การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) ของมันสำปะหลังโดยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

Detection of Phytoplasma from Cassava showing symptoms Phyllody, Yellow and short internodes

กาญจนา วาระวิชะนี ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์
วันเพ็ญ ศรีทองชัย
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

โรคพุ่มแจ้ของมันสำปะหลังมีรายงานว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาในพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2552 ซึ่งลักษณะอาการคล้ายคลึงกับการทำลายของเพลี้ยแป้งและพบอาการพุ่มแจ้ระบาดทุกแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทย จึงต้องเร่งสำรวจนำมาพิสูจน์เพื่อให้ทราบว่าอาการพุ่มแจ้เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาจริงหรือไม่ เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดไดขึ้นกับผลผลิตต่อไปในอนาคต จากการตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีอาการแตกยอดเป็นกระจุกที่ยอดและกลางลำต้นจากแปลงปลูกรวม 13 จังหวัด รวม 2 วิธีการ (1.) ด้วยวิธี Nested PCR โดยใช้ไพร์เมอร์ 2 คู่ คือ P1 & T7 และ R16F2n & R16R2 ใช้ดีเอ็นเอของ Manihot esculenta' witches'-broom ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากนักวิจัยของ CIAT มาเป็น positive control และตรวจสอบด้วย restriction enzyme พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,200 เบส นั้นไม่ใช่เชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งเกิดมาจากการเกาะที่ผิดพลาดของตำแหน่งไพร์เมอร์เอง และเมื่อตัดพิสูจน์ดีเอ็นเอไฟโตพลาสมา restriction enzyme *Eco*RI ได้ชิ้นดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาดประมาณ 522 เบส และ 726 เบส แต่ในการทดสอบใช้ restriction enzyme ดังกล่าว ไม่สามารถตัดชิ้นดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง และวิธีการ (2.) ด้วยการปักชำศึกษาการเกิดอาการของท่อนพันธุ์ในโรคเรือนทดลองเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าใบและกิ่งที่แตกออกมาเป็นปกติ จากผลการทดลองครั้งนี้จึงสรุปว่ายังไม่พบโรคแตกพุ่มฝอย (Phyllody) ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา แต่อาจเกิดจากการเข้าทำลายของศัตรูพืชชนิดอื่นเพราะจะสังเกตพบเพลี้ยแป้งจำนวนมากบริเวณแตกพุ่มฝอย และอาจมีการเข้าทำลายซ้ำจากเชื้อโรคอื่นร่วมด้วย จึงพบบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของพืชบริเวณที่แตกพุ่มฝอยนั้นเป็นสีน้ำตาล

รหัสการทดลอง **03-04-54-04-03-02-06-54**

คำนำ

เชื้อไฟโตพลาสมามีลักษณะลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยทั่วไปจะคล้ายกับแบคทีเรียมีขนาดเล็กที่สุด 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) ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 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 สำหรับประเทศไทยยังมีผู้ศึกษาโรคนี้น้อยมากและยังไม่มีหลักฐานของข้อมูลใดยืนยันว่าพบโรคพุ่มแจ้ (witches' broom) มันสำปะหลังในประเทศไทย จึงต้องเร่งสำรวจเพื่อสาเหตุที่แท้จริงว่าเกิดจากศัตรูพืชชนิดใดและทำการป้องกันกำจัดให้ถูกต้องตามสาเหตุนั้นๆ เพื่อลดความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิตได้ทันท่วงที พร้อมทั้งหาวิธีการตรวจวินิจฉัยว่าที่รวดเร็ว แม่นยำสูง ควบคู่ไปด้วย เช่น ตรวจด้วยเทคนิคทางด้านอณูชีวิทยา เป็นต้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายเชื้อไฟโตพลาสมาในพื้นที่ปลูกที่สำคัญของภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 13 จังหวัด (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายเชื้อไฟโตพลาสมาในพื้นที่ปลูกที่สำคัญของภาคตะวันออกและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย 13 จังหวัด รวม 47 อำเภอ

