พัฒนาเทคนิคการตรวจหา immunodominant membrane protein genes (IDPs) ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

Detection of Immunodominant Membrane Protein Genes (IDPs) Associated with Sugarcane White Leaf Diseases by Molecular Biology

กาญจนา วาระวิชะนี แสนชัย คำหล้า

กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

จากรายงานต่างประเทศอ้างอิงว่า *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสามารถตรวจพบได้ง่ายภายใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อสาเหตุเข้าทำลาย ซึ่ง *imp* gene เป็นยีนชนิดหนึ่งของ immunodominant membrane protein genes (IDPs) ที่สามารถนำมาใช้ในการหาสาเหตุดังกล่าวได้ด้วยเทคนิค PCR ปี 2560 ได้ออกแบบไพร์เมอร์จำนวน 2 คู่ โดยอาศัยฐานข้อมูล GenBank ของ ACCESSION : AB469007, GenBank: FN658503 เมื่อทดสอบความเหมาะสมด้วยเทคนิค PCR กับตัวอย่างอ้อยใบขาว พบว่า ไพร์เมอร์ได้ทั้ง 2 คู่ ไม่เหมาะสมนำมาใช้ตรวจหา *imp* gene

คำหลัก : อ้อย, immunodominant membrane protein genes (IDPs), IMP, Double Antibody-sandwich Enzyme-linked Immunosorbent (DAS-ELISA), RT-PCR, nucleocapsid protein และ nonstructural protein

---

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-02-00-04-60

คำนำ

ผลผลิตพืชไร่เศรษฐกิจของปนะเทศไทยที่สามารถนำรายได้เข้าประเทศในปีหนึ่งๆ มากกว่าหมื่นล้านบาท แต่ผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยพื้นที่ปลูกกลับมีแนวโน้มลดลง ทั้งปัญหาการระบาดของโรคเป็นหนึ่งสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผลผลิตอ้อยในประเทศไทยตกต่ำ โดยเฉพาะปัญหาจากโรคใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาได้แพร่กระจายไปสู่พื้นที่ปลูกอ้อยทุกภาคของประเทศไทยอย่างต่อเนื่องในหลายพื้นที่ตั้งแต่ปี 2497 จนถึงปัจจุบัน เมื่อคิดพื้นที่พื้นที่การระบาดของปีการผลิต 2554/55 พบว่ามากกว่า 170,000 ไร่ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลของประเทศไทยไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาท (นายธวัช หะหมาน, (ม.ป.ป.) ซึ่งถือว่าเป็นโรคอุบัติซ้ำซากที่ทำให้คุณภาพผลผลิตอ้อยลดลงและต้นทุนการผลิตของเกษตรกรเพิ่มสูงขึ้นจากการที่ต้องรื้อแปลงอ้อยเพื่อปลูกใหม่ และในปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีใดๆ ที่สามารถแก้ไขปัญหาที่เกิดจากโรคใบขาวได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ วิธีการควบคุมการแพร่ระบาดของโรคที่ดีที่สุด ณ ขณะนี้ คือ การใช้ท่อนพันธุ์อ้อยที่สะอาดปราศจากโรคควบคู่กับการจัดการที่ดีในแปลงผลิตเพื่อเฝ้าระวังแมลงพาหะนำโรค วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้ คือ หาวิธีการตรวจสอบที่มีความแม่นยำสูงเข้ามาเข้าช่วยแก้ปัญหาข้างต้น ซึ่งในปัจจุบันพบว่า *imp* gene เป็นยีนชนิดหนึ่งของ immunodominant membrane protein genes (IDPs) ที่สามารถตรวจพบได้ง่ายภายใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย (Morton *et al.*, 2003) ดังนั้น นักวิจัยจึงได้พยายามพัฒนาเทคนิคทางอณูชีววิทยาเพื่อนำมาใช้ตรวจหา *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งนับว่าเป็นยีนทางเลือกใหม่ที่มีศักยภาพสูงสำหรับพัฒนางานวิจัยทางด้านการตรวจสอบ และสามารถนำไปต่อยอดงานวิจัยทางด้านอินโมโนวิทยาได้ในอนาคต

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ
2. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
    - โกร่งบดตัวอย่าง
    - หลอด microcentrifuge tube ขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
    - ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียล
    - อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
    - เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
    - เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ
    - ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood)
    - เครื่อง Thermal cycler

- เครื่อง Gel electrophoresis
- เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

3. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
- ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany)
- สารประกอบ CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1.4 M NaCl, 1.0% Na2SO3 หรือ 2% 2-mercaptoethanol และ 2.0% PVP-40)
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
- Agarose gel (SeaKem)
- ชุดสกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany)
- ชุดสกัด Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany)
- DNA Purification System (Promega, USA)
- ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูปของ Wizard PlusSV Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)
- เอ็นไซม์ platinum Taqmix (Invitrogen)
- เอ็นไซม์ PLATINUM Taq polymeras High quality (Invitrogen,USA)
- β-mercaptoethanol (Sigma, USA)
- ชุดไพรเมอร์
- GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas), GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas)
- พลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega,USA), pBAD/His A, B, and C vector (Invitrogen,USA)
- T4 DNA Ligase (Promega,USA)
- competent cell (*E. coli* สายพันธุ์ DH 5□) (Invitrogen,USA)
- Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
- Ethanol
- TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)

