การใช้ได้ของแนวทางการจำแนกชนิดด้วยเทคนิค Multiplex PCR ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้มันสำปะหลัง

Validity of Multiplex PCR for Identifying Phytoplasma Witches’ Broom in Cassava

วีรกรณ์ แสงไสย์[1] เบญจวรรณ รัตวัตร[1] น้ำผึ้ง ชมภูเขียว[1] ไพเราะ ขวัญงาม[2]
ภานุวัฒน์ มูลจันทะ[3] ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[1]

Weerakorn Seangsai[1] Benjawan Ruttawat[1] Namphueng Chomphukheaw[1]
Pairoh Khwanngam[2] Phanuwat Moonjuntha[3] Suchirat Sakuanrungsirikul[1]

[1]ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น กรมวิชาการเกษตร ขอนแก่น 40000
[2]สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลัง กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900
[3]ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง กรมวิชาการเกษตร ระยอง 21150
[1]Khon Kaen Field Crops Research Center, Department of Agriculture, Khon Kaen, 40000
[2]Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Department of Agriculture, Bangkok, 10900
[3]Rayong Field Crops Research Center, Department of Agriculture, Rayong, 21150

บทคัดย่อ

โรคพุ่มแจ้ใน มันสำปะหลัง (Cassava witches’ broom disease) เกิดจากเชื้อ *Candidatus* Phytoplasma (*Ca*. P.) ในประเทศไทยมีรายงานการพบโรคพุ่มแจ้ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16SrI และ16SrII ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ ออกแบบจากนิวคลีโอไทด์ จาก *Ca*. P. กลุ่ม 16SrI และ16SrII สำหรับตรวจด้วยเทคนิค Multiplex PCR ผลการตรวจความจำเพาะของไพรเมอร์ ในการจำแนกกลุ่ม สามารถจำแนกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 2 กลุ่ม *Ca*. P. 16SrI และ16SrII โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างพืชปกติ ผลการตรวจด้วยเทคนิค Multiplex-PCR เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอขนาด 413 bp แสดงถึงตัวอย่างติดเชื้อไฟโตพลาสมา 16SrI group มีความคล้ายคลึง (KP054298.1) ถึง 95% และดีเอ็นเอขนาด 219 bp แสดงถึงตัวอย่างติดเชื้อไฟโตพลาสมา 16SrII group มีความคล้ายคลึง (LN897457.1) ถึง 97% มีความไวในการตรวจสอบพบว่าวิธี Multiplex-PCR มีความไวสูงกว่า Nested-PCR เดิมถึง 100 เท่า การศึกษานี้เทคนิค Multiplex-PCR สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อสาเหตุโรคพุ่มแจ้ได้ และสามารถจำแนกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อได้ มีความไวสูง และยังลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาเพียงรอบเดียว

คำสำคัญ: มันสำปะหลัง ไฟโตพลาสมา โรคพุ่มแจ้มันสำปะหลัง Multiplex PCR

ABSTRACT

Cassava witches' broom disease cause by *Candidatus* Phytoplasma (*Ca*. P.). In Thailand, there have been reports of this disease caused by phytoplasmas in the 16SrI and 16SrII groups. The aim of this study was to design two primers from 16SrI and 16SrII groups of *Candidatus* Phytoplasma (*Ca*. P.). for Multiplex PCR detection. The detection of phytoplasma witches' broom, Multiplex PCR was able to detect and identify of cassava phytoplasma witches' broom were 16SrI and 16SrII groups and not detect in healthy plant. The samples revealed 413 bp (16SrI) DNA sequences of the amplification fragments matched 98% with *Candidatus* Phytoplasma (KP987848.1) in NCBI database and 219 bp (16SrII) DNA sequences of the amplification fragments matched 98% with *Candidatus* Phytoplasma (LN897457.1) amplified fragments by Multiplex PCR. The multiplex PCR has higher sensitivity than Nested-PCR was 10^2. This study Multiplex PCR able to analyze the Cassava witches' broom disease, able to identify infectious phytoplasmas, is highly sensitive and shortens the detection time through a one reaction cycle.

