วารสารแก่นเกษตร

Khon Kaen Agriculture Journal SUPPL.
Agricultural Conference
Journal Home Page : https://ag2.kku.ac.th/kaj

JOURNAL KAJ

การพัฒนาเทคนิค Multiplex-PCR ในการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว โรคใบขาวแตกกอฝอย และโรคกอตะไคร้อ้อยในครั้งเดียว

Development of one-step multiplex-PCR for identification of three Phytoplasma species causing Sugarcane White leaf, Grassy shoot and Green grassy shoot

วีรกรณ์ แสงไสย์[1]*, เบญจวรรณ รัตวัตร์[1], น้ำผึ้ง ชมภูเขียว[1], อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ[2] และ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล[1]

Weerakorn Saengsai[1]*, Benjawan Ruttawat[1] Namphueng Chomphukheaw[1] and Suchirat Sakuanrungsirikul[1]

[1] ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น
[1] Khon Kaen Field Crop Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, Muang, Khon Kaen
[2] ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน อำเภออู่ทอง จังหวัดสุพรรณบุรี
[2]Suphanburi Field Crops Research Center, Field and Renewable Energy Crops Research Institute, U-thong, Suphanburi

บทคัดย่อ: โรคใบขาว โรคใบขาวแตกกอฝอย และโรคกอตะไคร้ เป็นโรคอ้อยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาที่ต่างกัน สร้างความเสียหายอย่างมากต่ออุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลของประเทศไทย งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนา Multiplex-PCR ในการตรวจยืนเป้าหมายของเชื้อไฟโตพลาสมาทั้งสามชนิดในครั้งเดียว ซึ่งเป็นยีนบริเวณ 16S rRNA ตรวจพบได้ในเชื้อไฟโตพลาสมาหลายชนิด จากการทดลองพบว่าสามารถพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลในการตรวจจับยีนชนิดนี้ได้ มีความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย สามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยได้ทั้ง 3 ชนิด ที่สามารถแยกขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ปรากฏจากผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ คือ ขนาด 340 bp 230 bp และ 120 bp แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างจากหญ้าและโรคอื่นของอ้อย แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ทดสอบได้มีถูกต้อง แม่นยำ และจำเพาะต่อเชื้อในอ้อย สภาวะ ความไวในการทำปฏิกิริยาตรวจพบเชื้อได้ต่ำถึง 10^{-6} จาก 50 นาโนกรัมในดีเอ็นพืช ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการตรวจคัดกรองโรคไฟโตพลาสมาในอ้อยก่อนการขยายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและสามารถจำแนกชนิดเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อได้ มีความไวและยังลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียงรอบเดียว
คำสำคัญ: Multiplex-PCR; ไฟโตพลาสมา; โรคใบขาว; โรคใบขาวแตกกอฝอย; โรคกอตะไคร้

ABSTRACT: Phytoplasma cause of disease in sugarcane such as sugarcane white leaf, sugarcane grassy shoot and sugarcane green grassy shoot diseases are the most devastating diseases that impact great lost in sugarcane and sugar industries in Thailand. The aim of this study was to development of one-step multiplex-PCR for identification of three Phytoplasma in one step. The 16S rRNA gene is detected in many phytoplasma species. The result revealed that the primers showed specificity in detection of the 3 species of phytoplasmas in sugarcane, Three PCR products according to variation of sizes after PCR of a particular gene such as 340 bp 230 bp and 120 bp, uncrossed reaction phytoplasmas in grass and sugarcane leaf scald disease samples, and the sensitivity for detectable concentration of phytoplasma was equivalence to 10^{-6} of 50 ng plant DNA. This method can be used as an effective screening of the sugarcane prior to propagation and can identify infectious phytoplasma species It is sensitive and shortens the detection time through a one reaction cycle.
Keywords: Multiplex-PCR; phytoplasma; white leaf disease; grassy shoot disease; green grassy shoot disease

* Corresponding author: weerakorn.saengsai@gmail.com

บทนำ

จากการสำรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยในประเทศไทย ประกอบด้วยไฟโตพลาสมา 3 ชนิด คือ เชื้อโรคใบขาว (sugarcane white leaf: SCWL) โรคใบขาวร่วมกับอาการกอฝอย (sugarcane grassy shoot : SCGS) และโรคกอตะไคร้ (sugarcane green grassy shoot : SCGGS) โรคใบขาวและโรคใบขาวร่วมกับอาการกอฝอย จะมีอาการของโรคใกล้เคียงกันและมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ใกล้ชิดกัน โดยมีเพลี้ยจักจั่น 2 ชนิด คือ *Matsumuratetrix hiroglyphicus* และ *Yamatotrtrix flavovitatus* (Matsumoto et al., 1968; Hanboonsong et al., 2002) เป็นพาหะนำโรคแต่ในส่วนของ SCGGS นั้นยังไม่มีรายงานของพาหะนำโรค จึงทำให้ยังไม่สามารถควบคุมการแพร่ระบาดของโรค SCGGS นี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งโรคนี้ไม่แสดงอาการใบขาว จึงทำให้การกำจัดกระทำได้ยาก

