัญหาจากโรคใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาพบแพร่กระจายไปสู่พื้นที่ปลูกอ้อยทุกภาคอย่างต่อเนื่องในหลายๆ พื้นที่ตั้งแต่ปี 2497 จนถึงปัจจุบัน เมื่อคิดเป็นพื้นที่การระบาด เช่น ปี 2554/55 พบมากกว่า 170,000 ไร่ ซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลของประเทศไทยไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาท (ธวัช หะหมาน, (ม.ป.ป.) และถือว่าเป็นโรคอุบัติซ้ำซากที่ทำให้คุณภาพผลผลิตอ้อยลดลงเพิ่มต้นทุนการผลิตของเกษตรกรให้สูงขึ้นที่ต้องรื้อแปลงอ้อยเพื่อปลูกใหม่ ในปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใด ๆ ที่สามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดจากโรคใบขาวได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ วิธีการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคที่ดีที่สุด ณ ขณะนี้ คือ การใช้ท่อนพันธุ์อ้อยที่สะอาดปราศจากโรคควบคู่กับการจัดการแปลงผลิตที่ดีเพื่อเฝ้าระวังแมลงพาหะนำโรค ทั้งนี้ จำเป็นต้องเร่งหาวิธีการตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูงเข้ามาช่วยแก้ปัญหาในเบื้องต้นนี้ ซึ่งในปัจจุบันพบว่า imp gene เป็นยีนชนิดหนึ่งของ immunodominant membrane protein genes (IDPs) ที่สามารถตรวจพบได้ง่ายภายใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย (Morton et al., 2003; Blomquist, et al., 2001) ซึ่ง imp gene นับว่าเป็นยีนทางเลือกใหม่ที่มีศักยภาพสูงสำหรับพัฒนางานวิจัยทางด้านการตรวจสอบ และสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยทางด้านอินโมโนวิทยาในอนาคตได้

ดังนั้น นักวิจัยจึงได้พยายามพัฒนาการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ imp gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

6. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ
2. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอด microcentrifuge tube ขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
- เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
- เครื่อง Thermal cycler
- เครื่อง Gel electrophoresis
- เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

3. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany)
- เอ็นไซม์ PLATINUM™ Taq polymerase High quality (Invitrogen,USA)
- Agarose gel (SeaKem®)
- ชุดไพรเมอร์
- ชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN)
- ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreP Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN)
- สารปฏิชีวนะ
- GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)
- ชุดพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega, USA),
- T4 DNA Ligase (Promega, USA)
- competent cell (E. coli สายพันธุ์ Top 10) (Invitrogen,USA)

- วิธีการ

1. การสืบค้นข้อมูล

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับ immunodominant membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย จาก GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) และจากเอกสารที่เคยได้รายงานไว้ เพื่อใช้ประกอบการวิจัย

2.ออกแบบหรือสืบค้นไพร์เมอร์ต่อ *imp* gene

ค้นหาข้อมูลไพร์เมอร์ที่เคยมีรายงานหรือออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะกับ *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก GenBank หาความจำเพาะของไพร์เมอร์ด้วยโปรแกรมBLASTN (http://biotools.nubic.northwestern.edu/) และคำนวณค่า annealing temperature (Tm °C) โดยใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (http://www.basis.northwestern.edu/)

3. ตัวอย่างพืชสำหรับใช้ทดสอบ

เก็บตัวอย่างท่อนพันธุ์อ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวจากแปลงปลูกในพื้นที่ จ.นครราชสีมา และ จ.ขอนแก่น ปลูกในกระถางภายในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยสำหรับการทดสอบเชื้อต่อไป

4. แยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany) ชั่งตัวอย่างพืช ประมาณ 0.1 กรัม บดให้เป็นผงละเอียด และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำใส่หลอด microcentrifuge tube ไปแช่ที่ 65 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใส มาเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทำการเก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ในขั้นต่อไป

5. ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

-	น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	17.0	ไมโครลิตร
-	10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
-	$MgCl_2$ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
-	dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร

-	ไพร์เมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	ไพร์เมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
-	platinum Taqmix (Invitogen,0.1 unit/µl)	0.5	ไมโครลิตร
-	ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	ไมโครลิตร
	รวม	**25.0**	**ไมโครลิตร**

ผสมส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 1 นาที	
ขั้นที่ 3:	52-56°C	นาน 2 นาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 3 นาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	15°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