Keywords: Cassava, Phytoplasma, Cassava witches' broom disease, Multiplex PCR

คำนำ

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมันสำป ะหลัง อันดับ 2 ของโลก ปี 2565 มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 10.179 ล้านไร่ ผลผลิตเฉี่ย 34.691 ล้านตัน เปรียบเทียบกับปี 2564 มีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 10.406 ล้านไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 35.094 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร , 2565) ปัจจัยที่ทำใ ห้พื้นที่และผลผลิตลดลง เช่น เกษตรกรผู้ปลูกไม่ยอมทำลายแปลงที่เกิดการระบาด เกษตรกรขาดท่อนพันธุ์และใช้พันธุ์พืชที่ไม่มีการรับรองจากหน่วยงานของรัฐ/ใช้พันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรค มีการลักลอบซื้อขายท่อนพันธุ์และเคลื่อย้ายท่อนพันธุ์จากแหล่งเกิดโรคหลายช่องทาง หนึ่งในโรค ที่ติดไปกับท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง คือ โรคพุ่มแจ้ซึ่งเกิดจาก เชื้อไฟโตพลาสมา (Class Mollicutes, genus *Candidatus* Phytoplasma (*Ca.* P.)) สามารถถ่ายทอดผ่านทางท่ออาหาร (Phloem) (Christensen *et al.,* 2005) สำหรับประเทศไทยมีรายงานการพบโรคพุ่มแจ้ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16SrI (สุภาพร และคณะ, 2559) และมีรายงานพบการระบาดในจังหวัดระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา สระแก้ว จันทบุรี ปราจีนบุรี กำแพงเพชร และ กาญจนบุรี โดยเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII (Moonjuntha *et al.,* 2018) โดยอาการของโรคมีผลทำให้ส่วนยอดของต้นมันสำปะหลังแคระแกร็น พืชแตกตาข้างมาก ใบเล็กลดรูป ข้อถี่สั้น ใบมีอาการเหลือง ท่อน้ำท่ออาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ผลผลิตหัวมันสดลง ทั้งขนาดและจำนวนของหัวมันต่อต้น โดยหัวมันที่เป็นโรคจะมีน้ำหนักเบ า ในปี 2561 กรมวิชาการเกษตรได้ลงพื้นที่ สำรวจแปลงปลูกมันสำปะหลังของเกษตรกร จำนวน 11 จังหวัด ได้แก่ กำแพงเพชร กาญจนบุรี ฉะเชิงเทรา ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ปราจีนบุรี สระแก้ว นครราชสีมา บุรีรัมย์ และกาฬสินธุ์ พบอาการแตกพุ่มแจ้ระบาดในแปลงมันสำปะหลังมากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ โดยพบมากที่สุดใน ระยองและจันทบุรี

(กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ , 2561) สำหรับประเท ศไทยเริ่มตื้นตัวในการศึกษาโรคนี้เพราะมีผลกระทบต่อปริมาณผลผลิตมันสำปะหลัง ในการป้องกันกำจัดต้องเร่งสำรวจและทำการป้องกันกำจัดให้ถูกต้อง เพื่อลดความเสี่ยงของการนำท่อนพันธุ์ที่ติดเชื้อไปปลูกขยาย ต่อได้ทันท่วงที พร้อมทั้งคิดค้นหาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว แม่นยำสูง เช่น การตรวจด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา บางอาการของโรคนั้นเกิดร่วมกันทำให้เกิดความลำบากในการจำแนกเชื้อสาเหตุโรค ปัจจุบันโรคพุ่มแจ้นั้นได้แพร่กระจายอย่างกว้างขวางและเพิ่มความเสียห าย ให้มันสำปะหลังเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จึงจำเป็นต้องศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อเพื่อเป็นข้อมูลไว้สำหรับการป้องกันกำจัด ปัจจุบันมีวิธีการจำแนกและ ตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคที่มีความรวดเร็ว และแม่นยำ โดย การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมามีหลายวิธี วิธีที่นิยมได้แก่ Nested PCR ที่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ใช้ระยะเวลาการตรวจสอบนาน สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับยีน 16S rDNA ในพืชและแบคทีเรีย ต้องทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ 2 ครั้ง ดังนั้นการใช้เทคนิค Multiplex PCR เป็นการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียงครั้งเดียวแต่สา มารถตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาได้ หลายๆ ชนิดในครั้งเดียวกัน สามารถดำเนินการเสร็จภายในวันเดียวกัน หลักการคือการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน (Forbes *et al.,* 2002) ทำให้แก้ปัญหาเรื่องการจำแนกอาการโรคพุ่มแจ้ ที่มีลักษณะที่คล้าย กันมากออกจากกันได้ โดยไม่ต้องใช้วิธี gel electrophoresis จึงลดต้นทุนในการวิเคราะห์และลดปัญหาด้านสุขภาพและของเสียจากห้องปฏิบัติการได้ ปัจจุบันนิยมใช้เทคนิคนี้ในด้านการแพทย์ และสัตวแพทย์ ในการจำแนกชนิดเชื้อโรคที่ก่อโรคในคนและสัตว์ สำหรับด้านเกษตรยังไม่ นิยมการนำเทคนิคมาใช้ จึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้เพื่อตรวจสอบชนิดสาเหตุโรคพุ่มแจ้ด้วยเทคนิค Multiplex PCR ที่มีความถูกต้อง แม่นยำ เพื่อระบุชนิดของเชื้อได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1.ตัวอย่างพืชและการสกัดดีเนเอ