อ้อยที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอยู่ภายในต้นแล้วนั้น อาจแสดงอาการหรือไม่แสดงอาการก็ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่อยู่ในต้นอ้อยนั้น และความสมบูรณ์ของต้นอ้อย กล่าวคือถ้าอ้อยสมบูรณ์ ได้รับน้ำ ปุ๋ย แสงแดดต่อเนื่องสม่ำเสมอ อ้อยจะเจริญเติบโตเป็นปกติ โดยไม่แสดงอาการใบขาว แต่เมื่อไหร่ก็ตามที่อ้อยกระทบแล้งน้ำท่วม ขาดปุ๋ย อ่อนแอด้วยปัจจัยต่าง ๆ หรือผ่านการเก็บเกี่ยวกลายเป็นอ้อยตอ อ้อยก็จะแสดงอาการของโรคใบขาวได้ในทันที ดังนั้น การนำท่อนพันธุ์อ้อยที่เป็นโรคซึ่งไม่ว่าจะแสดงอาการของโรคหรือไม่ก็ตาม ไปปลูกต่อก็เป็นช่องทางให้เกิดการกระจายอ้อยที่เป็นโรคออกไป การศึกษาเชิงลึกในส่วนของยีนที่แสดงถึงความจำเพาะของชนิดของเชื้อต่อแมลงพาหะ จะเป็นแนวทางที่จะช่วยให้จัดการแมลงพาหะและพืชอาศัยได้รวมทั้งการพัฒนาวิธีการตรวจที่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อเหล่านี้ จะทำให้การจัดการโรคที่เกิดจากไฟโตพลาสมาเหล่านี้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

การศึกษาด้วยเทคนิคการตรวจลำดับเบสของยีนเป้าหมายจะทำให้การวิจัยและพัฒนามีความแม่นยำสูง และใช้ระยะเวลาในการพัฒนาได้อย่างรวดเร็วมากกว่าการทดสอบการถ่ายเชื้อด้วยวิธีการแบบดั้งเดิม การใช้เทคนิค multiplex-PCR เป็นการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์เพียงครั้งเดียวแต่สามารถตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาได้หลาย ๆ ชนิดในครั้งเดียวกันสามารถดำเนินการเสร็จภายในวันเดียวกัน หลักการคือการเพิ่มขยายดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ primer หลายคู่พร้อมกันในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยไพรเมอร์แต่ละคู่ที่นำมาต้องออกแบบให้ดี โดยไม่มีการ complementary กัน และเมื่อนำไปทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะให้ผลผลิตที่มีขนาดของชิ้นยีนที่แตกต่างกันการทำ multiplex-PCR ต้องปรับสภาวะพอเหมาะของปฏิกิริยา เพื่อให้สามารถเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอจากทุก primer ที่ใส่ลงไปได้เท่ากัน และเนื่องจากในปฏิกิริยานี้จะมี primer หลายคู่และเมื่อใช้ primer เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการรบกวนในปฏิกิริยามากขึ้นจึงทำให้การปรับสภาวะเพื่อให้เหมาะสมที่สุดยิ่งยากไปด้วย (Forbes et al., 2002) ดังนั้นการประยุกต์วิธีการดังกล่าวนี้จะทำให้สามารถเพิ่มความไวให้กับวิธี direct PCR ได้ โดยไม่ต้องใช้เทคนิค nested-PCR สามารถใช้ตรวจยีนเป้าหมายทั้ง 3 ชนิดในที่นี้ ได้แก่ 16S-23S rDNA ในปฏิกิริยาชุดเดียวกัน หรือเรียกว่า multiplex-PCR ได้ สำหรับเทคนิค multiplex- PCR เป็นอีกเทคนิคที่พัฒนาขึ้นให้มีความจำเพาะและรวดเร็วให้การตรวจเชื้อหลายๆ ชนิดพร้อมกันในครั้งเดียว จากการสำรวจโรคใบขาวของอ้อยตามพื้นที่ต่างๆ และนำแต่ละไอโซเลทมาหาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA พบว่าแต่ละไอโซเลทมีความเหมือนกัน 99-100% ในขณะที่มีการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S intergenic spacer region (ITS) ระหว่างดีเอ็นเอของ SCWL และ SCGS พบว่ามีความแปรปรวนชนิดการแทนที่เบส (Base substitution) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ แต่จากการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยใช้ข้อมูล ITS นั้นพบว่าดีเอ็นเอจาก SCWL และ SCGS มีความเหมือนกัน จนไม่สามารถแยกออกเป็นกลุ่มได้ ตรงข้ามกับ SCGGS ถูกแยกออกมาเป็นอีกกลุ่มอย่างชัดเจน (Sakuanrungsirikul et al., 2012; ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ และศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, 2559) พัชรี และพรเพ็ญ (2557) ได้พัฒนาเทคนิค multiplex-PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรคเฮโมรายิกเซปทิซีเมียในโค-กระบือ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ทำปฏิกิริยาในหลอดเดียวกัน สามารถจำแนกเชื้อได้จำนวน 88 สายพันธุ์ สอดคล้องกับวิธีทางซีรั่มวิทยาทุกสายพันธุ์ สามารถตอบผลได้ภายใน 1 วัน วิธีนี้จึงมีประโยชน์ที่จะนำมาใช้ให้ห้องปฏิบัติการตรวจโรคที่มีความรวดเร็ว อีกทั้งประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย การควบคุมการแพร่ระบาดของโรคใบขาวในปัจจุบันยังไม่มีประสิทธิภาพ ทำให้ประเทศไทยยังไม่สามารถควบคุมการแพร่ระบาดของโรคนี้ได้ สาเหตุหนึ่งเกิดจากการตรวจคัดกรองโรคที่ไม่ทั่วถึง หน่วยตรวจคัดกรองโรคมีจำนวนจำกัด ซึ่งมีสาเหตุมาจากวิธีการที่ใช้ในการตรวจโรคปัจจุบันยังมีความยุ่งยาก ซับซ้อน ราคาแพง ต้องใช้ผู้ชำนาญงาน การพัฒนาเทคนิคการตรวจคัดกรองโรคที่มีประสิทธิภาพ ใช้งานง่าย ราคาไม่แพง จะทำ

