การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลังโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

Invsetigation of Phytoplasma Causing Cassava Witches' Broom Disease by Molecular Biology

กาญจนา วาระวิชะนี ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย

กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

มันสำปะหลังเป็นพืชที่ใช้ประโยชน์ทั้งการแปรรูปเพื่อการบริโภค และใช้เป็นอาหารสัตว์ ในปัจจุบันแผนยุทธศาสตร์ของประเทศได้กำหนดให้มันสำปะหลังเป็นพืชทดแทนพลังงานเพื่อใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอล จึงต้องมีการเพิ่มพื้นที่ในการปลูกมากขึ้น ในเดือนเมษายน ปี 2551 เกิดมีการระบาดของเพลี้ยแป้งเข้าทำลายมันสำปะหลังที่.อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ต่อมา รศ.ณรงค์ 2552 ได้มีรายงานว่าสำรวจพบโรคพุ่มแจ้ (Phyllody) มันสำปะหลัง ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา แพร่ระบาดไปตามพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังจังหวัด ได้แก่ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด สระแก้ว นครนายก ปราจีนบุรี เป็นต้น สำหรับประเทศไทยยังมีผู้ศึกษาโรคนี้น้อยมากและยังไม่มีหลักฐานของข้อมูลใดปรากฏว่าพบโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) มันสำปะหลังในประเทศไทย ในปี 2554 ตรวจตัวอย่างสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายเชื้อไฟโตพลาสมาในพื้นที่ปลูกของประเทศไทยทางภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และปราจีน และอีสานได้แก่ จังหวัดบุรีรัมย์ นครราชสีมา ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด มหาสารคาม ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และอุดรธานี ด้วยuniversal ในส่วน 16s ribosomal RNA ด้วย primer 2 คู่ คือ P1/P7 และ R16F2/R2 จากการตรวจสอบยังไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไฟโตพลาสมาในทุกตัวอย่าง

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-06-54

คำนำ

เชื้อไฟโตรพลาสมามีลักษณะลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปจะคล้ายกับแบคทีเรียมีขนาดเล็กที่สุด แต่ไม่มีผนังเซลล์ รูปร่างไม่แน่นอนมีขนาด 80-900 นาโนเมตร เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช สามารถพบเชื้ออยู่ในกลุ่มเซลล์ท่ออาหารของต้นพืช (Shikata *et. al.,* 1969) ลักษณะอาการของโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) มันสำปะหลัง ที่พบ คือ ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยมากกว่าปกติ และมีขนาดเล็ก ใบมีสีเหลืองซีดใบที่เป็นโรคจะเริ่มแห้งตายจากใบล่างขึ้นไปถึงที่ปลายยอด ต่อมากิ่งก้านเกิดอาการแห้งตายจากยอด (Die back) ลำต้นแสดงอาการแคระแกรน ผลผลิตหัวลดลง (Martiez-Lopez., 1977) Elizabeth *et al.,* (2007) ได้รายงานว่าพบโรค cassava Frogskin disease (CFSD) ที่เกิดจากเชื้อไฟโตรพลาสมาซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrIII ribosomal และโรคนี้ทำลายผลผลิตถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ในพื้นที่การปลูกมันสำปะหลังของประเทศโคลัมเบีย บราซิล เวเนซูเอร่า และปานามา อาการจะพบที่ระบบรากมีลักษณะยาวผิดปกติ และมีชั้น cortex หรือ ชั้น epidermis ที่มีความหนากว่าพืชปกติ ถ้าอาการเป็นรุนแรงมากระบบรากจะแห้งตายในที่สุด ในเดือนเมษายน ปี 2551 เกิดมีการระบาดของเพลี้ยแป้งเข้าทำลายมันสำปะหลังที่.อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา พบความเสียหายของการทำลายในพื้นที่ปลูกประมาณ 3000,000 ไร่ (http://www.pandintong.com/ViewContent.php?ContentID=3971, 24 สิงหาคม 2552) ต่อมา รศ.ณรงค์ 2552 ได้มีรายงานว่าสำรวจพบโรคพุ่มแจ้ (Phyllody) มันสำปะหลัง ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา แพร่ระบาดไปตามพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังจังหวัด ได้แก่ ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด สระแก้ว นครนายก ปราจีนบุรี เป็นต้น ซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการระบาดของเพลี้ยแป้งด้วย ขณะนี้จึงทำให้เกิดความสับสนขึ้นว่าอาการที่ปรากฏกับมันสำปะหลังเกิดจากเพลี้ยแป้งอย่างเดียวหรือเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ร่วมเข้าทำลายด้วย เพราะลักษณะอาการที่พืชแสดงคล้ายคลึงกันมาก เช่น ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยมากกว่าปกติ ใบมีขนาดเล็ก และมีสีเหลืองซีดที่ใบ เป็นต้น สำหรับประเทศไทยยังมีผู้ศึกษาโรคนี้น้อยมากและยังไม่มีหลักฐานของข้อมูลใดปรากฏว่าพบโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) มันสำปะหลังในประเทศไทย จึงต้องเร่งสำรวจเพื่อสาเหตุที่แท้จริงว่าเกิดจากศัตรูพืชชนิดใดและทำการป้องกันกำจัดให้ถูกต้องตามสาเหตุนั้นๆ เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิตได้ทันท่วงที พร้อมทั้งหาวิธีการตรวจวินิจฉัยว่าที่รวดเร็ว แม่นยำสูง ควบคู่ไปด้วย เช่น ตรวจด้วยเทคนิคทางด้านอณูชีวิทยา เป็นต้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายเชื้อไฟโตพลาสมาในพื้นที่ปลูกของประเทศไทยทางภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และปราจีน และอีสาน ได้แก่ จังหวัด บุรีรัมย์ นครราชสีมา ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด มหาสารคาม ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และอุดรธานี

2. อุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ โรงเรือน กระถาง ตระกร้า ดิน ถุงปลูก ปุ๋ย และป้ายชื่อ

3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้แช่แข็ง -20°C อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) เครื่องชั่งละเอียด เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) เครื่อง Thermal cycler และเครื่อง Gel electrophoresis

4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ไนโตรเจนเหลวสารประกอบ CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na2SO3 และ 2.0% PVP-40; Na2SO3 และ PVP-40), เอ็นไซม์ Taq DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen), GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas), Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1) และ Ethanol

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลังจากข้อมูลที่เคยมีรายงานมาเพื่อใช้ประกอบการวิจัย

2. สำรวจและเก็บตัวอย่างเชื้อไฟโตพลาสมามันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายเชื้อไฟในพื้นที่ปลูกสำคัญของประเทศไทยตัวอย่างาในพื้นที่ปลูกของประเทศไทยทางภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และปราจีน และอีสาน ได้แก่ จังหวัด บุรีรัมย์ นครราชสีมา ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด มหาสารคาม ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และอุดรธานี

3. ทำการเก็บใบพืชและเก็บท่อนพันธุ์ที่แสดงอาการโรคจากที่สำรวจมาเพื่อใช้ทดสอบต่อไปด้วยวิธีการ ดังนี้

3.1 ทำการเก็บใบมันสำปะหลังแบบแห้งแล้วเก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อใช้ทดสอบต่อในขั้นต่อไป

3.2 ทำการเก็บใบใบมันสำปะหลังแบบสดแล้วเก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อใช้ทดสอบต่อในขั้นต่อไป

3.3 ทำการปลูกท่อนพันธุ์ในกระถางปลูกภายในโรงเรือนกันแมลงเพื่อใช้ทดสอบต่อในขั้นต่อไป

4. สกัดดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลังด้วยวิธีที่เหมาะสม CTAB method (Doyle and Doyle, 1990) เป็นต้น แล้วเก็บดีเอ็นเอที่สกัดแล้วไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อใช้ทดสอบต่อในขั้นต่อไป

5. เลือกไพร์เมอร์ที่มีรายงานไว้ในส่วน 16s ribosomal RNA คือ P1/P7 และ R16F2n & R16R2 ที่ขนาดประมาณ 1,200 เบส ที่มีความเฉพาะต่อกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลัง โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนยีนที่มีศักยภาพเหมาะสมจาก GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) และนำมาออกแบบไพร์เมอร์โดยอาศัยโปรแกรม GeneFisher

6. รวบรวม วิเคราะห์ และรายงานผลการทดสอบ

7. สรุปผลและเขียนรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2553-กันยายน 2554

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการตรวจดีเอ็นเอตัวอย่างสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายเชื้อไฟโตพลาสมาในพื้นที่ปลูกของประเทศไทยทางภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และปราจีน และอีสาน ได้แก่ จังหวัด บุรีรัมย์ นครราชสีมา ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด มหาสารคาม ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และอุดรธานี ด้วยเทคนิค PCR เลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีรายงานไว้แล้ว 2 คู่ ได้แก่ P1 & P7 และ R16F2n & R16R2 ผลการตรวจสอบในปี 2554 ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ของมันสำปะหลัง

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

นำดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่สกัดด้วยวิธี CTAB buffer (จากพื้นที่ปลูกทางภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) มาทำการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ของมันสำปะหลังด้วยเทคนิค PCR เลือกใช้ไพรเมอร์ที่มีรายงานไว้แล้ว 2 คู่ ได้แก่ P1 & P7 และ R16F2n & R16R2 ผลการทดสอบในปี 2554 ไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ของมันสำปะหลังในทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ

เอกสารอ้างอิง

รศ.ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 22 มกราคม 2552 : การเฝ้าระวังโรคระบาดพืช ;โรคพุ่มแจ้ มันสำปะหลัง (Phyllody). ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สืบค้นจาก : http://www.pandintong.com/ViewContent.php?ContentID=3971 (24 สิงหาคม 2552)

Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.

Elizabeth A., M. Juan Fernando, L. German Alberto and L. John Bernard. 2007. Detection and characterization of a phytoplasma associated with frog skin disease in cassava. Bulletin of Insectology 60 (2) : 273-274.

Martiez-Lopez., G. 1977. American virus and mycoplasma disease of cassava. Proc. Cassava Protection Workshop Ser. CE-14 : 85-87.

Shikata, E., W.S. Teng and T. Matsumoto, 1969. Mycoplasma or PLT-like micre-organism detected in leaf of sugarcane plant infected with white leaf disease and suppression of the disease symptoms by the antibiotics of tetra cycline grop , J.Fac. Agri., Hokkaido Univ. 56(2) : 70-90