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีลักษณะอาการแตกพุ่มแจ้จากแปลงป ลูกมันสำปะหลัง ในพื้นที่ จังหวัดนครราชสีมา และขอนแก่น และได้รับการอนุเคราะห์ตัวอย่างพืชมีแสดงอาการพุ่มแจ้จากห้องปฏิบัติการโรคพืช ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง และสถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน นำตัวอย่างใบมันสำปะหลัง และพืชอื่นๆ รวม 20 ตัวอย่าง สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่หั่นเป็นชิ้นให้ละเอียด บดตัวอย่างพืชกับไนโตรเจนเหลวในโกร่งบดยา ให้ตัวอย่างพืชละเอียดเป็นผง เติม CTAB Buffer และสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีการจากรายงานของ Li and Midmore (1999) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.การออกแบบไพรเมอร์ (Primer)

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิจัยในครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค Multiplex PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการมากกว่า 1 ยีนต่อ 1 ปฏิกิริยา เทคนิคนี้จะอาศัยการใช้ไพรเมอร์ที่ มีความเพาะมากกว่า 1 คู่ในการทำปฏิกิริยา ข้อมูลของลำดับนิวโอไทด์นำมาจ ากฐานข้อมูล Genbank เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ โดยการออกแบบไพรเมอร์เลือกบริเวณ 16S-23S rDNA, มีค่า GC content ประมาณ 50-60% และมีค่า melting temperature (Tm) ของไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 55-75 °C และเนื่องจากเทคนิค Multiplex PCR ต้องใช้มีไพรเมอร์ที่มากกว่า 1 คู่ ดังนั้นควรคำนึงขนาด PCR product ที่เกิดขึ้น เพื่อง่ายต่อการตรวจวิเคราะห์ผล

โดยขนาดของ PCR product ควรมีขนาดต่างกันอย่างน้อย 40 base pairs ในงานวิจัยในครั้งนี้ได้นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้จาก NCBI database (Table 1) แบบได้ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Software version 7.0 ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบสำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อไฟ โตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ ด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยการตรวจวินิจฉัยนี้เป็นการจำแนกเชื้อไฟโรคพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้มันสำปะหลัง ได้ออกแบบไพรเมอร์ออกเป็นทั้งหมด 2 คู่ ซึ่งไพรเมอร์แต่ละคู่จะมีความจำเพาะกับยีนต่างๆ ดังนี้ ยีนเชื้อไฟโตพลาสมาที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI และเชื้อไฟโตพลาสมาที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII **(Table 2)**

Table 1 The classification of cassava witches' broom phytoplasma 16S-23S rDNA gene sequences from GenBank.

Population/ Strain	Location	GenBank no. (16S-23S rDNA)
16Srl group		
NL1	Thailand: Chacheoengsao	KP054298.1
NL2	Viet Nam: Dong Nai, Trang Bom	KF897512.1
NL3	Thailand: Chacheoengsao	KP054297.1
NL4	Viet Nam	JQ973105.1
16Srll group		
SF1	-	L33765.1
SF2	Australia: Medina, Perth, Western Australia	HQ404357.1
SF3	Viet Nam	KM280680.1
SF4	Thailand	LN897457.1

Table 2 Oligonucleotide primers design for Multiplex PCR.

Primers	Oligonucleotide (5'-3')	base	Tm
cwbF1	TATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACA	413 bp	60
cwbR1	TTTACCACTACACATGGAATTCCACTTGCC		
cwbF2	TTTACCACTACACATGGAATTCCACTTGCC	219 bp	62
cwbR2	TGCTGGCACATAATTAGCCGGGGCTTATTCATC		

1. **การเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค Multiplex PCR**

ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการปรับความเหมาะสมของสารเคมีให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยได้ทำการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ นอกจากนี้ยังได้ปรับความเหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา Multiplex PCR ความเหมาะสมของสารเคมีแ ละอุณหภูมิที่ใช้นั้นจะมีการพิจารณาจากความคมชัดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา Multiplex PCR ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Multiplex-PCR ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x PCR buffer A (500mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.1 at 20°C) และ 0.1% Triton™ X-100, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 µM dNTP, Taq DNA polymerase (Vivantis) ความเข้มข้น 0.1 หน่วยต่อหนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 µM โดยนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 วินาที การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาโดยกำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามเว ลาดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 40 วินาที และ ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที และที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 5 นาที ตรวจสอบผลของวิธี Multiplex PCR ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% agarose gel ตรวจสอบภายใต้แสงยูวี