จากนั้นนำ DNA PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% gel agarose ผสมสาร red safe dry ที่เตรียมในสารละลาย 1X TAE buffer มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที และนำแผ่น 1% agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง ChemiDoc™ Touch Imaging System (170-8370) โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตราฐาน 100 bp DNA Ladder และทำการบันทึกภาพเพื่อสรุปผลที่เกิดขึ้น

6. การโคลนยีนเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy cloning vector

โดยเตรียมชิ้นยีนเป้าหมายให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกขนาดดีเอ็นเอบนแผ่น 0.8% agarose gel ในสารละลาย 1X TAE buffer ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส ตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอเป้าหมายใส่หลอดไมโครทิวป์ ชั่งน้ำหนักเจลไม่เกิน 300 มิลลิกรัมและนำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) แล้วเชื่อมต่อชิ้นยีนเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy cloning vector (Promega, USA.) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่คอมพีเท็นเซลล์ (competent cell) แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) เลือกพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค blue white colony และตรวจยืนยันชิ้นยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค colony PCR

7. เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank

ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูลGenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez)

8. ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน (ดำเนินการปี 2560-2561)

5. ทำการบันทึกข้อมูล และจัดทำรายงาน

- เวลาและสถานที่ : ระยะเวลา 2 ปี **เริ่ม** ตุลาคม 2559 **สิ้นสุด** กันยายน 2561

สถานที่ : กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสืบค้นข้อมูล

ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยว *imp* gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งเป็นยีนชนิดหนึ่งของกลุ่ม immunodominant membrane protein genes (IDPs) สามารถตรวจพบใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย ซึ่งกลุ่มยีน IDPs หลังแปลรหัสเป็นโปรตีนพบ 3 ชนิด คือ (1) immunodominant membrane protein (Imp) (Morton *et al*., 2003); (2) immunodominant membrane protein A (IdpA) (Bloquist *et al*., 2001); (3) antigenic membrane protein (Amp) (Kakizawa *et al*., 2004)

2.ออกแบบไพร์เมอร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) (ตารางที่ 1) นำมาออกแบบไพร์เมอร์จำนวน 1 คู่ คือ IMP-F2/IMP-R2 primer ขนาดดีเอ็นเอประมาณ 1200 bp ซึ่งครอบคุลมลำดับนิวคลีโอไทด์ *imp* gene ครบทั้งยีน (ขนาดประมาณ 500 bp) ภาพที่ 1

3. ตัวอย่างพืชสำหรับใช้ทดสอบ

ได้ตัวอย่างกออ้อยที่แสดงอาการใบแคบสีขาว เรียวเล็กกว่าปกติ ต้นแคระแกร็น แตกหน่อเร็ว จากแปลงปลูกจังหวัดนครราชสีมา (ภาพที่ 2) มาปลูกไว้ในกระถางภายในโรงเรือนของกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อสำหรับทดสอบต่อไป

4. แยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

ทำการสกัดดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วย DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) และนำมาตรวจความบริสุทธิ์และความเข้มเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260/280 นาโนเมตร พบว่า ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ 100 ng/ul ซึ่งมากเพียงพอต่อการทดสอบต่อด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR อยู่ที่ประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Sambrook and Russell, 2001)

5. ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ผลการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพร์เมอร์ IMP-F2/IMP-R2 primer ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดที่ประมาณ 1200 bp (ภาพที่ 3)

6. การโคลนยีนเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy cloning vector

ได้เชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1200 bp เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) และคัดเลือกดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ T7-F /SP6-R เมื่อตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า ได้แบคทีเรียที่รับชิ้นดีเอ็นเอทุกโคลนที่ทำการคัดเลือก และนำ 1 โคลนมาสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสมด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPreP Plasmid Extraction Mini Kit (FAVORGEN) ได้สารละลายดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสมแล้วนำส่งอ่านวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัทการค้า Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

7. เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank

ได้ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากคู่ไพร์เมอร์ IMP-F2/IMP-R2 primer มีจำนวน 1,185 bp นำมาเปรียบเทียบชนิดยีนกับ *Candidatus* Phytoplasma oryzae (Accession No. AB469012) เนื่องจากอยู่กลุ่ม 16SrXI เหมือนกับ Sugarcane White Leaf (SWL) (ตารางที่ 1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยยีน 3 ชนิด ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ partial DnaD gene จำนวน 204 bp พบส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่ยีนแทรกอยู่จำนวน 130 bp ลำดับนิวคลีโอไทด์ immunodominant membrane protein (Full *imp* gene) มีจำนวน 492 bp พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่ยีนแทรกจำนวน 92 bp และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ partial CTP synthase (partial PyrG gene) จำนวน 267 bp เมื่อนำ *imp* gene มาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกัน (Identity) ด้วย Clustal Omega programs พบว่า

ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนอยู่ในระดับ 58.57 เปอร์เซ็นต์ 36.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งความคล้ายกัน (Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนอยู่ในระดับต่ำมากอาจเนื่องจาก ณ ปัจจุบัน ยังไม่มีข้อมูล *imp* gene ของไฟโตพลามาสเหตุโรคใบขาวอ้อยในฐานข้อมูล GenBank

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับ *imp* gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งเป็นยีนชนิดหนึ่งของกลุ่มยีน immunodominant membrane protein genes (IDPs) สามารถตรวจพบใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย จากรายงาน *imp* gene มีศักยภาพนำมาพัฒนางานวิจัยด้านการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุดังกล่าวได้อย่างจำเพาะทั้งทางด้านอณูชีววิทยาและทางด้านเซรุ่มวิทยา (Morton *et al*., 2003) สำหรับการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ได้ออกแบบไพร์เมอร์จำนวน 1 คู่ คือ IMP-F2/IMP-R2 primer โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และออกแบบให้ครอบคุลมลำดับนิวคลีโอไทด์ *imp* gene ครบทั้งยีน (ขนาดประมาณ 500 bp) เมื่อนำคู่ไพร์เมอร์ดังกล่าวมาใช้สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค PCR ตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1200 bp เมื่อส่งอ่านวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า มีจำนวน 1,185 bp เมื่อนำมาเปรียบเทียบชนิดยีนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Candidatus* Phytoplasma oryzae (Accession No. AB469012) เนื่องจากอยู่ในกลุ่ม 16SrXI เหมือนกันกับ Sugarcane White Leaf (SWL) ประกอบด้วย 3 ยีน ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ partial DnaD gene จำนวน 204 bp ซึ่งมีส่วนที่ไม่ใช่ยีนแทรกอยู่จำนวน 130 bp, immunodominant membrane protein (Full *imp* gene) มีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 492 bp ซึ่งมีส่วนที่ไม่ใช่ยีนแทรกอยู่จำนวน 92 bp และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ partial CTP synthase (partial PyrG gene) จำนวน 267 bp และเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกัน (Identity) ของ *imp* gene ด้วย Clustal Omega programs มีความคล้ายกัน (Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนอยู่ในระดับ 58.57 เปอร์เซ็นต์ 36.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งความคล้ายกัน (Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนอยู่ในระดับต่ำมาก เนื่องจาก ณ ปัจจุบัน ยังไม่มีข้อมูล *imp* gene ของไฟโตพลามาสเหตุโรคใบขาวอ้อยในฐานข้อมูล GenBank แต่อย่างไรก็ตามชนิดยีนและลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่ยีนสามารถอ้างอิงเทียบได้จาก Accession No. AB469012 จึงสามารถยืนยันในเบื้องต้นว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโน *imp* gene ของไฟโตพลาสมา และจะได้ดำเนินการส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,185 bp เพื่อให้มีสืบค้นในฐานข้อมูล GenBank ต่อไป รวมทั้งเป็นยีนทางเลือกใหม่ที่มีศักยภาพสูงสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยการตรวจสอบทางด้านอิมมูโนวิทยาได้ในอนาคต

10. **การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :**

-นำเทคโนโลยีมาใช้ในการตรวจตรวจสอบหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยซึ่งไม่สามารถวินิจฉัยได้ด้วยตาเปล่า ทั้งนี้ ไพร์เมอร์ที่ออกแบบนี้มีความเฉพาะเจาะจงเฉพาะกับ imp gene ของเชื้อสาเหตุดังกล่าว และสามารถนำไปต่อยอดพัฒนางานวิจัยทางด้านอิมโมโนวิทยาได้ต่อไปในอนาคต

11. **คำขอบคุณ (ถ้ามี)** **:** -

เอกสารอ้างอิง

ธวัช หะหมาน (ม.ป.ป.). โรคใบขาวอ้อย. ศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายเขต 3 สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย. แหล่งที่มา : (http://www.ocsb.go.th/upload/learning/fileupload/4086-8525.pdf, 6 มิถุนายน 2559)

Morton, A., Davies, DL., Blomquist, CL., and DJ. Barbara. 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasma. Mol. Plant Pathol. 4 : 109-114.

Blomquist, C. L., Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., and B. C. Kirkpatrick. 2001. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. Microbiology. 147 : 571-580.

Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S, Ugaki, M., and S. Namba. 2004. Secretion of immunodominant membrane protein. from onion yellow phytoplasma through the Sec protein-ranslocation system in *Escherichia coli*. Microbiology. 150 : 135-142.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3rd ed., Cold Spring Habor Laboratory Press, New York. 545 p.

ภาคผนวก

Table 1 Phytoplasma species and accession number for designing imp gene primer

Name	Acronym	Accession No.	Group (base on 16S rRNA)
Porcelain vine witches'-broom phytoplasma	PvWB	AB469011	16S-group, AY-sg
Onion yellows phytoplasma	OY-W	AB469007	16SrI-B
Mulberry dwarf phytoplasma	MD	AB469009	16SrI-B
Alfalfa witches'-broom phytoplasma	AlfWB-F	JQ745273	16SrII
Crotalaria witches'-broom phytoplasma	CrWB	JQ745279	16SrII
Tsuwabuki witches'-broom	TWB	AB469014	16SrIII
Korean potato witches'-broom phytoplasma	PWBK	AB469013	16SrVIII
Candidatus Phytoplasma oryzae	RYD	AB469012	16SrXI

Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

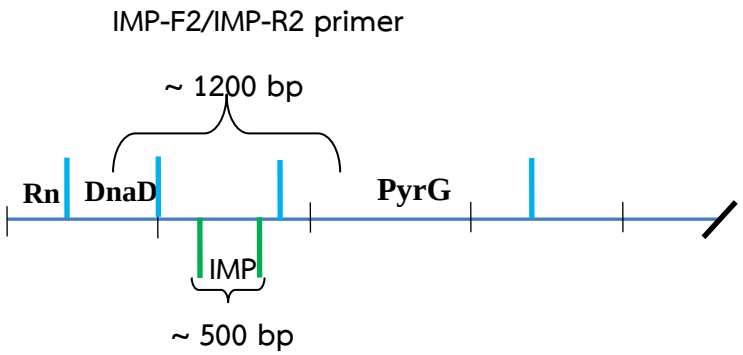

Figure 1 Schematic of IMP-F2/IMP-R2 primer covered imp gene region using *Candidatus* Phytoplasma oryzae, Accession No. AB469012-RYD as sequence reference

Note: scale 2 cm equals to 1.0 kb

Figure 2 White leaves caused by *Candidatus* Phytoplasma spp. in sugarcane filed in Nakhon Ratchasima province

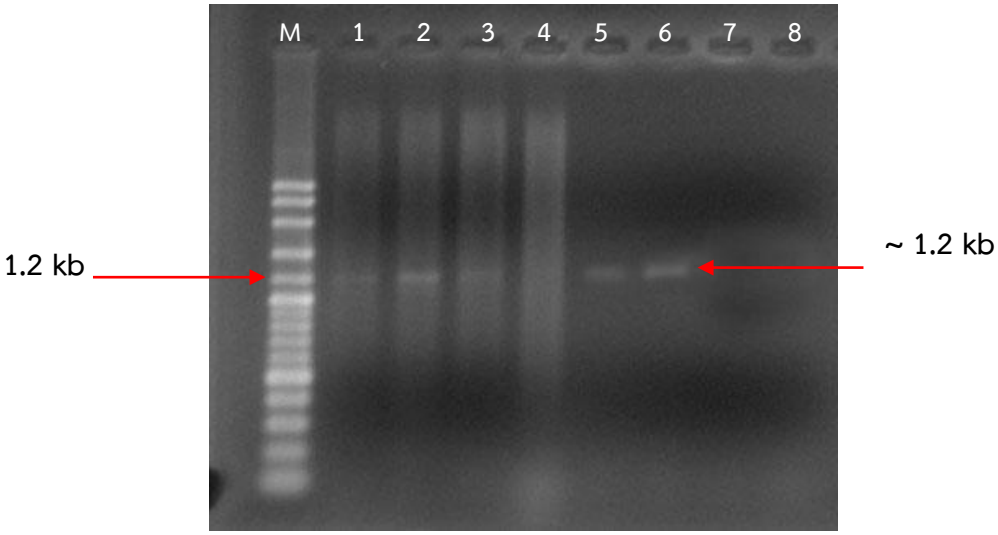

Figure 3 PCR products of imp gene from sugarcane white leave disease using the primer IMP-F2/IMP-R2.

M = 100 bps DNA Ladder (fermentas®)

1 – 4 = Sugarcane white leave extracted with CTAB buffer (~1200 bp)

5 – 6 = Sugarcane white leave extract with DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) (~1200 bp)

7 = Healthy sugarcane

8 = negative control (distilled water)