ให้สามารถเพิ่มหน่วยตรวจโรคในพื้นที่ได้มากขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการควบคุมการระบาดได้ทันการณ์ สามารถลดพื้นที่การระบาดลงได้ การตรวจวินิจฉัยโรคใบขาวที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันมีการพัฒนาขึ้นมามาก ทำให้ผู้ใช้สามารถเข้าใจผลการตรวจมากขึ้น มีการนำผลการตรวจไปปรับใช้กับงานวิจัยและพัฒนาอื่นได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2558) แต่ยังมีปัญหาของความจำกัดด้านเทคนิคที่ใช้นอกจากนี้แล้วในส่วนของการป้องกันและกำจัดโรค พบว่ายังคงใช้วิธีการกำจัดต้นที่มีอาการใบขาวทิ้ง แต่ยังขาดการบำรุงรักษาต้น การบริหารจัดการแปลงเพื่อสร้างความแข็งแรงแก่พืช

ดังนั้นจึงยังคงพบต้นที่แสดงอาการใบขาวมากขึ้นในตอต่อๆ มาจนต้องรื้อแปลงเนื่องจากผลผลิตต่ำไม่คุ้มค่าต่อการลงทุน การศึกษาในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อพัฒนาเทคนิคและนวัตกรรมที่มีประสิทธิภาพในการตรวจวินิจฉัยโรคใบขาวในอ้อยและการจัดการโรคใบขาวอย่างยั่งยืน โดยมุ่งประเด็นการแก้ปัญหาในด้านวิธีการตรวจที่ขาดประสิทธิภาพ ด้วยการประยุกต์วิธีการใหม่ที่ทำให้การตรวจมีความแม่นยำมากขึ้นใช้งานง่าย ใช้ระยะเวลาในการตรวจสั้นลงและราคาถูกลงกว่าวิธีการเดิม คิดค้นวิธีการกำจัดเชื้อในเนื้อเยื่อเพื่อนำมาใช้ในการสร้างอ้อยปลอดโรคใบขาวโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรวมทั้งหาแนวทางในการสร้างความแข็งแรงให้แก่อ้อย เพื่อให้สามารลดการระบาด และควบคุมโรคใบขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืน

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างพืชและการสกัดดีเอ็น: ในปี 2565 ออกสำรวจและเก็บตัวอย่างอ้อยที่มีอาการของโรคแตกต่างกัน คือ white leaf: SCWL, grassy shoot : SCGS และ green grassy shoot : SCGGS ที่สำรวจได้จากแหล่งระบาดของโรค 3 จังหวัด คือ จังหวัดกาญจนบุรี บุรีรัมย์ และจังหวัดศรีสะเกษ จำนวนอาการละ 10 ตัวอย่าง นำตัวอย่างเนื้อเยื่อใบอ้อย 1 กรัม ใส่ลงแล้วเติมไนโตเจนเหลวจากนั้นบดให้ละเอียดเป็นผงใส่ลงในสารละลายบัพเฟอร์ แล้วสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Li and Midmore (1999) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ ดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Nanodrop (NanoDrop Lite Spectrophotometer, ThermoScientific, USA)

การออกแบบไพรเมอร์: การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการวิจัยในครั้งนี้ได้ใช้เทคนิค Multiplex-PCR ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนยีนที่ต้องการมากกว่า 1 ยีนต่อ 1 ปฏิกิริยา เทคนิคนี้จะอาศัยการใช้ไพรเมอร์ที่มีความเพาะมากกว่า 1 คู่ในการทำปฏิกิริยา ข้อมูลของลำดับนิวโอไทด์นำมาจากฐานข้อมูล Genbank เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบไพรเมอร์ โดยการออกแบบไพรเมอร์เลือกบริเวณ 16S-23S rDNA, มีค่า GC content ประมาณ 50-60 % และมีค่า melting temperature (Tm) ของไพรเมอร์อยู่ระหว่าง 55-75 °C ตามหลักการออกแบบของ Namba et al., 1993 และ Wongkaew et al., 1997 และเนื่องจากเทคนิค Multiplex PCR ต้องใช้มีไพรเมอร์ที่มากกว่า 1 คู่ ดังนั้นควรคำนึงขนาด PCR product ที่เกิดขึ้น เพื่อง่ายต่อการตรวจวิเคราะห์ผล โดยขนาดของ PCR product ควรมีขนาดต่างกันอย่างน้อย 40 base pairs ในงานวิจัยในครั้งนี้ได้นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้จาก NCBI database แบบได้ออกแบบไพรเมอร์โดยใช้โปรแกรม BioEdit Sequence Alignment Editor Software version 7.0 ไพรเมอร์ที่ได้จากการออกแบบสำหรับวินิจฉัยการติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อย ด้วยเทคนิค Multiplex PCR โดยการตรวจวินิจฉัยนี้เป็นการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมา ได้ออกแบบไพรเมอร์ออกเป็นทั้งหมด 3 คู่ ซึ่งไพรเมอร์แต่ละคู่จะมีความจำเพาะกับยีนของเชื้อสาเหตุโรคทั้งสามโรค