2. **การตรวจสอบ Specificity ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Multiplex PCR**

ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Multiplex PCR เพื่อทดสอบการ cross amplification กับไฟโตรพลาสมาชนิดอื่นๆ การตรวจวินิจฉัย หาเชื้อไฟโตพลาสมาถูกแบ่งออกเป็น Positive specificity ซึ่งจะเป็นการทดสอบความจำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมา ที่ทราบชนิดได้แก่ เชื้อไฟโตพลาสมา (*Ca.* P.) กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 ส่วน Negative specificity จะทดสอบกับไฟโตพลาสมาชนิดอื่นๆ

3. **การตรวจสอบ Sensitivity ของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Multiplex PCR เปรียบเทียบกับเทคนิค Nested PCR**

การหาความไวจากการทำ serial dilution เป็น 25 ng/µl และเจือจางที่ระดับ $1\text{-}10^{11}$ โดยวิธีนี้จะต้องทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยสามารถวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง Nanodrop meter เพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค multiplex PCR ตามวิธีการที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับเทคนิค Nested PCR ตามวิธีการของ (Jung *et al.,* 2003)

4. **การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ (DNA sequencing)**

นำผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้มาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี dye terminator cycle sequencing ของบริษัท แปซิฟิกไซแอนซ์ประเทศไทย แล้วนำผลและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ใน GenBank database เข้าสู่โปรแกรม ClustalW ใน Bioedit program (http://www.mbio.ncsu/edu/bioedit/.html

5. การสร้าง phylogenetic tree

สร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining method (Tamura 3-parameter model) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6 (http:www.megasoftware.net.bugs.php) ที่ระดับความเชื่อมั่น 1,000 bootstraps

ผลการทดลองและวิจารณ์

1.ออกแบบไพรเมอร์

จากการออกแบบไพรเม อร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบจากยีนเป้าหมายบริเวณ 16S-23S rDNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ในมันสำปะหลัง จำนวน 2 กลุ่ม ได้แก่ 16SrI group และ 16SrII group ได้ไพรเมอร์ทั้งหมด จำนวน 2 คู่ ได้แก่

คู่ที่ 1 cwbF1 (5'-TATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACA-3')

cwbR1 (5'-TTTACCACTACACATGGAATTCCACTTGCC-3')

คู่ที่ 2 cwbIF2 (5'-TTTACCACTACACATGGAATTCCACTTGCC-3')

cwbR2 (5'-TGCTGGCACATAATTAGCCGGGGCTTATTCATC-3')

2. สภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Multiplex-PCR

ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อ ปฏิกิริยา Multiplex-PCR ปริมาตรรวม 15 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1x PCR buffer A (500mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.1 at 20 °C) and 0.1% Triton™ X-100; Vivantis), 0.2 µM dNTP Taq DNA polymerase (Vivantis) ความเข้มข้น 0.1 หน่วยต่อหนึ่งหน่วยปฏิกิริยา ไพรเมอร์ความเข้มข้น 0.5 µM และ DNA template ความเข้มข้น 25 นาโนกรัม โดยนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 วินาที การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาโดย กำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามเวลาดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที และ ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที **(Fig.1)**

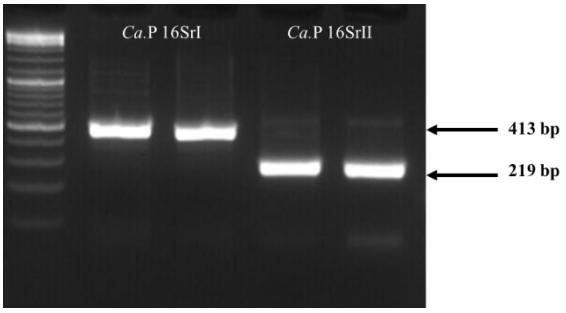

Fig.1 Detection of Phytoplasma witches' broom genomic DNA using multiplex PCR by 2 of 16S rRNA primers.

