

วิธีตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์

Detection and diagnosis of sugarcane white leaf disease by PCR method

ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล^{1/} ชีรวุฒิ วงศ์วรรณ์^{1/} ทักษิณา สันตยะวิชัย^{1/} สุนี ศรีสิงห์^{2/}

รังสี เจริญสถาพร^{3/} ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์^{3/} กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ^{4/}

Suchirat Sakuanrungrasirikul^{1/} Theerawut Wongwarat^{1/} Taksina Sansayawichai^{1/} Sune Srisink^{2/}

Rungsi Charaensataporn^{3/} Praphan Prasertsak^{3/} Kobkiat Paisancharoen^{3/}

ABSTRACT

Quantification of a plant pathogen is essential to study its population dynamic in various conditions and to relate symptom expression with pathogen concentration. So far very few methods to quantify phytoplasma in plant tissues were published and no report on white leaf disease phytoplasmas quantification in sugarcane. We report here the first efficient detection and diagnosis methods of sugarcane white leaf disease by PCR that are simple to use and to interpret. These techniques were developed to enable the detection, quantification, differentiation of phytoplasmas including result assimilation that integrated information from the relevant researches. Detection of the phytoplasmas was targeted at two genes for enhancing precisions. The detection at 16S-23S rDNA by nested-PCR produces 700 bp fragment from the first PCR set and 210 bp from a nested-PCR. By these means however, contamination with other bacteria can also be observed due to the non-specificity of the primers. Confirmation of sugarcane white leaf phytoplasma infection was done by highly specific primers to the *secretory membrane protein translocation gene A (secA)* using direct PCR that resulted in 277 bp. Estimation of phytoplasma concentration of both techniques was achieved by comparing banding intensities of the samples against the standard samples. A precise quantification of phytoplasmas (copy number) is done by real-time PCR amplification of the *secA* gene using cloned plasmids with *secA* fragments as standard curves. The lowest concentration that set in accepting range is 100 copies/μl (25 ng plant DNA). Discrimination of the three phytoplasmas related to white leaf disease including sugarcane white leaf (SCWL), sugarcane grassy shoot (SCGS) and sugarcane green grassy shoot (SCGGS) was performed by High Resolution Melting (HRM) technique with primers designated to detect single nucleotide polymorphisms (SNPs) in 16S-23S rDNA region by nested-PCR manner.

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น (Khon Kaen Field Crop Research Center)

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี (Supanburi Agriculture Research and Development Center)

³ สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน (Field and Renewable Energy Crops Research Institute)



Five color codes designed by incorporating detection result, elements obtained from research pertinent and suggestion were integrated to ease users' understanding and success utilizing. This work was conveyed at Khon Kaen Field Crops Research Center during 2011-2013. Over 1260 sugarcane samples were subjected for phytoplasma detection and diagnosis in 2014 by these new techniques. White leaf incidents followed up in 10 research centers that submitted samples for investigation conformed to the incident possibility predicted by the designed color codes.

Key-words : sugarcane, white leaf disease, phytoplasma, detection, genetic variation, color code, quantification, realtime PCR, High resolution melting, HRM, SCWL, SCGS, SCGGS, secA, nested-PCR, 16S-23S rDNA, SNPs, color codes

บทคัดย่อ

ปริมาณเชื้อในเนื้อเยื่อพืชเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของเชื้อในสภาวะต่างๆในงานวิจัย และการแสดงอาการของโรค ยังไม่มีรายงานการตรวจวัดปริมาณเชื้อโรคใบขาวในอ้อยมาก่อนงานที่นำเสนอนี้ได้ปรับ ประยุกต์ต่อยอดผลงานวิจัยหลายงาน และพัฒนาวิธีการเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวในอ้อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ แม่นยำ แปลผลง่าย และใช้งานได้ง่าย สามารถใช้ตรวจการติดเชื้อ ปริมาณเชื้อ แยกชนิดของเชื้อในอ้อย รวมทั้งวินิจฉัยโรคได้ วิธีการตรวจที่กล่าวมานี้ประกอบด้วย การตรวจหาดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากยีนเป้าหมายสองยีนเพื่อความแม่นยำของวิธีการ ได้แก่ ยีน 16S-23S rDNA ที่ตรวจด้วยวิธี nested-PCR ได้ผลเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 bp และ 210 bp ซึ่งใช้ระบุการติดเชื้อและประเมินปริมาณเชื้ออย่างคร่าวๆ ได้โดยการเทียบความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอ วิธีนี้ยังใช้บ่งชี้การปนเปื้อนเชื้ออื่นได้ด้วยซึ่งเกิดจากความไม่จำเพาะของชุดไพรเมอร์ ในการตรวจเพื่อยืนยันการติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยนั้น ได้พัฒนาวิธีการขึ้นเพื่อตรวจดีเอ็นเอของเชื้อบนเยื่อ *secretory membrane protein translocation gene A (secA)* มีขนาดชิ้นยีน 277bp การประเมินปริมาณเชื้อทำได้เช่นเดียวกับวิธีแรก การระบุจำนวนเชื้ออย่างละเอียด (จำนวนซ้ำ) ได้พัฒนาวิธีการตรวจที่ยีน *secA* ด้วยเครื่อง Realtime PCR โดยใช้พลาสติกที่มีชิ้นยีนนี้สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานสามารถตรวจได้ต่ำที่สุดคือ 100 copies/ μ l ในดีเอ็นเอพืช 25 นาโนกรัม ในการแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมานั้น ได้พัฒนาเทคนิค High Resolution Melting (HRM) ที่ออกแบบไพรเมอร์ให้ตรวจจับตำแหน่ง Single nucleotide polymorphisms (SNPs) บนสายของยีน 16S-23S rDNA ใช้การเพิ่มปริมาณด้วยวิธี nested-PCR สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยทั้ง 3 ชนิดได้ คือ sugarcane white leaf (SCWL), sugarcane grassy shoot (SCGS) และ sugarcane green grassy shoot (SCGGS) โดยไม่ต้องใช้การตรวจลำดับเบส การแปลผลการตรวจได้มีพัฒนาใหม่โดยใช้รหัสสีขึ้นหัวรหัสพร้อมคำอธิบายผลและข้อเสนอแนะซึ่งได้จากประมวลผลการตรวจเชื้อและข้อมูลจากการศึกษาใน



งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้ผู้ใช้เข้าใจง่ายขึ้นและใช้งานได้ง่าย การพัฒนาวิธีทั้งหมดที่กล่าวมานี้ ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยพืชไร่นอนแก่นระหว่างปี 2554-2557 ได้มีการทดสอบกับกลุ่มตัวอย่างอ้อยปี 2557 กว่า 1,260 ตัวอย่าง การติดตามการเกิดใบขาวในอ้อยตอนในกลุ่มตัวอย่างในศูนย์วิจัยและ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตร 10 ศูนย์ พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการคาดการณ์ด้วยรหัสสี

คำหลัก: อ้อย โรคใบขาว โรคกอตะไคร้ ไฟโตพลาสมา วิธีตรวจ ความแตกต่างของเชื้อ ปริมาณเชื้อ รหัสสี HRM Realtime PCR, nested-PCR, SNPs, รหัสสี

คำนำ

เชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อให้เกิดโรคใบขาวในอ้อยเป็นแบคทีเรียขนาดเล็ก ในกลุ่มแกรมบวก ไม่มีผนังเซลล์ มีจีโนมขนาดเล็กที่มีปริมาณ AT สูง (ประมาณ 70-80%; Oshima *et al.*, 2004) ถูกจัดอยู่ในชั้นมอลลิคิวเทส (Class Mollicutes) ภายในวงศ์ไมโคพลาสมา (Family Mycoplasmataceae) ชนิด *Candidatus phytoplasma* กลุ่ม 16SrXI : Rice yellow dwarf group (Zhao, *et al.*, 2010) อาศัยอยู่ในเซลล์ท่ออาหารของพืช ถ่ายทอดได้ด้วยเพลี้ยจักจั่นสีน้ำตาล (Weintraub and Beanland, 2006; Hanboonsong *et al.*, 2005, Matsumoto *et al.*, 1968) เชื้อนี้ไม่สามารถเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ได้ ทำให้ยังไม่มีวิธีกำจัดเชื้อที่มีประสิทธิภาพ ต้นที่ไม่แสดงอาการอาจมีเชื้อในปริมาณสูงหรือค่อนข้างต่ำและกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ ต้องใช้เทคนิคที่มีความไวสูง เช่น เทคนิคพีซีอาร์ ในการตรวจ ซึ่งอาจเป็นการใช้เทคนิคแบบดั้งเดิม (conventional PCR) หรือเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (real-time PCR) การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมามีการรายงานค่อนข้างน้อย และทั้งหมดตรวจด้วยการใช้เครื่อง Realtime PCR (Aldaghi *et al.*, 2006, Torres *et al.*, 2005, Jarausch, *et al.*, 2004) แต่ยังไม่มียารายงานในอ้อย

โรคใบขาวของอ้อยเป็นปัญหาสำคัญต่อผลผลิตอ้อยของไทย การระบาดที่รุนแรงเป็นวงกว้าง เกิดจากการนำท่อนพันธุ์ติดเชื้อไปขยายพันธุ์ต่อ แหล่งระบาดที่แสดงอาการรุนแรงมักอยู่ในแหล่งปลูกที่เป็นทรายจัด หรือมีชั้นดานเทียมสูง เช่น ในเขตอีสาน หรือบางแหล่งในภาคกลาง สถาบันวิจัยพืชไร่ฯ ได้ดำเนินการศึกษาวิจัยเพื่อหาแนวทางและวิธีการในการแก้ปัญหาโรคใบขาวอย่างจริงจังในหลายสาขาวิชา ส่วนใหญ่ยังอยู่ในระหว่างศึกษา และทดสอบเทคโนโลยี มีการศึกษาถึงสาเหตุในการเกิดโรคและการแสดงอาการวิธีป้องกันกำจัด และการลดความเสียหายที่เกิดจากโรคนี้ โดยเป้าหมายคืออ้อยไม่มีอาการใบขาว หรืออุบัติการณ์ใบขาวลดลง ซึ่งอาจเกิดได้จากหลายแนวคิดและวิธีการ เช่น ทำให้อ้อยมีความแข็งแรงจากการปรับสภาพแวดล้อมและสมดุลธาตุอาหารให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต การจัดการเพื่อป้องกันหรือลดภาวะเครียดในระหว่างการเจริญเติบโต การคัดเลือกต้นที่มีปริมาณเชื้อน้อยหรือใช้ต้นปลอดโรค สำหรับขยายพันธุ์ การควบคุมการแพร่กระจายของเชื้อเพื่อลดพื้นที่ระบาด หรือการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ต้นที่มีคุณลักษณะพิเศษทางพันธุกรรมที่ทำให้ทนโรคและควบคุมปริมาณเชื้อได้ งานวิจัยทั้งหมดนี้ล้วนต้องการข้อมูลการตรวจ



เชื้อ ปริมาณเชื้อ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเชื้อ (dynamics) หรือชนิดของเชื้อ ในการประกอบผล และวิเคราะห์ถึงความสำเร็จของวิธีการทั้งสิ้นรวมไปถึงการพยากรณ์การเกิดโรค หรือการศึกษาแมลง พาหะชนิดใหม่เพิ่มอีกด้วย