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นด้วยเทคนิค Multiplex-PCR: ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการปรับความเหมาะสมของสารเคมีให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยได้ทำการปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ นอกจากนี้ยังได้ปรับความเหมาะสมของอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอน annealing ของปฏิกิริยา multiplex-PCR ความเหมาะสมของสารเคมีและอุณหภูมิที่ใช้นั้นจะมีการพิจารณาจากความคมชัดของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา 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) and 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 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาโดยกำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามเวลาดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา

40 วินาที และ ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที 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

การตรวจสอบความไวของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค Multiplex PCR เปรียบเทียบกับเทคนิค Nested PCR: การหาความไวจากการทำ serial dilution เป็น 25 ng/µl และเจือจางที่ระดับ 1-10^{-11} ของดีเอ็นเอแต่ละเชื้อ ได้แก่ โรคใบขาว โรคใบขาวแตกกอฝอยและโรคกอตะไคร้ โดยวิธีนี้จะต้องทราบความเข้มข้นของดีเอ็นเอ โดยสามารถวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงของ DNA ที่ความยาวคลื่น 260 nm ด้วยเครื่อง Nanodrop meter เพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิค multiplex PCR ตามวิธีการที่เหมาะสมเปรียบเทียบกับเทคนิค Nested PCR ตามวิธีการของ (Hanboonsong et al., 2006)

การตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์: ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ในเทคนิค multiplex-PCR เพื่อทดสอบการ cross amplification กับไฟโตพลาสมาชนิดอื่นๆ การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไฟโตพลาสมาถูกแบ่งออกเป็น positive specificity ซึ่งจะเป็นการทดสอบความจำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมา ได้แก่โรคใบขาว จำนวน 20 ตัวอย่าง โรคใบขาวแตกกอฝอย จำนวน 2 ตัวอย่าง โรคกอตะไคร้ จำนวน 2 ตัวอย่าง ส่วน negative specificity จะทดสอบกับตัวอย่างชนิดอื่นๆ เช่นโรคใบลวกเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 2 ตัวอย่าง และอาการใบเหลืองจากการขาดธาตุไนโตรเจน จำนวน 2 ตัวอย่าง

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา: นำผลิตผลพีซีอาร์ที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยวิธี dye terminator cycle sequencing ของบริษัทแปซิฟิกไซแอนซ์ประเทศไทย แล้วนำผลและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยใน GenBank database เข้าสู่โปรแกรม ClustalW ใน Bioedit program (http://www.mbio.ncsu/edu/bioedit/.html) (Hanboonsong et al., 2006)

ผลการศึกษา

ไพรเมอร์จำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย : ผลการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ได้ออกแบบจากยีนเป้าหมายบริเวณ 16S-23S rDNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตรพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย จำนวน 3 คู่ ได้แก่โรคใบขาว SCWL-F/ SCWL-R ขนาด 340 คู่เบส ค่า Tm 58 °C โรคใบแตกกอฝอย SCGS-F/SCGS-R ขนาด 230 คู่เบส ค่า Tm 60 °C โรคกอตะไคร้ SCGGS-F/ SCGGS-R ขนาด 120 คู่เบส ค่า Tm 59 °C **(Figure 1)**

สภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Multiplex-PCR: ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา 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 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาโดยกำหนดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามเวลาดังต่อไปนี้ ขั้นที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 3 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 62 °C เป็นเวลา 40 วินาที และ ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที โดยทำซ้ำขั้นตอนที่ 2 จำนวน 35 รอบ ขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที และที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที

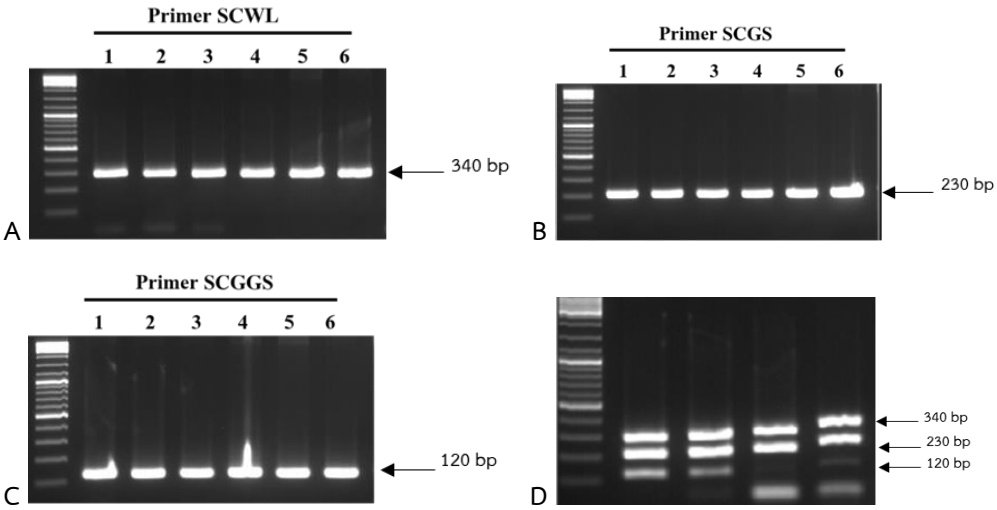

Figure 1 Detection of Phytoplasma genomic DNA using multiplex-PCR using 3 pairs of 16S rRNA primers.

A.PCR amplicons of sugarcane white leaf: Lane2-7= phytoplasma genomic DNA Sugarcane white leaf sample

B.PCR amplicons of sugarcane grassy shoot: Lane2-7= phytoplasma genomic DNA Sugarcane grassy shoot sample

C.PCR amplicons of sugarcane green grassy shoot: Lane2-7= phytoplasma genomic DNA Sugarcane grassy shoot sample

D.PCR amplicons of 3 phytoplasma in one-step multiplex-PCR: Lane2-5= mix phytoplasma genomic DNA

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} Multiplex-PCR สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-6} ในคู่ไพรเมอร์ SCWL **(Figure 2A)** และ SCGS **(Figure 2B)** ส่วน ไพรเมอร์ SCGGS **(Figure 2C)** สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดอยู่ที่ความเข้มข้น 10^{-4} (**Figure 2D**) เปรียบเทียบกับวิธี nested PCR **(Figure 3)** สามารถตรวจพบเชื้อต่ำสุดที่ความเข้มที่ 10^{-11}

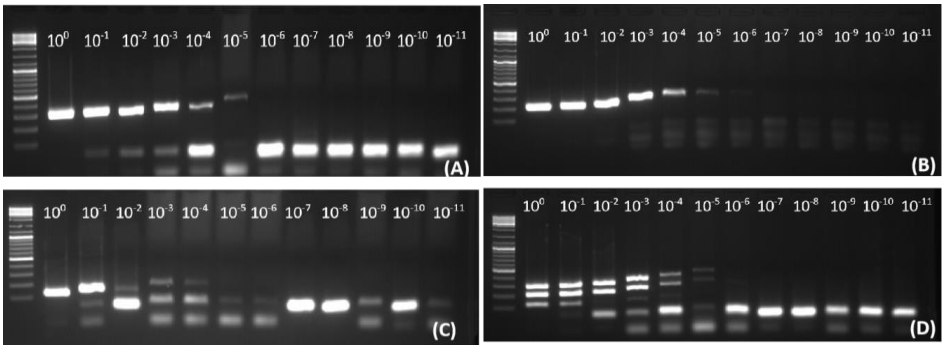

Figure 2 Serial dilutions of Phytoplasma genomic DNA concentration using multiplex-PCR.

A.PCR amplicons of sugarcane white leaf: Lane2-12= dilution of phytoplasma genomic DNA Sugarcane white leaf sample

B.PCR amplicons of sugarcane grassy shoot: Lane2-12= dilution of phytoplasma genomic DNA Sugarcane grassy shoot sample

C.PCR amplicons of sugarcane green grassy shoot: Lane2-12= dilution of phytoplasma genomic DNA Sugarcane grassy shoot sample

D.PCR amplicons of 3 phytoplasma in one-step multiplex-PCR: Lane2-12= dilution of mix phytoplasma genomic DNA

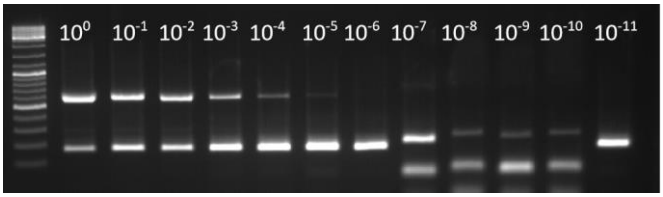

Figure 3 Phytoplasma genomic DNA concentration by Nested-PCR primers.

การทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา Multiplex-PCR: ผลการนำตัวอย่างอ้อยมาตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยทดสอบการ cross amplification กับไฟโตรพลาสมาในพืชชนิดอื่นๆ ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว จำนวน 2 ตัวอย่าง โรคใบขาวแตกกอฝอย จำนวน 2 ตัวอย่าง โรคกอตะไคร้ จำนวน 2 ตัวอย่าง ตัวอย่างอ้อยใบเขียวไม่แสดงอาการ จำนวน 20 ตัวอย่าง ตัวอย่างอ้อยที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา เช่น โรคใบลวก จำนวน 2 ตัวอย่าง อาการขาดธาตุไนโตรเจนจำนวน 2 ตัวอย่าง พบว่า เทคนิค Multiplex-PCR มีความจำเพาะกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคทั้งสามโดยไม่ทำปฏิกิริยากับโรคใบลวกและพืชที่มีอาการขาดธาตุ และดีเอ็นพืชปกติ จากการตรวจวิเคราะห์ในตัวอย่างอ้อยใบเขียวไม่แสดงอาการ จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่ามีการติดเชื้อใบขาวทั้งหมดและมี 2 ตัวอย่าง ที่ติดทั้งเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวและโรคใบขาวแตกกอฝอย **(Table 1)**