3.การทดสอบความไวของปฏิกิริยา Multiplex-PCR

ผลการทดสอบความไวของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้ นำดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายมาปรับความเข้มข้นเป็น 25 ng/µl และเจือจางที่ระดับ 10-10^{11} ตรวจด้วยเทคนิค Multiplex PCR เจือจางดีเอ็นเอความเข้มข้นตั้งต้นที่ 25 นาโนกรัม ให้มีความเข้มข้นต่างกัน 10 เท่า จากเริ่มต้นที่ 1 ถึง 10^{-11} วิธี nested PCR (Fig.2A) สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดที่ความเข้มที่ 10^{-6} ส่วน multiplex PCR สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-8} **(Fig.2B)**

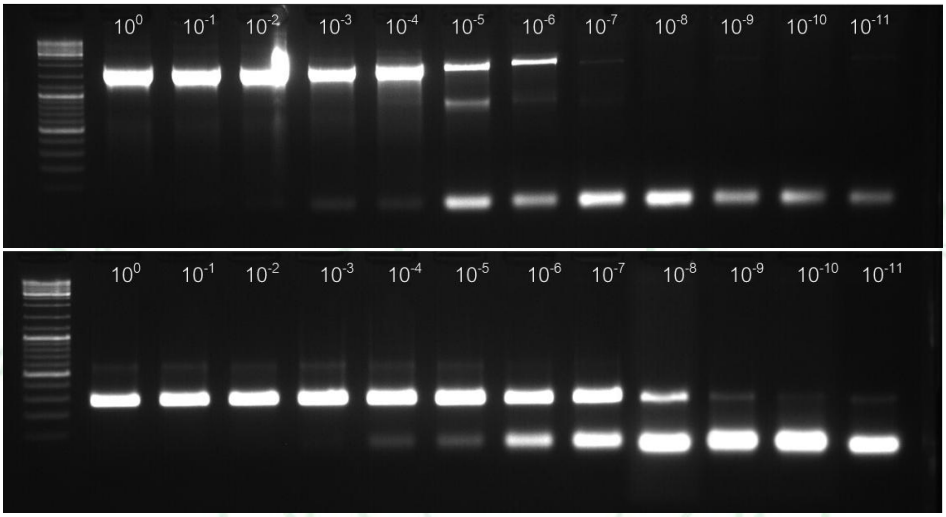

Fig.2 Comparisons on Phytoplasma witches' broom genomic DNA concentation by Nested PCR primers (A) and Multiplex PCR primers(*Ca*.P 16SrII) (B)

4.การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Multiplex-PCR

ผลการ นำตัวอย่างมั นสำปะหลัง มาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ ทดสอบการ cross amplification กับไฟโตรพลาสมาในพืชชนิดอื่นๆ ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับกลุ่ม เชื้อไฟโตพลาสมา *Ca.* P. 16Srl group และ16Srll group ในมันสำปะหลังและสามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคพุ่มแจ้ในพืชอื่นๆ เช่น สาบม่วง และหญ้าหนาดน้อย แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นพืช ปกติ **(Fig.3)** สอดคล้องกับการรายงานของประเทศไทยมีรายงานการพบโรคพุ่มแจ้ที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16Srl (สุภาพรและคณะ, 2559) และ Moonjuntha *et al*. (2018) ที่ได้ดำเนินการสำรวจโรคพุ่มแจ้ในประเทศไทยจากพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังพบเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII

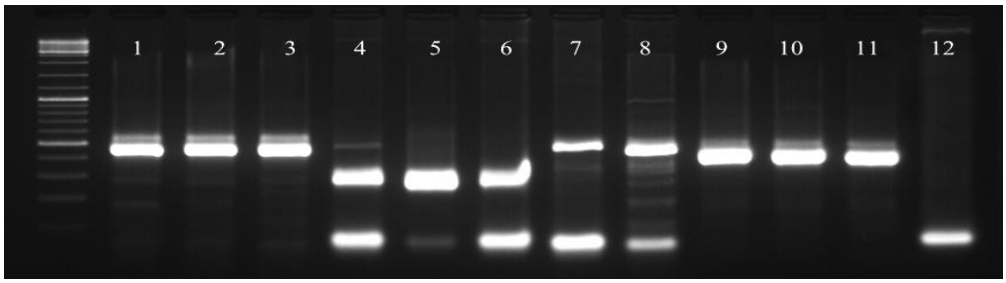

Fig.3 Detection of Phytoplasma witches' broom genomic DNA using multiplex PCR. 1-8 = cassava sample, 9 = *Vernonia cinerea* 10-11= *Anaphalis magaritacea* ,12 = Healthy plant.