วิธีตรวจโรคใบขาวโดยทั่วไปในอ้อยนิยมใช้วิธี nested-PCR ซึ่งมีความไวสูง ใช้ไพรเมอร์ สองชุดสำหรับตรวจจับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ISR)(Srivastava *et al.*, 2006, Hanboonsong *et al.*, 2005)นอกจากนี้ยังมีวิธีอื่นอีก เช่น ใช้ probe หรือวิธีทางอิมมูโน โภชวิทยา แต่ละวิธีมีข้อดีและเสียแตกต่างกัน แต่วิธีการเหล่านี้เป็นเพียงการตรวจว่าพบหรือไม่พบเชื้อ เท่านั้น ที่ผู้นำผลตรวจที่ได้ไปใช้ได้อย่างจำกัด ยังไม่มีรายงานการตรวจปริมาณเชื้อที่ใช้เชื้อใบขาว เป็นค่าอ้างอิงอย่างแท้จริง ทำให้ผลการตรวจเป็นเพียงการเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของพืชที่มีเชื้อ รวมอยู่ด้วยเท่านั้น ไม่ใช่เทียบกับเชื้อใบขาวโดยตรงส่วนในการตรวจจำแนกชนิดของเชื้อนั้น ยังคงใช้ วิธีการตรวจลำดับเบสที่ซับซ้อน มีค่าใช้จ่ายสูง ใช้เวลานาน และใช้ผู้มีความชำนาญในการวิเคราะห์ ข้อมูล ซึ่งเป็นปัญหาในกรณีที่มีตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนา วิธีการที่นอกจากใช้ตรวจว่ามีเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยหรือไม่แล้ว ยังสามารถตรวจวัด ปริมาณเชื้อ จำแนกชนิดของเชื้อที่ได้ผลทันทีและอ่านผลง่าย มีการวินิจฉัยโรคที่มีคำอธิบายผลที่ผู้ใช้ สามารถนำไปขยายผลต่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดอุบัติการณ์ของโรคใบขาว

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างที่ศึกษา: อ้อยที่เป็นโรคใบขาวอาการต่างๆ ได้แก่ อาการใบขาว อาการใบขาวร่วมกับกอฝอย อาการกอตะไคร้ จากแหล่งปลูกต่างๆ และหญ้าที่มีอาการใบขาว การเก็บรักษาตัวอย่างใบ ตามวิธีของ Wongwaratet *et al.* (2011)

การสกัดดีเอ็นเอ: สกัดดีเอ็นเอจากใบโดยวิธี Li and Midmore (1999) ตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอ โดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะการโรสเจลความเข้มข้น 1% ใน 0.5X TBE ย้อมผลด้วยสาร SYBR gold (Invitrogen, USA) ตรวจผลแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลต บันทึกผลโดยการถ่ายภาพ ด้วยเครื่องบันทึกภาพดีเอ็นเอตรวจวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop spectrophotometer (NanoMaestro, USA)

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาตำแหน่ง 16S-23S ISR ด้วย nested-PCR : ทำตามวิธีของ สุจิรัตน์ และ คณะ (2554) ใช้ไพรเมอร์ (MLO-X/ MLO-Y และ P1/P2) ตามรายงานของ Hanboonsong *et al.* (2005)

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาตำแหน่ง *secA* ด้วย direct-PCR : ทำตามวิธีของ สุจิรัตน์ และคณะ (2556; Sakuanrungrasirikul *et al.*, 2013)

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วย Conventional PCR : สร้างพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอของยีน 16S-23S ISR และ *secA* โดยเพิ่มปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่ยีนทั้งสองชนิดนี้ สกัดดีเอ็นเอขนาด 700 bp จาก 16S-23S ISR และ 277 bp จาก *secA* ใน agarose gel ทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาลำเลียงรูป GEL/PCR



DNA Fragment Extraction Kit (RBCBioscience, Taiwan) สร้างโคลนแบคทีเรียที่มี พลาสมิดของจีน ยีนทั้งสองชนิดด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป RBC TA cloning kit (RBC Bioscience, Taiwan) สกัดพลาสมิด ที่มีจีนยีนด้วยชุดน้ำยา GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) หาความเข้มข้นของ พลาสมิดมีหน่วยเป็น copy number ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง nanodrop spectrophotometer แล้วนำมาคำนวณตามสูตรของ Whelan et al. (2003) สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานด้วยการเจือจาง พลาสมิดที่มีจีนยีนให้มีปริมาณเชื้อต่างกัน 10 เท่าระหว่าง $1-10^{10}$ copies ใน ดีเอ็นเออ้อยปกติ 25 ng/ μ l ใช้เป็นต้นแบบเพิ่มปริมาณบริเวณยีนทั้งสองด้วย Conventional PCR ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น ประเมิน ปริมาณเชื้อด้วยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ได้

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาตำแหน่งยีน *secA* ด้วย Realtime PCR : สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของ *secA* โดยใช้พลาสมิดที่มีจีน *secA* ที่มีปริมาณเชื้อต่างกัน 10 เท่า ดังกล่าวข้างต้น นำมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณ โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้ 1X PCR buffer, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA), ดีเอ็นเอต้นแบบ (25 ng/ μ l) 4 μ l, 0.5 μ M SecAfor/SecArev และ 0.075 μ M dye SYTO9 (Invitrogen, CA, USA) ในปริมาตรรวม 15 μ l นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่อง Realtime PCR (LightCycler[®] 480 Real-time PCR, Roche, Germany) ตาม ขั้นตอนดังนี้ 94 °C/5 นาที ตามด้วย 94 °C/1 นาที, 60 °C/30 วินาที, 72 °C/45 วินาทีจำนวน 40 รอบและ 72 °C/7 นาที วิเคราะห์ความถูกต้องของจีนส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature (T_m) ด้วยโปรแกรม T_m calling โดยเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 72 °C ถึง 95 °C เพิ่ม 0.1 °C/ วินาที แล้วลดอุณหภูมิลง ที่ 40 °C/30 วินาที คำนวณปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยโปรแกรม Abs Quant/2nd Derivative Max สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานโดยให้ค่า PCR amplification efficiency (E) เท่ากับ 2 ($E = 10^{(-1/slope)}$) เพื่อบ่งชี้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาฟิซอร์ ที่ 100% efficiency (เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ 2 เท่าในแต่ละรอบ) ตรวจสอบปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น

การจำแนกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค High Resolution Melting (HRM) : ใช้ การตรวจความแตกต่างลำดับเบสของเชื้อด้วย SNPs บนยีน 16S-23S rDNA ที่มีการขยายความยาว ของสายดีเอ็นเอจาก 210 bp ซึ่งครอบคลุมบางส่วนของ 16S-ISR ให้มีความยาวขึ้นด้วยเทคนิค Primer walking ใช้ *Candidatus Phytoplasma cynodontis* (AB741630.1) จากฐานข้อมูล NCBI เป็นตำแหน่ง ในการสร้างไพรเมอร์ตั้งต้น ออกแบบไพรเมอร์ได้จำนวน 4 คู่ดังนี้

16S-23S F1 :	AGTTTGATCTGGCTCAGGATA	16S-23S R1:	CATAGTTTGCCGGGGCTTA
16S-23S F2	GAACGATGAAGTATTCGGTA	16S-23S R2	GCTCGTTTATAGACTTAACCTAAC
16S-23S F3	GCACAAGCGGTGGATCATG	16S-23S R3	TGTGTACAAACCCCGAGAACG
16S-23S F4	GCAGTCTCAGTTCGGATTGA	16S-23S R4	CCGTTAATTGCGTCCTTCA

ใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของอ้อยและหญ้าที่มีการไอบขาวที่มีการศึกษาแล้วในการวิจัยความหลากหลาย ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้า จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S-23S ISR (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2555; Sakuanrungsirikul, et al., 2013) จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ SCWL,



SCGS และ SCGGs ชนิดละ 2 ตัวอย่าง และหญ้า 1 ตัวอย่างเป็นต้นแบบในการขยายความยาวสาย ด้วยเทคนิค Primer walking โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1x buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.33 μM Primer (Forward/Reverse mix), 0.1 U Taq polymerase and 100 ng/μl DNA template 3 μl ในปริมาตรรวม 15 μl เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Perkin Elmer PE 9700 Thermo Cycler, USA) มีขั้นตอนดังนี้ 94 °C/5 นาที, ตามด้วย 35 รอบของ 94 °C/40 วินาที, 52 °C/40 วินาที และ 72 °C/1 นาที ตามด้วย 72 °C/7 นาทีตรวจผลด้วย Electrophoresis สกัดชิ้นดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR Fragments Extraction Kit และส่งวิเคราะห์ลำดับเบส (Firstbase, Malaysia) จัดเรียงข้อมูลลำดับเบส 16S-23S rDNA ของ SCWL, SCGS, SCGGs และหญ้าที่ขยายขึ้นด้วยโปรแกรม Clustal W วิเคราะห์หาตำแหน่งที่มีความแตกต่างเพียงหนึ่งเบส (SNPs) ออกแบบไพรเมอร์ใหม่สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย nested-PCR ดังนี้ ชุดที่ 1 (16S-23S F1: AGTTTGATCCTGGCTCAGGATA / 16S-23S R1 CATAGTTTGCCGGGGCTTA) ครอบคลุมตำแหน่งที่ 1 ถึง 498 (ขนาดผลผลิต 498 bp) ชุดที่ 2 (Phyto7F:GGCTTGCGTCACATTAGTTAG / Phyto7R: CAACCTCTCAGTCCAGCTACAC) ครอบคลุมตำแหน่งที่ 220 ถึง 294 (ขนาดผลผลิต 75 bp) มีขบวนการในการเพิ่มปริมาณ 2 ขั้นตอน คือ (1) Direct PCR ประกอบด้วย 1x buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.33 μM Primer (16S-23S F1/R1), 0.1 U Taq polymerase และ 100 ng/μl DNA template 3 μl ในปริมาตรรวม 15 μl เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Perkin Elmer PE 9700 Thermo Cycler, USA) ดังนี้ 94 °C/5 นาที ตามด้วย 30 รอบของ 94 °C/1 นาที, 60 °C/30 วินาที และ 72 °C/45 วินาที ตามด้วย 72 °C/7 นาที (2) nested-PCR: ใช้ผลผลิตจากขั้นที่ 1 เจือจาง 1:200 เป็นต้นแบบ ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ในปริมาตรรวม 15 μl ที่ประกอบด้วย 1x buffer, 2mM MgCl₂, 1.2 mM dNTP, 0.2 μM Primer (Phyto7F/R), 0.1 U Taq polymerase และ DNA template 3 μl, 0.075 μM dye SYTO9 (Invitrogen, CA,USA) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Realtime PCR (LightCycler® 480 Real-time PCR, Roche, Germany) มีขั้นตอนดังนี้ 94 °C/5 นาที ตามด้วย 35 รอบของ 94 °C/30 วินาที, 64 °C/30 วินาที และ 72 °C/40 วินาที แล้ววิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature (Tm) โดยเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 72 °C ถึง 95 °C : 0.03 °C/ วินาที แล้วลดอุณหภูมิลงที่ 40 °C/30 วินาที วิเคราะห์ความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยโปรแกรม Gene Scanning (LightCycler®480 instrument with software version 1.5) การจำแนกชนิดของเชื้อในตัวอย่างทดสอบดำเนินการเช่นเดียวกัน

สถานที่ดำเนินการดำเนินการทดลองที่ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ระหว่างปี 2554-2557