Table 1 Detection of sugarcane phytoplasma genomic DNA using Multiplex-PCR

Sample DNA=25 ng/ul (pipet 3ul)	Multiplex-PCR detection		
	SCWL 340bp	SCGS 230bp	SCGG 120 bp
101	+	+	-
102	+	-	-
103	+	-	-
104	+	+	-
105	+	-	-
106	+	+	-
107	+	-	-
108	+	-	-
109	+	-	-
111	+	-	-
112	+	-	-
113	+	-	-
114	+	-	-
115	+	-	-
116	+	-	-
117	+	-	-
118	+	-	-
119	+	-	-
120	+	-	-
Leaf scald1	-	-	-
Leaf scald2	-	-	-
Glassy shoot1	-	+	-
Glassy shoot2	-	+	-
Green glassy shoot1	-	-	+
Green glassy shoot2	-	-	+
White leaf1	+	-	-
White leaf2	+	-	-
Physio-disorder1	-	-	-
Physio-disorder2	-	-	-

+ = detected, - = non-detected

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา: ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จากการแยกเป็น 3 กลุ่ม คือ white leaf: SCWL, grassy shoot : SCGS และ green grassy shoot : SCGGS ลำดับนิวคลีโอไทด์ 340 bp 230 bp และ 120 bp เมื่อเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับไอโซเลทของไทยที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเชื้อ white leaf: SCWL คล้ายคลึงกันกับข้อมูล KJ18021.1 ในฐานข้อมูล NCBI มีความคล้ายคลึงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ grassy shoot : SCGS มีค่าความคล้ายคลึงกับข้อมูล MT510185.1 ในฐานข้อมูล NCBI มีความคล้ายคลึงถึง 97 เปอร์เซ็นต์ และที่ green grassy shoot : SCGGS มีค่าความคล้ายคลึงกันกับกับข้อมูล KF908793.1 ในฐานข้อมูล NCBI มีความคล้ายคลึงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ **(Figure 4)**

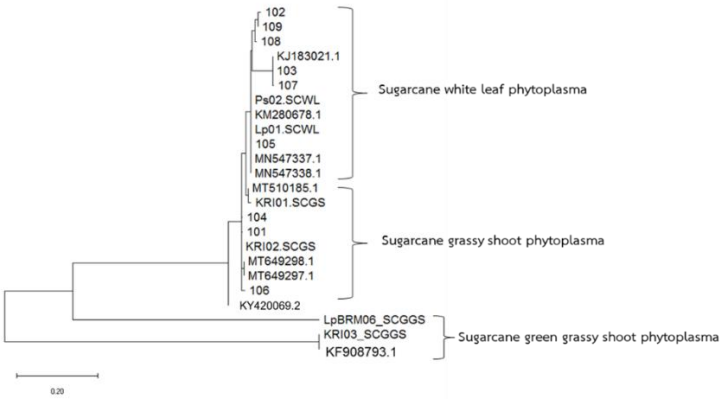

Figure 4 Phylogenetic tree constructed by using the 16S/23S spacer sequences from phytoplasma strains. The bar represents the phylogenetic distance of 5 %. Numbers on branches are confidence percentage obtained from 1,000 bootstrap replicates.

การเปรียบเทียบวิธีการ Multiplex-PCR และ Nested-PCR: ผลการเปรียบเทียบกับวิธี multiplex-PCR และวิธี nested-PCR ตามวิธีการของ (Hanboonsong et al., 2005) ที่ได้นำไพรเมอร์ที่ออกแบบได้มาวิเคราะห์กลุ่มตัวอย่างพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อย พบว่า วิธี nested-PCR ทุกตัวอย่างดีเอ็นเอพืชที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นยีนขนาด 210 bp จำนวน 10 ตัวอย่าง และมีตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อสูงจะเพิ่มชิ้นยีนได้ขนาด 700 bp และ 210 bp จำนวน 2 ตัวอย่าง **(Figure 5)** โดยวิธี multiplex-PCR สามารถตรวจสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นขนาด 340 bp จำนวน 5 ตัวอย่าง แสดงถึงตัวอย่างติดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาว เพิ่มปริมาณชิ้นขนาด 230 bp แสดงถึงตัวอย่างติดเชื้อไฟโตพลาสมาใบขาวแตกกอฝอย และเพิ่มปริมาณชิ้นขนาด 120 bp จำนวน 2 ตัวอย่าง **(Figure 6)** จากการทดสอบนี้พบว่าวิธี multiplex-PCR สามารถตรวจวิเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยได้ และสามารถจำแนกชนิดเชื้อไฟโตพลาสมาที่ติดเชื้อได้ยังลดระยะเวลาในการตรวจวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยาเพียงรอบเดียว

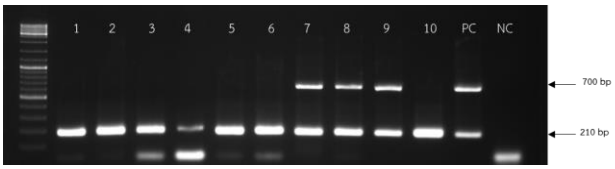

Figure 5 Detection of sugarcane phytoplasma genomic DNA using Nested PCR. 1-10 = sugarcane sample, PC= positive control, NC = negative control.