5.การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากการแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ16SrI group และ 16SrII group จำนวน 6 ตัวอย่าง ลำดับนิวคลีโอไทด์ 413 bp และ 219 bp เมื่อเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับไอโซเลทของไทยที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อ *Ca.* P. 16SrI group และ *Ca.* P. 16SrII group จำนวน 6 ตัวอย่าง ที่ศึกษาครั้งนี้มีค่าความคล้ายคลึงกันกับเชื้ ออยู่ที่ระดับ 95, 97 เปอร์เซ็นต์ **(Fig.4 and Fig.5)**

กรุงเทพมหานคร
22-24 พฤศจิกายน 2565

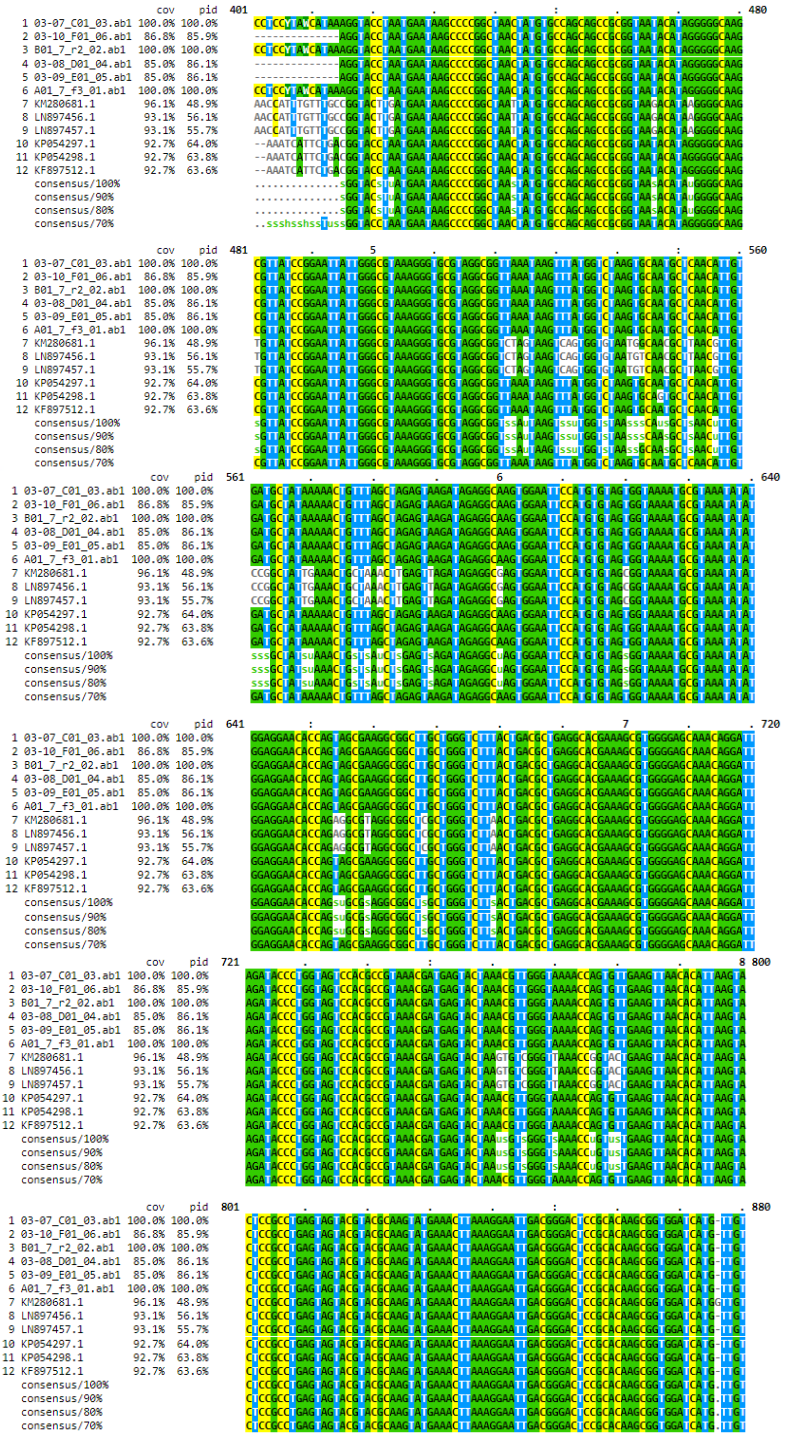

Fig.4 DNA sequence alignment diagram for 16S rRNA gene sequences of the phytoplasma witches' broom genome of Cassava. The alignment was obtained by using clustal omega software.