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจปริมาณของเชื้อไฟโตพลาสมาอย่างง่ายด้วย Conventional PCR : ใช้การตรวจยืนยันเป้าหมายสองชนิดเพื่อความแม่นยำของวิธีการ ได้แก่ ยีน 16S-23S rDNA ซึ่งตรวจด้วยวิธี nested-PCR



และ ยีน *secA* ตรวจด้วยวิธี direct PCR ทั้งสองวิธีมีข้อดีและเสียแตกต่างกัน nested-PCR มีข้อดีคือสามารถตรวจดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณต่ำมากได้ เพราะดีเอ็นเอเป้าหมายถูกนำมาเพิ่มปริมาณซ้ำใหม่ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์สองชุด แต่มีข้อเสียคือเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายและเกิดผลบวกปลอมได้ง่าย จึงต้องตรวจควบคุมไปกับปฏิกิริยาควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยทุกครั้ง ความแม่นยำของวิธีการขึ้นกับความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ ตำแหน่งดีเอ็นเอเป้าหมาย และสถานะในทำ PCR หากใช้อุณหภูมิในการเกาะจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอเป้าหมายสูงเกินไปจะทำให้ไพรเมอร์เกาะได้ไม่เต็มที่ เกิดผลบวกปลอมที่ส่งผลเสียอย่างมากเมื่อนำผลตรวจไปขยายหรือปลูกในปริมาณมาก การตรวจยีน *secA* นั้นใช้วิธี direct PCR คือใช้ PCR เพียงชุดเดียว การปนเปื้อนเกิดได้น้อย แต่มีข้อเสียคือมีความไว (sensitivity) ต่ำกว่าวิธี nested-PCR ความแม่นยำ (precision) ขึ้นกับความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยยีน 16S-23S rDNA ใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Hanboonsong (2005) และประยุกต์วิธีการโดยปรับองค์ประกอบของปฏิกิริยาและสถานะ PCR ใหม่เพื่อลดการเกิดผลบวกปลอมและพัฒนาใหม่ให้สามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อได้สามารถแสดงผลผลิตของปฏิกิริยาชุดแรก (direct PCR) ขนาด 700 bp ได้ที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในบริเวณส่วนกลางของ 16S ผ่าน ISR จนถึงส่วนต้นของ 23S ซึ่งเป็นบริเวณที่นิยมใช้สร้างไพรเมอร์ชนิด universal primer สำหรับตรวจและจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาโดยทั่วไป (Deng and Hiruki, 1991; Ahrens and Seemuller, 1992; Lee, et al., 1993) เมื่อนำดีเอ็นเอขนาด 700 bp นี้ มาเจือจางให้ความเข้มข้นต่างกันแล้วเพิ่มปริมาณ พบว่าระดับความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอของผลผลิต PCR ที่ได้สอดคล้องกับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตั้งต้น สามารถเห็นแถบจากการใช้พลาสมิดตั้งต้นที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 copies จนถึง 10^4 copies/ μ l (ใน 25 ng DNA) ซึ่งเป็นจุดคงที่ของความเข้มแสง เมื่อนำส่วนผลผลิต PCR ขนาด 210 bp ที่ได้จากขบวนการ nested-PCR ของดีเอ็นเอตั้งต้นตั้งแต่ $1-10^4$ copies/ μ l นั้นมีความเข้มแสงเท่ากัน (Fig. 1A) อย่างไรก็ตามความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอขนาด 210 bp นี้จะจางลงหากมีดีเอ็นเอตั้งต้นมีน้อยกว่า 1 copy/ μ l (Fig. 1B) ในตัวอย่างที่มีการติดเชื้ออื่นซ้ำซ้อน จะเกิดแถบอื่นๆ ที่รบกวนการแปลผล เกิดจากความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ดังกล่าวมาแล้ว ที่จับกับดีเอ็นเอของไฟโตพลาสมาในพืชอื่นๆ ได้ เช่น หนุ่ พง เถา มันสำปะหลัง รวมทั้งแบคทีเรียบางชนิดภายในดินเช่น *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. และ *Bacteriodes* spp. (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Harrison et al., 2002) มักพบในตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย หรือตัวอย่างจากแปลงที่มีอาการของโรคอื่นด้วย เช่น ใบลวก ราสนิม เป็นต้น (Fig. 1C) ในการตรวจเพื่อยืนยันผลการติดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยควบคุมไปด้วยนั้น ใช้ไพรเมอร์ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะต่อเชื้อนี้ที่ตำแหน่งยีน *secA* ได้ผลเป็นชิ้นยีนขนาด 277 bp (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Sakuanrungrasirikul et al., 2012) สามารถใช้ประเมินปริมาณเชื้อจากความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอได้เช่นเดียวกัน (Fig. 1D) แต่เนื่องจากการทำปฏิกิริยา direct PCR จึงทำให้เห็นแถบดีเอ็นเอได้ต่ำสุดที่ 10^2 copies/ μ l เท่านั้น ในกรณีที่มีตัวอย่างเป็นจำนวนมาก และไม่ต้องใช้รายละเอียดของจำนวนเชื้อ



มาก สามารถใช้วิธีกำหนดระดับความเข้มข้นของแถบเป็นระดับได้ ตั้งแต่ระดับต่ำ 1+ ถึงสูง 4+ คือ มีเชื้อตั้งแต่ 10^1 ถึง 10^4 copies/ μ l พบว่าระดับเชื้อ 10^3 copies/ μ l เห็นอาการใบขาวแล้ว (Table 1)

การตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยยีน *secA* โดย absolute quantification realtime PCR : งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกที่พัฒนาวิธีการตรวจวัดปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยด้วย Real time PCR ที่มีการใช้ชิ้นยีนของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวเป็นมาตรฐานเปรียบเทียบความเข้มข้นของเชื้อ Soufi (2012) รวมทั้งรายงานอื่นที่ตรวจเชื้อนี้อ้อยด้วย Real time PCR ใช้วิธีตรวจ 16S-23S rDNA ที่เป็นบริเวณที่พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียหลายชนิดดังกล่าวแล้วข้างต้น และใช้วิธีเจือจางดีเอ็นเอของอ้อยที่มีอาการใบขาว หรือใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากต้นแพงพวยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาเปรียบเทียบแทน ดังนั้นปริมาณที่ตรวจได้จึงไม่ใช่ปริมาณของเชื้อใบขาวที่แท้จริง การใช้วิธีนี้ในการเปรียบเทียบความเข้มข้นค่อนข้างซับซ้อน เพราะจำนวนซ้ำของยีนในจีโนมของเชื้อแต่ละชนิดมีไม่ต่ำกว่า 2 ชุด หากใช้ต้องทำการโคลนชิ้นยีนให้ได้เพียงชุดเดียวในพลาสมิด จึงใช้เปรียบเทียบได้ แต่ในรายงานนี้ใช้วิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่มาใช้ตรวจ ที่จำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยที่ตำแหน่งยีน *secA* ซึ่งมีเพียงชุดเดียวในจีโนม (Bekele, et al., 2011) และใช้พลาสมิดที่มีชิ้นส่วนของยีน *secA* สร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานเพื่อคำนวณความเข้มข้นจึงเป็นปริมาณที่แท้จริงของเชื้อในเนื้อเยื่อพืช (สุจิตร์ และคณะ, 2556; Sakuanrungrungsirikul et al., 2012)

Real-Time PCR หรือ Quantitative PCR (qPCR) เป็นเทคนิคที่สามารถคำนวณค่าประสิทธิภาพ ค่าความเข้มข้น หรือปริมาณสารพันธุกรรมเริ่มต้นได้โดยใช้สารเรืองแสงเป็นตัวแสดงผล (reporter) สามารถแสดงผลให้เห็นได้ทันทีในระหว่างการเกิดปฏิกิริยา ค่าสำคัญที่เกี่ยวข้องในเทคนิคนี้ ได้แก่ ค่า Threshold Cycle (Ct) ซึ่งหมายถึงรอบของการเพิ่มปริมาณที่เครื่องสามารถตรวจหาดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นจากปฏิกิริยาได้ หากดีเอ็นเอตั้งต้นมีน้อยต้องใช้รอบในการเพิ่มปริมาณหลายรอบกว่าจะตรวจพบสัญญาณเรืองแสง ทำให้มีค่า Ct สูง การคำนวณหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้น ทำโดยใช้ดีเอ็นเอที่ทราบความเข้มข้นแล้วมาเพิ่มปริมาณและสร้างเป็นกราฟความเข้มข้นมาตรฐานสำหรับเทียบ และอีกค่าหนึ่ง คือ melting temperature (T_m) เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกจากกัน ความแตกต่างของค่า T_m จะแปรผันโดยตรงกับ % GC content และความยาวของสายดีเอ็นเอคู่สั้นๆ ดังนั้นค่า T_m จึงถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกความแตกต่างของผลผลิต PCR ซึ่งใช้งานได้ง่าย ไม่ซับซ้อน แต่ประสิทธิภาพอาจไม่มากเท่ากับการตรวจลำดับเบส

กราฟความเข้มข้นมาตรฐานและค่า PCR amplification efficiency (E) : การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ทำโดยเทียบค่า Ct กับกราฟความเข้มข้นมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของพลาสมิดต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง $1-10^{10}$ copies/ μ l ค่า Ct ของพลาสมิดที่มีความเข้มข้นสูงสุด (10^{10}) จะมีค่าต่ำ โดยกราฟแสดงการเพิ่มปริมาณตั้งแต่รอบที่ 8 ขณะที่พลาสมิดที่มีค่า (1-10 copies) พบกราฟในรอบที่ 40 และมีการโค้งที่ไม่สูงมาก (Fig.2A) ผลการวิเคราะห์ค่า T_m พบว่าพลาสมิดความเข้มข้น 10^2-10^{10} copies ให้ค่าเฉลี่ยประมาณ 77.10°C เพียงค่าเดียวเท่านั้น จึงถูกใช้เป็นค่า T_m ของชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ส่วน



พลาสมิดที่ 1 และ 10 copies มีค่า T_m ที่ 73.22°C และ 77.10°C ตามลำดับ ซึ่งค่า T_m ที่ 73.22°C คาดว่าเกิดการจับกันเองของไพรเมอร์ (primer-dimer) (Fig. 2B) การคำนวณค่า efficiency (E) พบว่าพลาสมิดช่วงความเข้มข้น 10^2 - 10^{10} copies นั้นตกอยู่ในช่วงที่กราฟมีความลาดเอียง (slope) ที่มีค่าเท่ากับ -3.524 หมายถึงต้องใช้ 3.524 รอบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียง 10 เท่าตามความเข้มข้นตั้งต้นที่เจือจางต่างกัน 10 เท่าหรือมีค่า C_t ต่างกันเท่ากับ 3.524 รอบ ($2^{3.524} = 11.5$) เมื่อนำค่าความลาดเอียงมาหาค่า E ได้ค่าเท่ากับ 1.922 แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นของชิ้นดีเอ็นเอได้จำนวน 1.922 เท่าซึ่งใกล้เคียงกับ 100% efficiency ในแต่ละรอบของการทำปฏิกิริยา ดังนั้นช่วงความเข้มข้นของพลาสมิด สูงสุดและต่ำสุดที่นำมาใช้ในการประเมินได้คือ 10^2 - 10^{10} copies ส่วนช่วง 1-10 copies นั้นตกอยู่นอกส่วนที่มีความลาดเอียง จึงเป็นช่วงค่าที่ไม่น่าเชื่อถือ และไม่ควรนำมาใช้ (Figure 2C) ผลการทดสอบหาปริมาณเชื้อในตัวอย่างที่มีความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยต่างกัน 3 ระดับ คือ ใบขาว ใบขาวปนเขียว และใบเขียว (ไม่มีอาการ) พบว่าปริมาณเชื้อเกี่ยวข้องกับระดับอาการ อ้อยใบขาวมีปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมามากที่สุด คืออยู่ในระดับ 10^5 copies ในใบขาวปนเขียวมีเชื้อในระดับ 10^3 - 10^4 copies ส่วนใบเขียวไม่สามารถตรวจได้ (Table 1) ซึ่งคาดว่ามีความเข้มข้นน้อยกว่า 10^2 copies การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีน้อยเช่นนี้ เช่น 4-340 cells/g ต้องใช้เทคนิค nested PCR มาตรวจสอบ (Berges *et al.*, 2000)

การจำแนกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค HRM : การใช้ HRM ในการแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอเริ่มมีการใช้งานมากขึ้นส่วนใหญ่เป็นรายงานที่ใช้ในทางการแพทย์ (Zianni *et al.*, 2013, Areekit *et al.*, 2009) เป็นวิธีการที่รวดเร็ว ให้ผลทันที ใช้ง่ายแปลผลง่าย ไม่ต้องตรวจลำดับเบสซึ่งใช้ค่าใช้จ่ายสูง ใช้เครื่องมือราคาแพง มีความซับซ้อน ใช้เวลาและใช้ความชำนาญในการตรวจวิเคราะห์และแปลผล เทคนิค HRM ใช้ค่า T_m เป็นหลักในการแยกผลผลิต PCR ที่ต่างกัน ซึ่งทำโดยออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่งที่มีความแตกต่างกัน โดยมีความยาวของผลผลิต PCR ไม่เกิน 100 bp เพื่อประสิทธิภาพการแยกความแตกต่างเบสที่ชัดเจน การพัฒนางานในส่วนนี้ต่อยอดงานวิจัยจากเรื่องการศึกษาความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยและหญ้าใบขาวจากแหล่งปลูกต่างๆ ทั่วประเทศไทย (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Sakuanrungrasirikul *et al.*, 2012) โดยใช้ข้อมูลลำดับเบสที่ได้มาพัฒนาต่อให้สามารถตรวจความแตกต่างของชนิดเชื้อได้ ซึ่งจากรายงานดังกล่าวนี้ได้ศึกษาลำดับเบสของยีน 16S-ISR ความยาว 210 bp และ secA ความยาว 277 bp ของกลุ่มตัวอย่าง 3 กลุ่มใหญ่ คือ SCWL, SCGS และ SCGGS และพบว่ามีเบสต่างกันค่อนข้างน้อยแยกกัน得不ชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่าง SCWL และ SCGS เพราะขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ของทั้งสองยีนนั้นสั้นเกินไป การพัฒนาวิธีแยกความแตกต่างด้วย HRM นั้นต้องทำการขยายความยาวของชิ้นยีนที่ได้ให้ยาวขึ้น เพื่อให้มีตำแหน่งแตกต่างมากขึ้น สำหรับสำรวจหาตำแหน่งที่มีเบสต่างกันที่ใช้แยกชนิดของเชื้อได้อย่างชัดเจน ผลจากการใช้เทคนิค Primer walking ทำให้ได้ลำดับเบสของตำแหน่ง 16S-23S rDNA ของ SCWL, SCGS, SCGGS และหญ้าที่มีอาการใบขาวยาวขึ้นครอบคลุม 16S-ISR-23S บางส่วนโดยได้ขนาดใหม่เท่ากับ 1770, 1771, 1772 และ 1780 bp ตามลำดับ มีตำแหน่ง



แปรปรวน (SNPs) จำนวนรวม 71 ตำแหน่ง กระจายอยู่ทั่วทั้งสายที่เป็นทั้งชนิดแทรก (Insertion) ขาดหาย (Deletion) และแทนที่ (Substitution) ของเบสในจำนวนนี้มี SNPs 3 ตำแหน่ง ที่คัดเลือกเพื่อใช้แยกเชื้อทั้ง 4 ชนิดได้ ได้แก่ ตำแหน่งที่ 245 แยก SCGGS ออกจาก SCWL และ SCGS (SCGGS/GRASS (T) : (C) SCWL/SCGS) ตำแหน่งที่ 254 แยก SCGS ออกจากเชื้อ SCWL (SCGGS/SCGS (G) : (A) SCWL, GRASS) ตำแหน่ง 267 แยกเชื้อของอ้อยออกจากหญ้าใบขาว (SCGGS/SCWL/SCGS (T) : GRASS (C) ไพร์เมอร์ที่พัฒนาขึ้นสำหรับการแยกชนิดของเชื้อนี้ ไพร์เมอร์ชุดที่ 1 ให้ขนาดของผลผลิต 498 bp ครอบคลุมตำแหน่งที่ 1 ถึง 498 ส่วนไพร์เมอร์ชุดที่ 2 ได้ผลผลิตขนาด 75 bp ครอบคลุมตำแหน่งที่ 220 ถึง 294 ที่มีตำแหน่ง SNPs ที่ต้องการอยู่ ผลการทดสอบกับตัวอย่าง SCWL, SCGS, SCGGS และหญ้าที่แสดงอาการใบขาว พบว่า melting curves แสดงกราฟแยกกัน 4 กราฟ มีค่า Tm ของเชื้อทั้ง 4 ชนิด คือ 80.30°C, 80.75°C, 79.92°C และ 80.63°C ตามลำดับ (Fig. 3A) แต่ละชนิดมีลักษณะเป็น peak เดียวชัดเจนไม่ปรากฏ peak อื่นๆ หรือ primer dimer แสดงถึงความจำเพาะของไพร์เมอร์สูง และความเหมาะสมของสภาวะที่ใช้ทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ การวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Gene scanning ที่แสดงผลเป็น melting curves จะเห็นการแยกได้ชัดเจนกว่าการใช้ค่า Tm (Fig.3B) จากตรวจสอบความถูกต้องและแม่นยำของไพร์เมอร์และวิธีการของ HRM ที่ได้นี้ด้วยอ้อยใบขาวอีก 38 ตัวอย่างได้แก่ SCWL 15 ตัวอย่าง SCGS 19 ตัวอย่าง SCGGS 4 ตัวอย่างซึ่งมีการตรวจลำดับเบสและจำแนกกลุ่มด้วย phylogenetic tree แล้วนั้น (สุจิตน์ และคณะ, 2555) พบว่าให้ผลสอดคล้องกัน (Fig. 3C) การทดสอบวิธีการนี้เพิ่มเติมโดยใช้เชื้อไฟโตพลาสมาในพืชชนิดอื่น ได้แก่ *Erianthus* spp และลูกผสมระหว่าง *Erianthus* กับอ้อย จำนวน 200 ตัวอย่าง พบว่ามีค่า Tm แตกต่างกัน แสดงว่าเชื้อในตัวอย่าง *Erianthus* spp. นั้นไม่ตรงกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย ส่วนเชื้อที่พบในลูกผสมระหว่าง *Erianthus* spp. กับอ้อย พบว่าเกือบทั้งหมดตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาของอ้อยชนิด SCWL หรือ SCGS ด้วยวิธีนี้ได้ (ไม่ได้แสดงผล) แสดงถึงความแม่นยำของวิธีการที่พัฒนาใหม่นี้ในการจำแนกชนิดของเชื้อได้ ส่วนการเพิ่มความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ *secA* เป็น 377 bp ด้วยเทคนิค Primer walking พบความแปรปรวนระหว่างลำดับเบสของไฟโตพลาสมาทั้ง 3 ชนิดนี้จำนวน 31 ตำแหน่ง กระจายในภายในสายดีเอ็นเอและเป็นชนิด substitution แต่การกระจายตัวยากต่อการคัดเลือกตำแหน่งสำหรับนำมาใช้ในการออกแบบไพร์เมอร์ จึงไม่ได้นำมาใช้ในการพัฒนาวิธีการ

ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาและการแสดงอาการใบขาว : การแสดงอาการใบขาวของอ้อยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ทั้งปริมาณเชื้อภายในต้น ความแข็งแรงของต้น และสภาพแวดล้อมที่กระตุ้นอ้อยเครียด ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาภายในต้นอาจไม่สัมพันธ์โดยตรงกับการเกิดอาการใบขาว แม้จะมีเชื้อภายในต้นปริมาณมากแต่อาจจะยังไม่แสดงอาการใบขาวได้ Soufi (2012) ตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาจำนวนมากภายใน sieve element ของใบอ้อยที่ติดเชื้อใบขาวที่มีอาการตั้งแต่ใบขาว ใบขาวเขียว และใบเขียว เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่พบเชื้อ กอบเกียรติ และคณะ (2554) พบว่ากลุ่มอ้อยที่มีการ



ให้น้ำเสริมมีการแสดงอาการใบขาวน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ให้น้ำ แม้จะตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาในปริมาณสูง (มากกว่า 10^2 copies/ μ l) จากการสำรวจอ้อยในแหล่งปลูกภาคกลางที่มีสภาพดินน้ำดี เหมาะต่อการปลูกอ้อย หลายตัวอย่างตรวจพบเชื้อในปริมาณสูงแต่ยังไม่มีอาการใบขาว แต่เมื่อนำมาปลูกขยายต่อในแหล่งดินทราย จะแสดงอาการใบขาวได้ ซึ่งมักเกิดหลังจากอ้อยผ่านช่วงแล้งจัดและมีฝนเมื่ออ้อยเริ่มงอกและพบใบขาว ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่มักพบได้ทุกปีในภาคอีสาน และแหล่งดินทรายจัด แต่ความรุนแรงของอาการใบขาวหลังจากอ้อยแสดงอาการแล้วนั้นขึ้นกับปริมาณเชื้อ (Table 1)