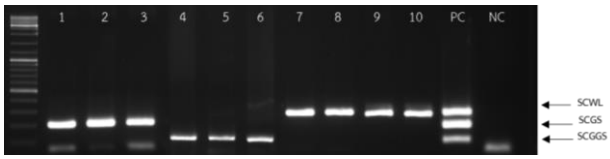

Figure 6 Detection of sugarcane phytoplasma DNA genomic DNAusing Multiplex PCR. 1-3 = white leaf: SCWL, 4-6 = grassy shoot: SCGS, 7-10 = green grassy shoot: SCGGS PC= positive control, NC = negative control

วิจารณ์

ยีนเป้าหมายที่ใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย ได้แก่ 16S rRNA gene และ secA gene (ศุจิรัตน์ และคณะ 2556, Hanboonsong et al., 2006) โดยที่ secA gene เป็น single-copy gene ในจีโนมของเชื้อไฟโตพลาสมา และ rRNA นั้นมีรายงานว่ามี

2 copies วิธีการตรวจแต่ละวิธีที่ใช้ในปัจจุบันมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ความจำเพาะของไพรเมอร์ชุด SCWL-F/ SCWL-R, SCGS-F/SCGS-R, SCGGS-F/ SCGGS-R เทียบกับ ชุดไพรเมอร์ MLO-X/MLO-y และ P1/P2 โดยการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย พบว่า ไพรเมอร์ชุดหลังเกิดแถบดีเอ็นเอหลายขนาด ในขณะเมื่อยีน SCWL-F/ SCWL-R, SCGS-F/SCGS-R, SCGGS-F/ SCGGS-R เกิดแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวถึงแม้ยีน 16s-23s rDNA จะถูกระบุว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย (ชนานัฐ และคณะ, 2555) การจำแนกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย จากรายงานของ ศุจิรัตน์และคณะ (2555) ที่ใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 16s-23s rDNA พบว่า โรคใบขาวทั้งสามอาการดังกล่าวเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาต่างกัน โดยกลุ่มอาการใบขาวมีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับ SCWL phytoplasma (KJ18021.1) ในฐานข้อมูล NCBI กลุ่มอาการใบขาวแตกกอฝอยตรงกับ SCGS phytoplasma (MT510185.1) กลุ่มอาการกอตะไคร้ตรงกับ SCGGS phytoplasma (KF908793.1) ในฐานข้อมูล NCBI ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับในงานวิจัยในครั้งนี้ตาม (อัปสร และคณะ, 2540) ได้รายงานอาการดังกล่าวไว้การเปรียบเทียบจำนวนความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิด นี้รวมทั้งไอโซเลต SCWL ที่มีความแปรปรวนด้วยตำแหน่ง 16s-23S rDNA พบความแปรปรวนเพียง 4 จุดเท่านั้น จากสายดีเอ็นเอยาว 209-212 เบส และจากรายงาน ศุจิรัตน์และคณะ (2564) ลำดับนิวคลีโอไทด์ IMP gene ในตัวอย่าง พบว่ามีความ แปรปรวนอยู่ที่ 22 จุด ที่มีขนาดชิ้น 262 เบส จากผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวนี้จึงแสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง SCWL-F/ SCWL-R, SCGS-F/SCGS-R, SCGGS-F/ SCGGS-R สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมในการจัดจำแนกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคอ้อยได้ละเอียดยิ่งขึ้นสามารถจำแนกถึงสามชนิด

สรุป

การพัฒนาวิธีตรวจโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยวิธีใหม่ด้วยเทคนิค multiplex-PCR ที่ออกแบบไพรเมอร์ใหม่สามารถตรวจจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาได้ 3 ชนิด ได้แก่ white leaf: SCWL, grassy shoot : SCGS และ green grassy shoot : SCGGS มีชิ้นยีนขนาด 340 bp 230 bp และ 120 bp การเปรียบเทียบความไวระหว่างวิธี multiplex-PCR และ nested-PCR พบว่า วิธี Nested-PCR มีความไวมากกว่าสามารถตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา (ดีเอ็นเอพืช 50 นาโนกรัม) ได้เจือจางถึง 10^{-11} ส่วน multiplex-PCR ที่พัฒนาขึ้นมีความไวตรวจเชื้อไฟโตพลาสมา (ดีเอ็นเอพืช 50 นาโนกรัม) ได้เจือจางถึง 10^{-6} ตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยทดสอบการ cross amplification กับไฟโตรพลาสมาในพืชชนิดอื่นๆ ไพรเมอร์มีความจำเพาะกับกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว โรคใบขาวแตกกอฝอย และโรคกอตะไคร้ โดยไม่ทำปฏิกิริยากับโรคใบลวกและพืชที่มีอาการขาดธาตุ และดีเอ็นพืชปกติ ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคอ้อยสามารถแยกชนิดได้ โดยไม่จับไฟโตพลาสมาในพืชอื่นหรือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น การวิเคราะห์ชิ้นยีนที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค genotyping พบว่า ให้ผลสอดคล้องกัน และการตรวจข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นดีเอ็นเอได้เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลสากลพบว่าถูกต้อง วิธีการใหม่นี้ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเ อด้วยพีซีอาร์ประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที ทำให้สามารถรู้ผลการตรวจได้รวดเร็วและไม่มีการปนเปื้อนในปฏิกิริยาควบคุม ดังนั้นจึงเป็นวิธีการที่สามารถใช้ในการตรวจโรคไฟโตพลาสมาในอ้อยได้อย่างแม่นยำ ถูกต้อง และรวดเร็ว เมื่อเทียบกับวิธี nested-PCR ตรวจเชื้อบริเวณตำแหน่ง 16s-23s rDNA พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอได้กับเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่อยู่ภายในพืชได้ ซึ่งอาจไม่ใช่ก่อโรคได้ และไม่จำเพาะต้องชนิดพืช และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์รวมประมาณ 5 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