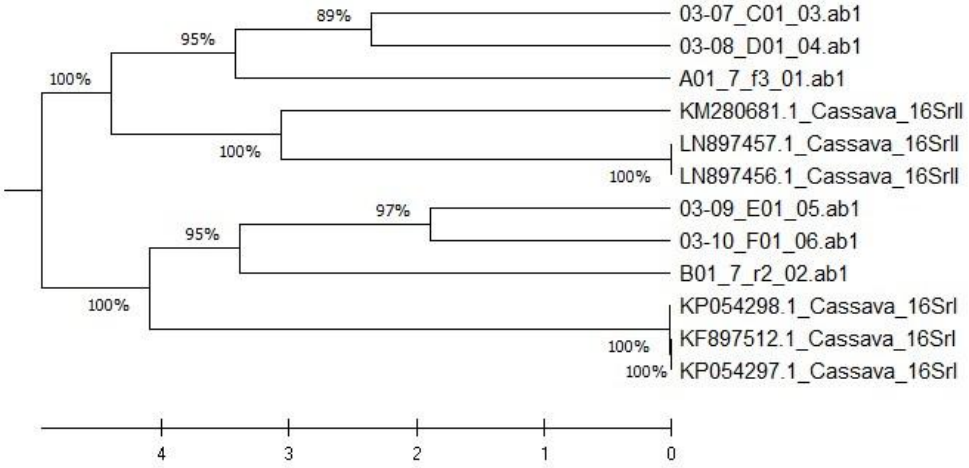

Fig.5 Phylogenetic tree constructed on the basis in 16S rRNA gene sequences from phytoplasma found in association with cassava witches' broom (16SrII group = 03-07,03-08 and A01; 16SrII group = 03-09, 03-10 and B01) by neighbor-joining method.

6.การเปรียบเทียบวิธีการ Multiplex-PCR และ Nested-PCR

ผลการเปรียบเทียบกับวิธี multiplex-PCR และวิธี Nested-PCR ตามวิธีการของ (Jung *et al*., 2003) ที่ได้นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ พบว่าวิธี Nested-PCR ทุกตัวอย่างดีเอ็นเอพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นยีนขนาด 1,200 bp และ 1,100 bp จำนวน 2 ตัวอย่าง แสดงถึงตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อสูง และเพิ่มปริมาณชิ้นยีนข นาด 1,100 bp จำนวน 20 ตัวอย่าง **(Fig.6)** แสดงถึงตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อต่ำ โดยวิธี multiplex-PCR สามารถตรวจสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นขนาด 413 bp จำนวน 6 ตัวอย่าง แสดงถึงตัวอย่างติดเชื้อไฟโตพลาสมา 16SrI group ขนาด 219 bp จำนวน 14 ตัวอย่าง **(Fig.7)** จากการทดสอบนี้ พบว่าวิธี Multiplex-PCR สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อสาเหตุโรคพุ่มแจ้ได้ และสามารถจำแนกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อได้ยังลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาเพียงรอบเดียว

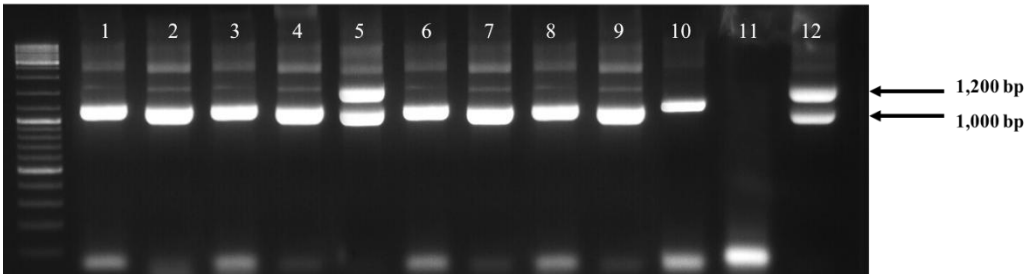

Fig.6 Detection of Phytoplasma witches' broom genomic DNA using Nested PCR. 1-10 = cassava sample, 11 = Healthy plant, 12 = Infected plant.