Martini *et al.* (2011) ทำการศึกษาใน *Prunus* spp. ที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่าความรุนแรงของโรคขึ้นกับระดับปริมาณเชื้อในต้นนั้นๆ โดยทั่วไปเมื่อพืชถูกเชื้อโรคเข้าทำลาย ขบวนการหนึ่งที่เกิดขึ้นคือพืชจะสร้าง Reactive oxygen species (ROS) ขึ้นอย่างมากเพื่อใช้กำจัดเชื้อโรค ทำให้พืชเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidation stress) จาก ROS นี้ด้วยเพราะเกิดความเสียหายกับสภาวะทางสรีระบางอย่างภายในต้นพืชเอง (Jones, 2006) มีรายงานการเกิดภาวะเครียดนี้ในพืชหลายชนิดที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมา การลดความเสียหายจากเชื้อด้วยการใช้สารบางชนิดพบว่าทำให้มีปริมาณ H_2O_2 และ ascorbic acid ที่มีบทบาทสำคัญภาวะออกซิเดชันนี้มากขึ้น แต่มีกิจกรรมเอนไซม์ peroxidase ที่ลดลง (Sánchez-Rojo, *et al.*, 2010) จากรายงานของศุจิรัตน์และคณะ (2557) พบว่า อ้อยที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมามีภาวะเครียดออกซิเดชันเช่นกัน ในอ้อยที่มีอาการใบขาวมีกิจกรรมเอนไซม์ APX (ascorbate peroxidase) และมีปริมาณ H_2O_2 สูงกว่าปกติประมาณ 2 เท่า พบสาร Proline ที่สร้างเมื่อพืชอยู่สภาวะแล้งหรือขาดน้ำสูงกว่าปกติประมาณ 2-3 เท่า แสดงว่ามีภาวะเครียดออสโมติก (osmotic stress) ร่วมด้วย กอบเกียรติ และคณะ (2553) รายงานว่าปริมาณน้ำในใบอ้อยที่แสดงอาการขาวมีน้อยกว่าในใบที่ไม่มีอาการประมาณ 2 เท่า ตรวจพบสาร Malondialdehyde (MDA) สูงขึ้นกว่า 1 เท่าในอ้อยที่มีอาการใบขาว แสดงถึงสภาวะที่เซลล์ถูกทำลาย ภาวะเครียดนี้เหล่านี้ทำให้อ้อยอ่อนแอลง การทดลองโดยใช้อ้อยอายุ 2 เดือน ที่มีปริมาณเชื้อสูงตรวจด้วยวิธี PCR แต่ยังไม่แสดงอาการใบขาว ซึ่งได้จากการเพาะข้ออ้อยที่มียอดขาวในกระบะทราย สร้างภาวะเครียดจากแล้งและความร้อน (39°C , 20,000 LUX :12/12 สว่าง/มืด, 55% RH) ในตู้ควบคุมเป็นเวลา 3 วัน แล้วให้น้ำหลังการทดสอบอีกประมาณ 14 วัน พบว่าเกือบทั้งหมดแสดงอาการใบขาวหลังจากใบคลี่แล้ว แต่ต่อมาใบที่ขาวแล้วนั้นจะกลับเป็นใบเขียวได้อีก แสดงให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดอาการใบขาว แต่การทดสอบในอ้อยที่มีเชื้อในปริมาณต่ำ (น้อยกว่า 10^2 copies/ μ l) จะยังไม่แสดงอาการใบขาวในสภาพดังกล่าวแม้จะแสดงอาการขาดน้ำและมีการสร้าง Proline ในปริมาณที่สูงมากกว่า 3 เท่าหลังการทดสอบเทียบกับอ้อยชุดควบคุม (ศุจิรัตน์และคณะ (2557) ดังนั้นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิดใบขาวในอ้อยจึงประกอบด้วยปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาภายในต้นและสภาวะแวดล้อมที่มากระตุ้น จึงมักพบอุบัติการณ์ใบขาวในปีที่มีสภาวะแล้งยาวนาน แล้วตามด้วยฝนหลังจากอ้อยฟื้นตัวจากการรับน้ำ Martini *et al.* (2011) รายงานว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาใน *Prunus* spp. จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นในช่วงที่พืชมีการเจริญเติบโต (vegetative season) ในกลุ่มดินเนื้อหยาบ (ทรายจัด) ที่ไม่อุดมสมบูรณ์ รวมถึงดินที่มีชั้นดานเหนียวสูง



กว่าปกติ หรือการมีน้ำท่วมขัง เป็นปัจจัยที่สร้างภาวะเครียดให้อ้อยได้เช่นกัน นอกจากนี้อาการใบขาว มักพบได้มากในอ้อยต่อที่มีประสิทธิภาพการดูดใช้น้ำและอาหารได้ลดลง (กอบเกียรติ และคณะ, 2553) ดังนั้นคำแนะนำในการลดความเสียหายจากโรคใบขาวจึงประกอบด้วย การเลือกใช้ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรค การบริหารจัดการที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ การปรับปรุงดิน การจัดการธาตุอาหาร และน้ำที่เหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดสภาวะเครียดในอ้อย

การวินิจฉัยผลการตรวจโรคใบขาวและการรายงานผลด้วยรหัสสี: การรายงานผลการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วย Conventional PCR ใช้การดูผลจากการตรวจทั้งสองยีน คือ 16S-23S rDNA ซึ่งได้ผลเป็นดีเอ็นเอขนาด 700 bp และ 210 bp และ *secA* ที่มีขนาด 277 bp ประกอบกันจากข้อดีและข้อเสียของทั้งสองวิธีดังกล่าวมา วิธีกำหนดปริมาณเชื้อใช้การเทียบความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอ ที่กำหนดความเข้มของแถบจากน้อยไปมากเป็น 1+ ถึง 4+ โดยเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่เป็นใบขาว ซึ่งง่าย และรวดเร็ว แต่จากประสบการณ์การรายงานด้วยวิธีดังกล่าวประสบปัญหาว่าผู้ใช้ไม่เข้าใจความหมายของข้อมูลที่แบ่งเป็นระดับบวกของยีนทั้ง 3 ตำแหน่งที่ใช้ ไม่เข้าใจถึงความสัมพันธ์ของระดับเชื้อที่ได้จากรายงานและพัฒนาการของเชื้อและอาการในสภาพแวดล้อมที่ปลูกเพราะขาดคำแนะนำจากผลตรวจสำหรับนำไปปรับหรือขยายผลต่อไปแปลงได้ ทำให้งานด้านการแก้ไขปัญหาโรคใบขาวไม่ก้าวหน้าเท่าที่ควร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ปรับพัฒนาวิธีการรายงานผลใหม่ นอกจากมีผลของระดับปริมาณเชื้อแล้ว ยังกำหนดระดับความปลอดภัยในการนำไปใช้ต่อและคำแนะนำในการดูแลรักษาในแปลง รวมถึงการคาดการณ์การแสดงอาการใบขาวในรุ่นอ้อยต่อด้วย จากระดับอาการใบขาว 3 ระดับ คือ ขาว ขาวเขียว และเขียว นั้น มีช่วงของปริมาณเชื้อตรวจด้วย q-Realtime PCR คือ 10^5 , 10^3 - 10^4 และ 10^2 copies/ μ l หรือต่ำกว่า ตามลำดับ (Table 1) ในจำนวนนี้กลุ่มใบเขียวเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญที่สุดเพราะมีกลุ่มอาการแฝงที่ไม่สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่าที่มีผลต่อการแพร่กระจายโรคใบขาวในแปลงต่างๆ กลุ่มนี้สามารถแสดงใบขาวได้หากมีเชื้อมากในระดับรอยต่อระหว่างใบเขียวและขาวเขียวเมื่อมีภาวะเครียดมากระตุ้นดังกล่าวมาแล้ว จากการศึกษาพบว่าอ้อยที่เพาะจากลำยอดขาว ต้นอ่อนที่งอกจากโคนจนถึงกลางลำ จะมีอาการใบขาวระดับมากไปน้อย ส่วนต้นที่งอกจากข้อที่สูงขึ้นไปนั้นยังมีใบสีเขียว การตรวจด้วย 16S-23S rDNA พบดีเอ็นเอขนาด 700 bp ระดับ 1+ ถึง 4+ ในกลุ่มต้นอ่อนที่เป็นใบขาวและใบเขียวที่อยู่ใกล้กัน และพบดีเอ็นเอขนาด 210 bp ระดับ 4+ ทุกต้นของทั้งลำ (สุจิรัตน์ และคณะ, 2554) สาเหตุเพราะเชื้อไฟโตพลาสมามีการสะสมมากที่บริเวณโคนต้น เมื่อนำกลุ่มต้นใบเขียวเหล่านี้มาทดสอบด้วยภาวะเครียดจากแล้งและขาดน้ำดังกล่าวพบว่ากลุ่มใบเขียวระหว่างช่วงต่อไปนี้จะแสดงใบขาว ส่วนกลุ่มใบเขียวส่วนบนจะยังไม่มีอาการใบขาวให้เห็น ดังนั้นในกลุ่มใบเขียวที่ไม่มีอาการนี้ จึงสามารถแยกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ 1) กลุ่มที่มีเชื้อสูงที่ไม่ควรนำไปใช้ขยายพันธุ์ต่อเพราะถูกกระตุ้นให้แสดงใบขาวได้ทันทีด้วยภาวะเครียด เป็นกลุ่มที่อยู่ช่วงรอยต่อระหว่างใบขาวและเขียว ตรวจพบ 700 bp และ *secA* ประมาณ 1-2+ และ 210 bp ระดับ 4+ หรือมีเชื้อประมาณ 10-100 copies/ μ l 2) กลุ่มเฝ้าระวังมีเชื้อต่ำกว่ากลุ่มแรก ตรวจพบเฉพาะ 210 bp



ระดับ 2-4+ หรือมีเชื้อประมาณ 1-น้อยกว่า 1copies/μl ได้แก่ กลุ่มใบเขียวส่วนบนของลำยอดขาว ซึ่งมีโอกาสเกิดใบขาวได้หากมีช่วงเวลาสะสมปริมาณเชื้อให้มากพอ และอ้อยเกิดอ่อนแอลงจากภาวะเครียด 3) กลุ่มปลอดภัย มาจากลำ กอและแปลงที่สะอาด ไม่มีอาการใบขาว หรือจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ สามารถนำไปขยายพันธุ์ได้ กลุ่มนี้มีเชื้อปริมาณต่ำมากน้อยกว่า 1 copies/μl แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มย่อยแรกพบเฉพาะ 210 bp ระดับ 1+ หรือน้อยกว่า กลุ่มย่อยที่ 2 ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอของเชื้อเลย เนื่องจากความสำคัญอยู่ในกลุ่มใบเขียวที่มีเชื้อระดับต่างๆ ดังนั้นการแบ่งช่วงรหัสสิจึงให้ความสำคัญกับระดับปริมาณเชื้อที่ตรวจด้วยพีซีอาร์ และโอกาสในการเกิดอาการใบขาวมากกว่าระดับอาการใบขาว รหัสสิจึงคัดเลือกมาใช้ในการรายงานผลประกอบด้วย กลุ่มที่มีเชื้อสูง กำหนดเป็นสีแดง ที่ไม่ควรนำไปใช้ขยายพันธุ์ต่อ กลุ่มเฝ้าระวัง กำหนดเป็นสีส้ม เป็นกลุ่มที่มีเชื้อต่ำกว่ากลุ่มสีแดงแต่อยู่ระหว่างสะสมเชื้อ และเกิดใบขาวได้ในรุ่นต่อ 1 และกลุ่มสุดท้ายเป็นกลุ่มปลอดภัย แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ 1. กลุ่มสีเขียว ตรวจพบเชื้อในระดับต่ำ อาจใช้ระยะเวลาในการสะสมเชื้อที่นานขึ้น อาจอยู่ได้ถึงต่อ 2 หรือมากกว่าหากมีการดูแลรักษาแปลงที่ดี และ 2. กลุ่มสีขาว ตรวจไม่พบดีเอ็นเอของเชื้อในตัวอย่างที่ส่งตรวจ เป็นกลุ่มปลอดภัย สามารถนำไปขยายพันธุ์ต่อได้ นอกจากนี้ สีเหลือง ถูกนำมาใช้เพิ่มเติม ให้หมายถึงมีการตรวจพบเชื้ออื่น เพราะการตรวจ 16S-23S rDNA ด้วยวิธีนี้ สามารถพบดีเอ็นเอของแบคทีเรียอื่นได้ด้วย ซึ่งเป็นการนำข้อเสียของวิธีการมาใช้ประโยชน์ได้การรายละเอียดการกำหนดช่วงปริมาณเชื้อและรหัสสีแสดงในตารางที่ 1 ตัวอย่างการรายงานผลเฉพาะส่วนของการประเมินปริมาณเชื้อด้วยรหัสสี (Fig. 4) และตัวอย่างการรายงานผลที่มีทั้งการกำหนดรหัสสีและการตรวจชนิดของเชื้อ (Fig. 5)