ชนาณัฐ แก้วมณียุพา, หาญบุญทรง และทัศนีย์ แจ่มจรรยา. 2555. ผลของอุณหภูมิต่อแมลงพาหะ *Matsumuratettix hiroglyphicus* นำโรคใบขาวอ้อย. แก่นเกษตร. 40(ฉบับพิเศษ 3): 274-280.

ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ และศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล. 2559. การแยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคอ้อยด้วยวิธี High-Resolution Melting. *ใน*: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 54 วันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2559. กรุงเทพฯ. 2540. หน้า 399-406. หน้า 147-154.

พัชรี ทองคำคูณ และพรเพ็ญ พัฒนโสภน. 2557. การพัฒนาเทคนิค multiplex PCR ในการตรวจวินิจฉัยโรคเฮโมรายิกเซปทิซีเมียในโค-กระบือ. วารสารสถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ. 9(2):1-10.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์ม สุรศักดิ์ แสนโคตรม ทักษิณา ศันสยะวิชัย และสุนี ศรีสิงห์. 2556. SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูง. ผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2555. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-15.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์, สุนี ศรีสิงห์ และปิยะดา ธีรกะกุลพิสุทธิ์. 2555. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้าบางชนิดของประเทศไทย จากลำดับนิวคลิโอไทด์บริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region. แก่นเกษตร. 40 (ฉบับพิเศษ 3): 231-240.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, ธีรวุฒิ วงศ์วรัตน์, ทักษิณา ศันสยะวิชัย, สุนี ศรีสิงห์, รังสี เจริญสถาพรประพันธ์, ประเสริฐศักดิ์ และกอบเกียรติ ไพศาลเจริญ. 2558. วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2557. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 69-89.

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล, เบญจวรรณ รัตวัตร์, วีรกรณ์ แสงไสย์, วิทยาศรี ภักดี, จุฑามาศ สอนเมือง, Youichi kobori และ Shigeyuki Kakizawa. 2564. การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในอ้อยด้วยยีน Immunodominant membrane protein (Imp). แก่นเกษตร. 49(ฉบับพิเศษ 1): 265-271.

อัปสร เปลี่ยนสินไชย, นงลักษณ์ ศรินทุ, สิริภัทร์ พราหมณีย์. 2540. ศึกษาอาการการเกิดโรค สาเหตุของอาการกอตะไคร้ของอ้อยการถ่ายทอดและการป้องกันกำจัด. *ใน*: การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. กรุงเทพฯ. หน้า 399-406.

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

Hanboonsong, Y., C. Choosai, S. Panyim, and S. Damak. 2002. Transovarial transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). Insect Molecular Biology. 11: 97–103.

Hanboonsong, Y., W. Ritthison, C. Choosai, and P. Sirithorn. 2006. Transmission of sugarcane white leaf phytoplasma by *Yamatotettix flavovittatus*, a new leafhopper vector. Journal of Economic Entomology. 99: 1531–1537.

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 Biotechnolog. 74(2): 224-231.

Matsumoto T., C.S. Lee, and W.S. Teng. 1968. Studies on sugarcane white leaf disease of Taiwan with special references to transmission by leaf hopper, *Epitettix higroglyphicus* Mats. Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists. 13:1090-1418.

Sakuanrungsirikul, S., T. Wongwarat, S. Sankot, K. Kawabe, Y. Kobori, and S. Ando. 2013. Sugarcane white leaf and sugarcane grassy shoot diseases in Thailand and their detection methods. International Society of Sugar Cane Technologists. Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists. 28: BP-7, Sao Paulo, Brazil.

Wongkaew, P., Y. Hanboonsong, P. Sirithon, C. Choosai, S. Boonkrong, T. Tinnangwattana, R. Kitchareonpanya, and S. Damak. 1997. Differentiation of phytoplasma associated with sugarcane and gramineous weed white leaf disease and sugarcane grassy shoot disease by RFLP and sequencing. Theoretical and Applied Genetics. 95:660-663.