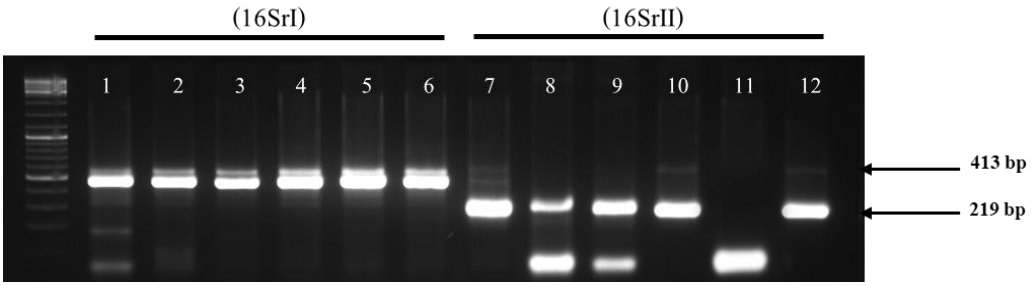

Fig.7 Detection of Phytoplasma witches' broom genomic DNA using Multiplex PCR.
1-10 = cassava sample, 11 = Healthy plant, 12 = Infected plant.

สรุปผลการทดลอง

การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค พุ่มแจ้ในมันสำปะหลัง ด้วยวิธี Multiplex PCR ที่ออกแบบไพรเมอร์ใหม่สามารถจำแนกชนิดได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ *Ca.* P. 16Srl group และ 16Srll group ที่ขนาดชิ้นยีน 413 bp และ 219 bp จากตัวอย่าง 20 การเปรียบเทียบความไวกับ วิธี Nested PCR พบว่าการใช้วิธี Multiplex PCR มีความไวมากกว่าวิธี Nested PCR ถึง100 เท่า ทำให้สามารถตรวจสอบเชื้ อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคมันสำปะหลังได้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้ น โดยมีความจำเพาะกับกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมา *Ca.* P. 16Srl group และ 16Srll group ในมันสำปะหลังและสามารถตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ในพืชอื่นๆ เช่น สาบม่วง และหญ้าหน าดน้อย แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับดีเอ็นพืชปกติ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อ *Ca.* P. 16Srl group จำนวน 3 ตัวอย่าง และ 16Srll group จำนวน 3 ตัวอย่าง จากท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ ของไทยที่มีรายงานใน GenBank ซึ่งเป็นเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม *Ca.* P. กลุ่ม 1 และกลุ่ม 2 พบว่าเชื้อจากท่อนพันธุ์สำปะหลังมีความคล้ายคลึงกับเชื้อไฟโตพลาสมา 16Srl (KP054298.1) ถึง 95 % เชื้อไฟโตพลาสมา 16SrII group มีความคล้ายคลึง (LN897457.1) ถึง 97 % ข้อมูลความคล้ายคลึงกันของเชื้อนี้สามารถนำมาใช้ประกอบการตัดสินใจในการกำหนดมาตรการด้านกักพืชสำหรับการนำเข้าท่อนพันธุ์มันสำปะหลังจากภายนอกได้ และการป้องกันกำจัดทั้งพืชอาศัยและมันสำปะหลังที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. Product มันสำปะหลังโรงงาน [ออนไลน์]. 2561, แหล่งที่มา : https://www.moac.go.th/news-preview-401191791243มันสำปะหลัง_ค้นเมื่อ 11 สิงหาคม 2565.

สุภาพร กลิ่นคง วาสนา รุ่งสว่าง ปัณฑา ขวัญทองยิ้ม และคนึงนิตย์ เหรียญวรากร. 2559. การจัดจำแนกในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในโรคพุ่มแจ้ – โรคอุบัติใหม่ของมันสำปะหลังในประเทศไทย. ว.วิทย.กษ. 47(2):175-188.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. Product มันสำปะหลังโรงงาน [ออนไลน์]. 2565, แหล่งที่มา : http://mis-app.oae.go.th/product/มันสำปะหลัง_ค้นเมื่อ 11 สิงหาคม 2564.

Jung, N.Y., T. Sawayanagi, P. Wongkaew, S.Kakizawa, H. Nishigawa,W. Wei, K.Oshima, S. Miyata, U. Ugaki, T. Hibi, and S. Namba.2003. '*Candidatus* Phytoplasma oryzae', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.53:1925-1929.

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.

Christensen N.M., Axelsen K.B., Nicolaisen M. and Schulz A. 2005. Phytoplasma and their interaction with hosts. *Trends Plant Sci* 10: 526-535.

Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2002. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.11thed. Missouri: Mosby, Inc.

Moonjuntha P., Pao K., Sophary K .and Natsuaki K.T . 2019a .First report of '*Ca* .Phytoplasma aurantifolia 'related phytoplasma associated with cassava witches 'broom disease in Cambodia .*In* The 2019 Annual Meeting of the Phytopathological Society of Japan at Tsukuba International Conference Center, Ibaraki Japan, March 18 –20, 2019.

กรุงเทพมหานคร
22-24 พฤศจิกายน 2565