การรายงานผลด้วยรหัสสีได้เริ่มนำมาทดสอบในกลุ่มตัวอย่างอ้อยที่ส่งตรวจในปี 2557 ช่วงอายุอ้อยประมาณ 5-7 เดือน จากการตรวจตัวอย่างอ้อยจากโครงการต้นแบบการจัดการโรคใบขาวจากศูนย์วิจัยและพัฒนาจังหวัดกาญจนบุรี สวพ.3 และ 4 จำนวน 10 ศูนย์ ที่นำไปปลูกทั้งในศูนย์และในไร่เกษตรกร พบว่าส่วนใหญ่มีเชื้อระดับสีส้ม (Table 2) จากการติดตามผลอ้อยต่อในปี 2558 พบว่าบางแปลงที่มีการสำรวจ เริ่มพบใบขาวแล้ว เช่น ลำดับที่ 1, 5 และ 11 เป็นกลุ่มตัวอย่างที่มีสัดส่วนรหัสสีส้มสูง ในกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์รหัสสีเขียวสูงกว่าส้ม เช่น ลำดับที่ 13 เริ่มพบหน่อขาวในกอ ส่วนกลุ่มที่พบรหัสสีขาวสูง เช่น ลำดับที่ 8, 10 และ 12 ยังไม่พบใบขาว จะเห็นได้ว่าการรายงานผลด้วยรหัสสีนี้นอกจากทำให้การอ่านผลการตรวจง่ายขึ้นแล้วการคาดการณ์ยังสอดคล้องกับอุบัติการณ์ใบขาวที่เกิดขึ้น ทั้งนี้ในการประเมินระดับความรุนแรงของโรคในระดับแปลงนั้น ต้องมีจำนวนตัวอย่างมากพอในการเป็นตัวแทนของทั้งแปลง เช่น จำนวนตัวอย่างของศูนย์ลำดับที่ 9 มีจำนวนน้อยเกินไปไม่สามารถนำมาประเมินได้ การสุ่มเก็บตัวอย่างควรครอบคลุมสภาพดินของทั้งแปลง เพราะสภาพดินมีผลอย่างมากต่อความแข็งแรงของพืช ภายในแปลงเดียวกันมักพบว่ามีสภาพดินต่างกัน นอกจากนี้ อ้อยเป็นพืชที่แตกกอ ดังนั้นจะต้องคัดเลือกลำที่ใช้ตัวแทนที่ดีของกออื่นๆ เช่น อาจใช้ลำหลัก ที่เป็นแหล่งสะสมเชื้อหลัก และหน่อรุ่นหลังๆ ประกอบการตรวจด้วย จากการสำรวจพบว่าลำที่มียอดขาว



มักจะมีหน่อขาวด้วยเนื่องจากมีเชื้อสะสมมากที่โคน ส่วนลำที่ไม่มีอาการใบขาว อาจมีหน่อขาวได้ในหน่อรุ่นหลัง เพื่อให้ได้ผลการตรวจและการคาดการณ์การระบาดใบขาวที่แม่นยำ สามารถจัดการได้เหมาะสมมากขึ้น จากการดำเนินงานตรวจโรคที่ผ่านมา ยังไม่ให้ความสำคัญกับรายละเอียดนี้ จึงทำให้การดำเนินงานจัดการใบขาวไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร

สรุปผลการทดลอง

ผลงานวิจัยที่นำเสนอชิ้นนี้เป็นรายงานแรกในการพัฒนาวิธีการตรวจและวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิค PCR ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจเชื้อ วัดปริมาณเชื้อ จำแนกชนิดของเชื้อในเนื้อเยื่ออ้อยได้ มีการออกแบบวิธีการรายงานผล พร้อมคำอธิบายผล และคำแนะนำ เพื่อให้เข้าใจได้ง่ายขึ้น สามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบการตัดสินใจ และนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ การพัฒนาวิธีการตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาอย่างง่ายโดยใช้ Conventional PCR โดยตรวจที่ยีน 16S-23S rDNA ด้วยเทคนิค nested-PCR ซึ่งได้ผลเป็นชิ้นดีเอ็นเอขนาด 700 bp ที่ใช้เป็นตำแหน่งในการระบุปริมาณเชื้อมากที่สามารถก่อเกิดอาการใบขาวได้ และชิ้นดีเอ็นเอขนาด 210 bp ที่ระบุถึงปริมาณเชื้อระดับที่ต่ำกว่านี้ การระบุปริมาณเชื้อของวิธีการนี้ ใช้การเทียบความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ได้จากการโคลนชิ้นของยีนเข้าสู่พลาสมิด ซึ่งจัดเป็น “เทคนิคกึ่งปริมาณ (Semi-Quantitative Analysis)” ความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ที่ใช้ทำให้ตรวจพบเชื้ออื่นได้ด้วย และถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลประกอบการตรวจด้วย การยืนยันผลการติดเชื้อโรคใบขาวใช้การตรวจด้วยไพรเมอร์ที่ได้พัฒนาให้จำเพาะต่อยีน *secA* ของเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อย การใช้วิธี direct PCR ในการตรวจเพื่อลดการปนเปื้อน ทำให้มีข้อเสียคือมีความไวต่ำ ปริมาณเชื้อต่ำสุดที่ตรวจได้ด้วยวิธีการนี้จึงเทียบเท่ากับผลการตรวจด้วย 700 bp ที่ได้จากยีน 16S-23S rDNA การตรวจปริมาณเชื้อที่ได้ข้อมูลทีละเยื่อมากขึ้นใช้เทคนิค Realtime PCR ซึ่งได้พัฒนาวิธีการตรวจโดยใช้ยีน *secA* โดยมีช่วงความเข้มข้นของเชื้อที่เชื่อมั่นได้อยู่ระหว่าง 10^2 - 10^{10} copies/ μ l (20 ng plant DNA) การจำแนกชนิดของเชื้อได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจความแตกต่างของลำดับเบสตำแหน่ง SNPs ที่สามารถแยกเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวของอ้อยทั้ง 3 ชนิดออกจากกันได้ โดยใช้เทคนิค HRM แทนการวิเคราะห์ลำดับเบส ทำให้ได้ผลในเวลารวดเร็ว แม่นยำ และแปลผลง่าย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานด้านพาหะนำโรค หรือการติดเชื้อข้ามชนิด ในการรายงานผล ใช้รหัสสีที่สื่อความหมายที่ผู้ใช้เข้าใจได้ทันที ซึ่งพัฒนาจากการประมวลปริมาณเชื้อ ระดับความเครียดในอ้อย และโอกาสในการแสดงอาการใบขาว โดยกำหนดเป็น 4 สีที่สามารถแสดงถึงระดับอันตรายที่ไม่ควรนำไปขยายพันธุ์ต่อจนถึงระดับปลอดภัยที่ขยายพันธุ์ต่อไปได้ รวมถึงคาดการณ์การเกิดใบขาวในรุ่นต่อมา นอกจากนี้ยังมีการกำหนดสีที่หมายถึงการติดเชื้ออื่นร่วมด้วย จากการติดตามผลการตรวจโรคใบขาวด้วยวิธีใหม่นี้ ในตัวอย่างที่ส่งตรวจในปี 2557 พบว่าผลการตรวจและการคาดการณ์ด้วยรหัสสีสอดคล้องกับอุบัติการณ์ใบขาวในอ้อย



การนำไปใช้ประโยชน์

วิธีการใหม่ที่พัฒนาขึ้นนี้ได้มีการนำมาใช้ตรวจตัวอย่างอ้อยที่ส่งตรวจในปี 2557 แล้วประมาณ 1535 ตัวอย่างโดยกลุ่มเป้าหมายที่นำไปใช้ประโยชน์ เป็นนักวิจัยของกรมวิชาการเกษตร และจากหน่วยงานอื่น มีการนำไปใช้ในโครงการผลิตอ้อยสะอาดเพื่อปลูกทดแทนพื้นที่ปลูกข้าวที่ไม่เหมาะสม โครงการความร่วมมือระหว่างหน่วยงานภาครัฐและเอกชนในการกำจัดโรคใบขาว โครงการแปลงต้นแบบสำหรับขยายพันธุ์อ้อยสะอาดของ สวพ.3 โครงการวิจัยร่วมระหว่าง JIRCAS และศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น เพื่องานปรับปรุงพันธุ์อ้อย และการวิจัยด้านโรคใบขาวในเขตภาคอีสาน งานวิจัยจากหน่วยงานอื่นนอกกรมวิชาการเกษตร มีการเผยแพร่ผลงานในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาวิธีการใหม่ในการประชุมนำเสนอผลงานประจำปีของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น งานประชุม TSP 2012 ที่จังหวัดเชียงใหม่ งานประชุมแถลงผลงานวิจัยร่วมระหว่างศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นและ JIRCAS งานประชุม ISSCT Congress ที่ประเทศบราซิลปี 2556 งานประชุมอ้อยแห่งชาติ ปี 2554 ที่สุพรรณบุรี และ 2555 ที่ขอนแก่น มีการถ่ายทอดวิธีการตรวจโรค และแลกเปลี่ยนข้อมูลกับนักวิจัยจาก Yunnan Sugarcane Research Institute ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน และตีพิมพ์ผลงานร่วมกับนักวิจัยจาก 2 สถาบัน ได้แก่ Pflanzenphysiologie, Universität Bayreuth ประเทศเยอรมนีและ Department of Plant Biology, University of Aleppo ประเทศซีเรีย

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นที่สนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย ขอขอบคุณนักวิจัยจากหน่วยงานเครือข่าย สวพ. 3 และ 4 จำนวน 10 แห่ง ที่ร่วมในโครงการขยายพันธุ์อ้อยสะอาด ที่ดำเนินการสำรวจและส่งตัวอย่างมาวิเคราะห์ ขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญ นฤทัย วรสถิตย์ ที่ดำเนินงานโครงการแปลงต้นแบบเพื่อขยายพันธุ์สะอาด คณะนักวิจัยจากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่นและสถาบันวิจัยพืชไร่ฯ ที่ส่งตัวอย่างมาเพื่อวิเคราะห์ Mr. Ando Shataro, Dr. Tsuruta Shinichi และ Mr. Yoshifumi Terajima นักวิจัยจาก JIRCAS ที่สนับสนุนงบประมาณสำหรับการตรวจวิเคราะห์ในส่วนที่เกี่ยวข้อง ขอขอบคุณ คุณดาร์เร็น มณีจันทร์ จากสถาบันวิจัยพืชไร่ฯ ที่ช่วยเหลือด้านเอกสาร และที่สำคัญขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ที่ช่วยให้งานวิจัยดำเนินการได้และประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ สุภกาญจน์ ล้วนมณี สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล และเกษม ชูสอน. 2554. ปัจจัยทางการเกษตรที่เสี่ยงต่อการเกิดโรคใบขาวของอ้อย. หน้า 63-68. ใน: เอกสารประกอบการประชุมเสวนาวิชาการอ้อย “วิกฤติและโอกาสอ้อยไทยในเวทีโลก” 30-31 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร.