วิธีการ

1. ทำการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับ immunodominant membrane protein genes (IDPs) คือ *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย จาก GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) และจากเอกสารที่เคยได้รายงานไว้ เพื่อใช้ประกอบการวิจัย

2. ออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ imp gene ที่มีศักยภาพเหมาะสมจาก GenBank และค้นหาข้อมูลไพร์เมอร์ที่เคยมีรายงานมาแล้วมาหาความจำเพาะของไพร์เมอร์ด้วย BLASTN programs (http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html) เพื่อนำผลข้อมูลที่ได้มาใช้เป็นแนวทางในการออกแบบไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อสาเหตุดังกล่าวข้างต้น

3. เก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูก จ.นครราชสีมา จ.ขอนแก่น

4. สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany) (ดำเนินการปี 2560-2561) ชั่งตัวอย่างพืช ประมาณ 0.1 กรัม บดให้เป็นผงละเอียด และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำใส่หลอด microcentrifuge tube ไปแช่ที่ 65 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใส มาเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทำการเก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ในขั้นต่อไป

5. ทำการบันทึกข้อมูลและจัดทำรายงาน

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2559-กันยายน 2560

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยว *imp* gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งเป็นยีนชนิดหนึ่งของ immunodominant membrane protein genes (IDPs) ที่สามารถตรวจพบได้ง่ายภายใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย (Morton et al., 2003) เพื่อใช้ประกอบการวิจัย

2. ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank ของ ACCESSION : AB469007, GenBank: FN658503 นำมาเข้า Clustal Omega programs (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) เปรียบเทียบความแตกต่างส่วนยีนและเลือกตำแหน่งไพร์เมอร์ ด้วย Primer3 programs (http://simgene.com/Primer3) และหาความจำเพาะของไพร์เมอร์และคุณสมบัติที่เหมาะสมของไพร์เมอร์ด้วยBLASTN programs และ Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html) สรุปในปี 2560 ได้ออกแบบไพร์เมอร์ได้จำนวน 2 คู่ เพื่อนำมาใช้ทดสอบความเหมาะสมด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

3. ได้ตัวอย่างกออ้อยที่แสดงอาการใบแคบสีขาว เรียวเล็กกว่าปกติ ต้นแคระแกร็น แตกหน่อเร็ว จากแปลงปลูกที่จังหวัดนครราชสีมา (ภาพที่ 1) มาปลูกไว้ในกระถางภายในโรงเรือนของกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อสำหรับทดสอบต่อไป

4. ปี 2560 ได้ออกแบบไพร์เมอร์ได้จำนวน 2 คู่ เพื่อนำมาใช้ทดสอบความเหมาะสมด้วยเทคนิค PCR สรุปผล ไพร์เมอร์ได้ทั้ง 2 คู่ ไม่เหมาะสมนำมาใช้ตรวจหา imp gene ดังนั้น ในปี 2561 จำเป็นต้องสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับ *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาจาก GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) หรือจากเอกสารต่างประเทศที่ได้รายงานไว้เพื่อนำมาออกแบบไพร์เมอร์คู่ใหม่ เพื่อนำมาใช้ทดสอบความเหมาะสมด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

ภาพที่ 1 แสดงอาการโรคอ้อยใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาจากแปลงปลูกอ้อย จ.นครราชสีมา

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยว *imp* gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งเป็นยีนชนิดหนึ่งของ immunodominant membrane protein genes (IDPs) ที่สามารถตรวจพบได้ง่ายภายใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย (Morton *et al.*, 2003) ปี 2560 ได้ออกแบบไพร์เมอร์ได้จำนวน 2 คู่ โดยอาศัยฐานข้อมูล GenBank ของ ACCESSION : AB469007, GenBank: FN658503 เมื่อทดสอบความเหมาะสมด้วยเทคนิค PCR กับตัวอย่างอ้อยใบขาว สรุปผล ไพร์เมอร์ได้ทั้ง 2 คู่ ที่ออกแบบไว้เมื่อปี 2560 ไม่เหมาะสมนำมาใช้ตรวจหา imp gene ดังนั้น ในปี 2561 จำเป็นต้องสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับ *imp* gene ของเชื้อไฟโตพลาสมาจาก GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) หรือจากเอกสารต่างประเทศที่ได้รายงานไว้เพิ่มเติมเพื่อนำมาออกแบบไพร์เมอร์คู่ใหม่เพื่อนำมาใช้ทดสอบความเหมาะสมด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

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