- กอบเกียรติ ไพศาลเจริญ ชงชัย ตั้งเปรมศรี สุกกาญจน์ ส่วนมณี ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล วันทนา ตั้งเปรมศรี นิลุบล ทวีกุล ทักษิณา สันสยะวิชัย และเกษม ชูสอน. 2553. การจัดการสมมูลธาตุอาหารพืชเพื่อความทนทานของอ้อย ที่มีต่อโรคใบขาวในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. รายงานผลงานวิจัยปี 2553 ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร หน้า 295-303.
- ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ทักษิณา สันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีบาง .2557 . 1.เอกสารรายงาน ดป.ชนิดในอ้อยที่เป็นโรคใบขาวรอบ .2557 เดือน ประจำปี 12กรมวิชาการเกษตร.
- ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ชีรวุฒิ วงศ์วรรณ์ สุรศักดิ์ แสนโคตร ทักษิณา สันสยะวิชัย สุนี ศรีสิงห์ SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูงผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการ .2556 . .2555 เกษตร ประจำปีกรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ .15-1 หน้า .
- ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ชีรวุฒิ วงศ์วรรณ์ ปิยะดา ชีรกุลพิสุทธิ์ ทักษิณา สันสยะวิชัยสุนี ศรีสิงห์ นิลุบล ทวีกุล นฤทัย วรสถิตย์ และรังสี เจริญสถาพร. 2554. วิธีประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย ด้วยเทคนิคพีซีอาร์. หน้า 74-80. ใน: เอกสารประกอบการประชุมเสวนาวิชาการอ้อย “วิกฤติและโอกาสอ้อย ไทยในเวทีโลก” 30-31 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี สำนักวิจัยและพัฒนาการ เกษตรเขตที่ 5 กรมวิชาการเกษตร.
- ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล ชีรวุฒิ วงศ์วรรณ์ สุนี ศรีสิงห์ และ ปิยะดา ชีรกุล พิสุทธิ์. 2555. ความหลากหลายทาง พันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ก่อโรคในอ้อยและหญ้าบางชนิดของประเทศไทย จากลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 16S-23S rRNA intergenic spacer region. ว. แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ 3: 231-240.
- Ahrens U. and E. Seemüller. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Aldaghi, M., S. Massart, S. Roussel and M.H. Jijakli. 2006. Establishment of a New Method for Rapid and Precise Estimation of Apple Proliferation Phytoplasma Concentration in Periwinkle. *Comm. Appl. Biol. Sci.* Ghent University, 71/3a, pp. 853-857.
- Areekit, S., P. Kanjanavas, A. Pakpitchareon, P.Khawsak, S. Khuchareontaworn, T. Sriyaphai, K. Chansiri. 2009. High resolution melting real-time PCR for rapid discrimination between *Brugia malayi* and *Brugia Pahangi*. *J. Med Assoc Thai* Vol. 92 Suppl. 3.
- Bekele, B., Abeyasinghe, S., Hoat, T. X., Hodgettes, J., Dickinson, M. 2011. Development of specific secA-based diagnostics for the 16SrXI and 16SrXIV phytoplasmas of the Gramineae. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S15-S16, 2011
- Berges, R. M. Rott, E. Seemüller. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopath.* 90. pp. 1145–1152
- Deng S., C. Hiruki. 1991. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes. *J. Microbiol. Methods.* 14: 53-61.
- Hanboonsong, Y., W. Ritthison, and C. Choosai, 2005. Molecular detection and transmission of sugarcane white leaf phytoplasma in leafhopper. *KKU Res. J.* 10(1): 13-21.



- Harrison, N.A., M. Womack, and M.I. Carpio. 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Disease*. 86, 676-681.
- Harrison, N.A., M. Womack, and M.I. Carpio. 2002. Detection and characterization of a lethal yellowing (16SrIV) group phytoplasma in Canary Island date palms affected by lethal decline in Texas. *Plant Disease*. 86, 676-681.
- I.-M Lee, R.W Hammond, R.E Davis, D.E Gundersen. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopath*. 83. pp. 834–842
- Jarausch, W., T. Peccerella, N. Schwind, B. Jaruusch and G. Krczal. 2004. Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the quantification of apple proliferation phytoplasmas in plants and insects. *Acta Hort.*, **657**:415-420.
- Jones, D. P. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: 1865–1879.
- 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 Biotech.*.231-224 :(2)74
- Martini, M., P. Ermacora, G. Magris, F.Ferrini and N. Loi. 2011. Symptom expression and ‘*Candidatus* Phytoplasma prunorum’ concentration in different *Prunus* species. *Bulletin of Insectology* 64 (Supplement): S171-S172.
- Matsumoto, T., C. S. Lee, and W. S. Teng. 1968. Studies on sugarcane white leaf disease of Taiwan with special reference to transmission by a leafhopper, *Epitettix hiroglyphicus* Mats. *Proc. Soc. Sugarcane Technol.* 13: 1090-1099.
- Oshima, K., S. Kakizawa, H. Nishigawa, H-Y. Jung. W. Wei. S. Suzuki, R. Arashida, D. Nakata, S. Miyata, M. Ugaki, and S. Namba. 2004. Reductive evolution suggested from the complete genome sequence of a plant-pathogenic phytoplasma. *Nature Genetics*. 36, 27-29.
- Sakuanrungrasirikul, 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. *Proc. Int. Soc. Sugar cane technol.*, Vol 28, 2013.
- Sánchez-Rojo, S., López-Delgado, H.A., Mora-Herrera, M.E., Almeyda-León, H.I., Zavaleta-Mancera, H.A., Espinosa-Victoria, D. 2010. Salicylic Acid Protects Potato Plants from Phytoplasma-associated Stress and Improves Tuber Photosynthate Assimilation. *Am. J. Pot Res.* DOI 10.1007/s12230-010-9175-y.
- Soufi, Z. 2012. Molecular detection and identification of phytoplasmas in sugarcane in Hawaii, Thailand, Cuba and Near East. Ph.D. Dissertation. Bayreuth, Germany.
- Srivastava, S., V. Singh, P.S. Gupta, O.K. Sinha, and A. Baitha. 2006. Nested PCR assay for detection of sugarcane grassy shoot phytoplasma in the leafhopper vector *Deltocephalus vulgaris*: a first report. *Plant Pathol.* 55: 25-28.



- Torres, E., E. Bertolinie, M. Cambra, C. Monton, and M.P. Martin. 2005. Real-time PCR for simultaneous and quantitative detection of quarantine phytoplasmas from appleproliferation (16SrX) group. *Mol. Cell. Probes*, **19**:334-340.
- Weintraub, P.G., and L. Beanland. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. *Annual Review of Entomology*, **51**: 91-111.
- Whelan, J.A., N.B. Russel, M.A. and Whelan, M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. *J. Immunol. Methods* **278**: 261-269.
- Wongwarat, T., S. Sakuanrungsirikul and P. Theerakulpisut. (2011). Effective method of preserving SCWL-diseased sugarcane leaves for genomic DNA extraction and molecular detection of phytoplasma. *Afr. J. Biotechnol.* **10**(53):10871-10876.
- Zhao, Y., W. 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.
- Zianni, M.R., M.R. Nikbakhtzadeh, B. T. Jackson, J. Panescu and W. A. Foster. 2013. Rapid discrimination between *Anopheles gambiae* s.s. and *Anopheles arabiensis* by high-Resolution melt (HRM) analysis. *J. of Biomol.Tech.* **24**:1-7.

Table 1 Comparison of sugarcane white leaf phytoplasma concentration estimated by three different approaches including absolute quantification Real time PCR (RT-PCR) of secA gene, banding intensity levels generated by conventional PCR at 16S-23S rDNA and at secA gene and color code ranges. Not detected: out of acceptable range. * Leaf from 3 individual samples collected from different source. ** Concentration in 25 ng plant DNA.

Leaf symptom*	Detection techniques					Color code	
	RT-PCR-secA	Conventional PCR DNA banding intensity					
		Concentration range (copies/μl)**	Plasmid Concentration (copies/μl)**	16S-23S rDNA			secA (277 bp)
				700 bp	210 bp		
Fully White	1.54x10 ⁵ - 7.91 x10 ⁵	10 ⁵	4+	4+	4+	red	
Partial white	1.2x10 ³ - 1.74x10 ⁴	10 ⁴	4+	4+	3+ to 4+	red	
		10 ³	3+	4+	2+ to 3+	red	
green	No detected	10 ²	2+	4+	<2+	red	
green	No detected	10 ¹	1+	4+	< 1+	red	
green	No detected	1	0	4+	0	orange	
green	No detected	<1	0	2+ to 3+	0	orange	
green	No detected	<1	0	1+	0	green	
green	No detected	<1	0	0	0	white	



Table 2 Estimation of sugarcane white leaf phytoplasma concentrations indicate by color codes in sugarcane leaf samples collected from different planting fields. Red and orange indicate high concentration. Green and white indicate low concentration. Yellow indicates multiple infections.

RDC: Research and Development Center, RC: Research Center. NS: no survey

Sender	amount	Phytolasma Concentration (Sample percentage)					White leaf in ratoon by visual observation
		red	orange	green	white	yellow	
1.RDC. Kalasin	24	0.0	66.0	34.0	0.0	16.0	Some emerged in plant cane
2.RDC. Khon Kaen	10	0.0	70.0	0.0	30.0	90.0	NS
3. RDC. Chaiyaphum	14	0.0	100.0	0.0	0.0	43.0	NS
4.RDC. Nakorn ratchasima	16	0.0	87.5	12.5	0.0	0.0	NS
5.RDC. Nonsong (1)	74	5.4	56.8	16.2	24.3	45.9	Ratoon 2: white
6. RDC. Nonsong (2)	32	0.0	21.9	0.0	78.1	0.0	NS
7.RDC. Mukdahan	22	31.8	68.2	0.0	0.0	22.7	NS
8.RDC. Roi et	7	0.0	14.3	14.3	71.4	28.6	none
9.RDC. Sakon nakorn	2	0.0	100.0	0.0	0.0	100.0	None/ irrigate
10.RDC. Makasarakham	22	0.0	27.2	4.5	68.1	13.6	White 0.01% app
11.RDC. Udonthani	17	0.0	76.5	0.0	23.5	100.0	White over 50%
12.RC. Khon Kaen (Chayan)	22	0.0	4.5	4.5	90.9	0.0	None
13.RC. Khon Kaen (Pakphum1)	10	0.0	30.0	70.0	0.0	0.0	White shoot 1%
14. RC. Khon Kaen (Pakphum2)	10	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	NS
15. RC. Khon Kaen (Pakphum3)	16	0.0	12.5	0.0	87.5	0.0	NS

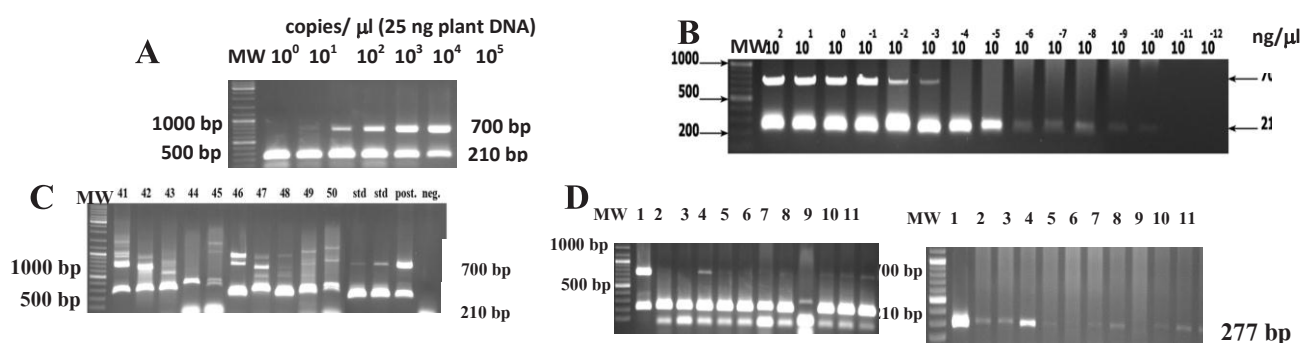


Figure 1 Nested-PCR amplification of sugarcane white leaf phytoplasma using primers targeted 16S-23S rDNA gene by nested-PCR with first set PCR product of 700 bp and second set product of 210 bp. A. PCR products of different plasmid concentrations containing 700 bp fragments ranging from 10^0 - 10^{10} copies/ μ l (25 ng plant DNA). B. Banding intensities of 700 bp and 210 bp amplified from serial dilution of DNA extracted from white leaf samples. C. Banding patterns obtained from DNA extracted from field samples with multiple infections. D. Banding results obtained from samples amplified by 16S-23S rDNA Nested-PCR amplification (left) and secA (right) showing banding intensities of corresponding samples.



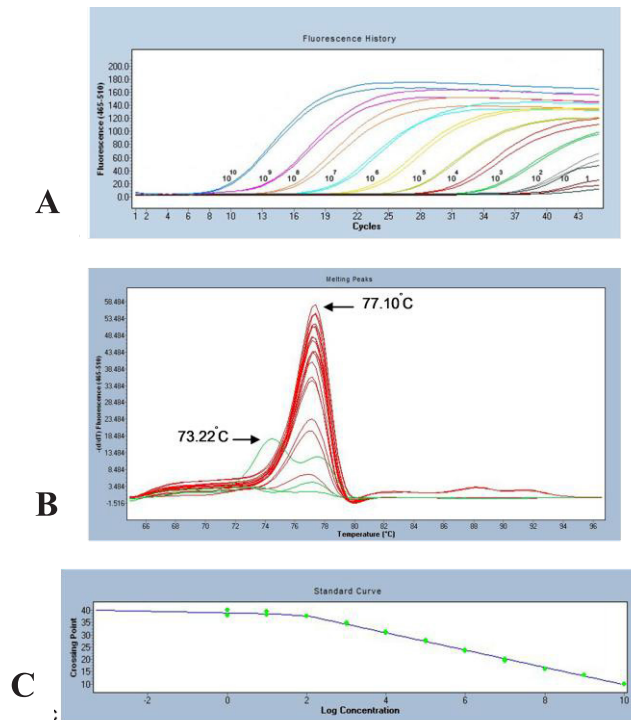


Figure 2 Amplification curves obtained from realtime PCR detection of different concentration of plasmid containing *secA* gene fragment. **A.** Curves showing threshold cycle (Ct) of amplification plasmid pUC1318-*secA* with $1-10^{10}$ copies/μl (25 ng plant DNA). **B.** Curves showing melting temperature (Tm) peak of target DNA at 77.10 °C. **C.** Standard curve generated from Ct and $\log_{10}$ pUC1318-*secA* concentration ranging from $1-10^{10}$ copies/μl (25 ng plant DNA)

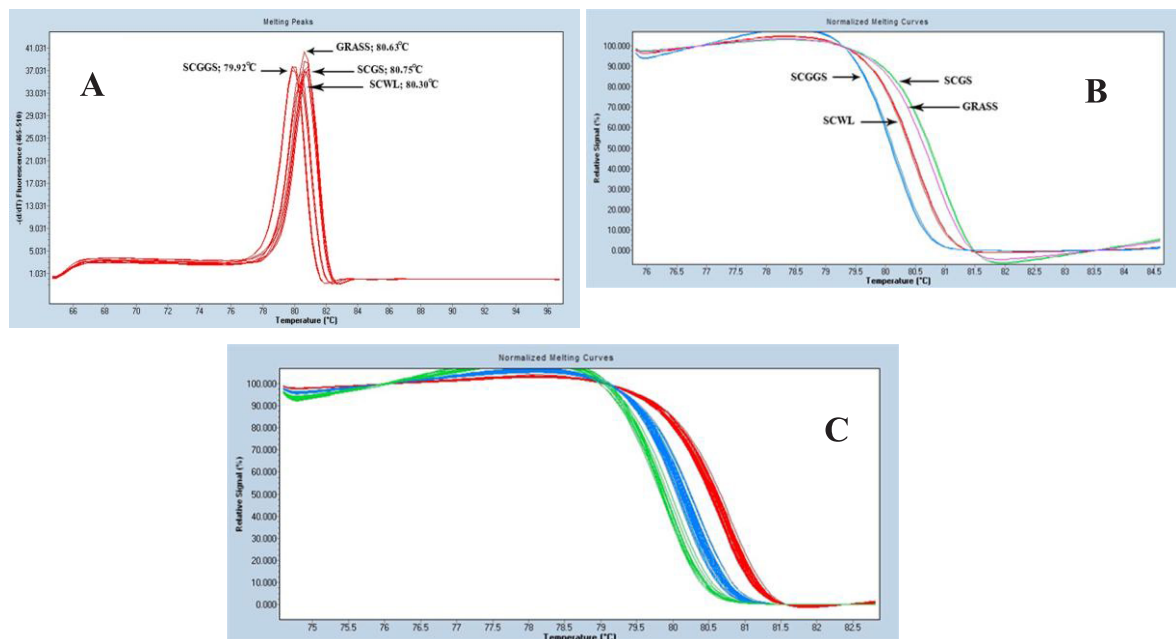


Figure 3 Gene typing of 3 different sugarcane phytoplasmas. (A) Melting peak (Tm) of 75 bp PCR products obtained from SCWL, SCGS, SCGGS and grass with white leaf showing different Tm. (B) Normalized melting curves showing segregation patterns of PCR products amplified from SCWL, SCGS, SCGGS and grass with white leaf. (C) Normalized melting curves showing segregation patterns of PCR products amplified from 15 SCWL samples, 19 SCGS and 4 SCGGS samples. Red, green and blue represent melting curves of SCWL, SCGS and SCGGS respectively.



ข้อมูลการตรวจวินิจฉัยโรคในข้าวด้วยเทคนิค Nested PCR							
วัน/เดือน/ปี	ชื่อผู้ส่ง	จำนวนตัวอย่าง/ประเภท	อาการ	PCR Product			หมายเหตุ
				700 bp	210 bp	SecA	
27/8/2014	Makdalfes@yahoo.com	22 ตัวอย่าง					
		MD1	ใบ	-	4+	2+	
		MD2	ใบ	4+	4+	4+	
		MD3	ใบ	0.5+	4+	3+	
		MD4	ใบ	0.5+	4+	1+	
		MD5	ใบ	-	4+	1+	
		MD6	ใบ	-	4+	1+	
		MD7	ใบ	-	4+	1+	
		MD8	ใบ	3+	4+	3+	
		MD9	ใบ	1+	4+	2+	
		MD10	ใบ	?	4+	0.5+	
		MD11	ใบ	-	4+	1+	
		MD12	ใบ	-	4+	0.5+	
		MD13	ใบ	?	4+	0.5+	
		MD14	ใบ	?	4+	0.5+	
		MD15	ใบ	-	4+	+/-	
		MD16	ใบ	3+	4+	2+	
		MD17	ใบ	-	4+	1+	
		MD18	ใบ	?	4+	+/-	
		MD19	ใบ	-	4+	<0.5+	
		MD20	ใบ	-	4+	2+	
		MD21	ใบ	?	4+	+/-	
		MD22	ใบ	-	4+	1+	
		positive	ใบขาว	4+	4+	4+	
		สีขาว คือ เชื้อน้อย ใช้ขยายพันธุ์ต่อไป ควรมีการดูแลสภาพดินและน้ำ					
		สีเขียว คือ จำนวน 210 มีระดับต่ำ (1+ หรือต่ำกว่า) ไม่พบ secA สามารถใช้ขยายพันธุ์ต่อไป แต่ควรมีการดูแลสภาพดินและน้ำ					
		สีส้ม คือ จำนวน 210 มีระดับสูง (2+ ถึง 4+) สามารถพบ secA ได้ตั้งแต่ 0.5+ ถึง 4+ ไม่ควรใช้ขยายพันธุ์ต่อไปในพื้นที่ดินทราย ไม่มีน้ำ					
		สีแดง คือ เชื้อสูงถึง จำนวน 700 (1+ ถึง 4+) และ 210 ระดับ 4+ และ secA ระดับ 4+ ห้ามใช้ขยายพันธุ์ต่อไปไม่มีการใบขาว					
		สีเหลือง คือ มีเชื้อเล็กน้อย หากไม่มีอาการของเชื้ออื่น สามารถใช้ขยายพันธุ์ต่อไป					
7		เครื่องหมาย ? คือ ผลจากการใช้วิธีทดสอบในข้าวร่วมกับ					

Figure 4 Example of a phytoplasma detection and diagnosis report sheet partial scale. Features includes sender's name, date, sample number, result of 700 bp and 210 bp from 16S-23S gene, 277 bp from *secA* illustrating in scale <1-4+. Color codes represent diagnosis assimilates from detection results.

Detection and estimation of sugarcane white leaf disease by Conventional PCR								Gene typing by HIRM		
Date	Name	sample name	sample type	symptom	16S-23S rDNA by nested-PCR			SecA	SecA gene (copies/ μ l)	16S (@220-294) by phylo?7
					700 bp	210 bp	+ other bacteria			
3/10/2014	Terajima	52 samples	leaves	-	3+	?	+/-	< 100	unknown	unknown
		Tera1		-	+	?	+/-	< 100	neg	unknown
		Tera2		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera3		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera4		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera5		-	3+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera6		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera7		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera8		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera9		-	3+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera10		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera11		-	+	?	+/-	< 100	unknown	
		Tera12		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera13		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera14		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera15		-	+	?	+/-	< 100	unknown	
		Tera16		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera17		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera18		-	4+	?	+/-	< 100	unknown	
		Tera19		-	1+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera20		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera21		-	1+	?	+/-	< 100	unknown	
		Tera22		-	neg	100	+/-	< 100	neg	
		Tera23		-	2+	-	+/-	< 100	SCWL*	x
		Tera24		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera25		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera26		-	4+	-	+/-	< 100	SCWL*	x
		Tera27		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera28		-	1+	?	+/-	< 100	SCGS	x
		Tera29		-	2+	?	+/-	< 100	SCWL*	x
		Tera30		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera31		-	+	?	+/-	< 100	SCGS*	x
		Tera32		-	1+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera33		-	3+	?	+/-	< 100	SCWL*	x
		Tera34		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera35		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera36		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera37		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera38		-	2+	?	+/-	< 100	SCWL*	x
		Tera39		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera40		-	1+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera41		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera42		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera43		-	3+	?	+/-	< 100	SCWL*	x
		Tera44		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera45		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera46		-	+	?	+/-	< 100	SCWL	x
		Tera47		-	2+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera48		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera49		-	3+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera50		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera51		-	+	?	+/-	< 100	neg	
		Tera52		-	-	?	+/-	< 100	neg	
		positive		3+	4+	?	+/-	< 100	1X 10 ⁸	
				estimate copy	+/- : not detectable			detectable range : 10 ¹ -10 ⁸	neg : no amplicon	
				1+ : 10	???? : unknown			white symptom visible : $\geq 10^3$	unknown peak other phytoplasmas	
				2+ : 100					SCGS : sugarcane grassy shoot	
				3+ : 1,000					SCWL : sugarcane white leaf	
				4+ : $\geq 10,000$						
									x : not recommend to use	

Figure 5 Example of a phytoplasma detection and diagnosis report sheet full scale. Features includes sender's name, date, sample number, result of 700 bp and 210 bp from 16S-23S gene, 277 bp from *secA*, realtime PCR quantification of *secA* fragment and gene typing by HRM. Color codes represent diagnosis assimilates from detection results.