ภาค	จังหวัด	อำเภอ	ลักษณะอาการที่พบ
ตะวันออก	จันทบุรี	แก่งหางแมว, โป่งน้ำร้อน, บางละมุง, นายายอาม	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก
	ระยอง	ปลวกแดง, วังจันทร์, บ้านฉาง,นิคมพัฒนา	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก, ใบลดรูป, ยอดม่วง
	ชลบุรี	บางละมุง, สัตหีบ	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก, ใบลดรูป
	ฉะเชิงเทรา	พนมสารคาม, สนามชัยเขต, สอยดาว, ท่าตะเกียบ	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก, ใบลดรูป
	ปราจีนบุรี	นาดี, กบินทร์บุรี	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก
	สระแก้ว	เขาฉกรรณ์, วังน้ำเย็น, เมือง, สระแก้ว, คลองหาด, วัฒนานคร	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก, ใบลดรูป
ตะวันออกเฉียงเหนือ	ชัยภูมิ	จตุรัต, เนินสง่า, บำเหน็ดณรงค์	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก
	มหาสารคราม	วาปีปทุม, กมลาไสย, กุดรัง, โกสุมวิสัย, เมือง	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก
	ขอนแก่น	เขาสวนกวาง มัจจาคีรี บ้านไผ่ บ้านแฮด	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก
	บุรีรัมย์	สตึก, บ้านด่าน, คูเมือง	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก
	นครราชสีมา	สี่คิ้ว, สีดา, สูงเนิน, ด่านขุนทด	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก, ใบพลูด่าง
	ร้อยเอ็ด	โพชัย	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก
	กาฬสินธุ์	หนองกรุงศรี, ร่องคำ, กุจฉินณารายณ์	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก
	อุดรธานี	โนนสะอาด	ยอดมันสำปะหลังแตกพุ่มฝอยผิดปกติ ใบมีขนาดเล็ก

2. อุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ โรงเรือน กระถาง ตระกร้า ดิน ถุงปลูก ปุ๋ย และป้ายชื่อ
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่
   - โกร่งบดตัวอย่าง
   - กระติกสูญกาศ
   - หลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
   - ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
- เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)
- ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood)
- เครื่อง Thermal cycler
- เครื่อง Gel electrophoresis
- เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่
   - ไนโตรเจนเหลว
   - สารประกอบ CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40)
   - เอ็นไซม์ *Taq* DNA Polymerase, Recombinant (Invitrogen)
   - GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)
   - Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1)
   - Ethanol
   - TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)
   - Agarose gel

วิธีการ

1.สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ของมันสำปะหลังจากข้อมูลที่เคยมีรายงานมาเพื่อใช้ประกอบการวิจัย

2.สำรวจและเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อไฟโตพลาสมาในพื้นที่ปลูกสำคัญของประเทศไทย โดยรวมตัวอย่างตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายเชื้อไฟโตพลาสมาของทุกอำเภอของแต่ละจังหวัด มาเป็นตัวแทนได้ 13 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างจาก ชัยภูมิ มหาสารคราม ขอนแก่น บุรีรัมย์ นครราชสีมา ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ อุดรธานี จันทบุรี ระยอง ชลบุรี ฉะเชิงเทรา และสระแก้ว **(ตารางที่ 1)**

3.ทำการเก็บใบพืชและเก็บท่อนพันธุ์ที่แสดงอาการโรคจากที่สำรวจมาเพื่อใช้ทดสอบต่อไป ด้วยวิธีการ ดังนี้

3.1 ทำการเก็บใบมันสำปะหลังแบบแห้งและสดแล้วเก็บไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียล เพื่อใช้ทดสอบต่อในขั้นต่อไป

3.2 ทำการปลูกท่อนพันธุ์ในกระถางปลูกภายในโรงเรือนกันแมลงเพื่อสังเกตอาการ

4.สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยวิธี CTAB method โดยตัดตัวอย่างมันสำปะหลังที่สุ่มมาจากแปลงทดสอบทั้งในส่วน ก้านใบ และใบ มาตัดให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 หรือ 2% 2-mercaptoethanol และ 2.0% PVP-40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดต่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายใส่ไมโครทิวบ์หลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ไมโครทิวบ์หลอดใหม่แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในไมโครทิวบ์หลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanal (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate,pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนดีเอ็นเอมาล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอน ดีเอ็นเอให้แห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หรือ TE buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

5. การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาจากมันสำปะหลังแสดงอาการคล้ายถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อไฟโตพลาสมา รวม 13 ตัวอย่างด้วยเทคนิค เทคนิค Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) ด้วยไพรเมอร์ 2 คู่ คือ P1 (5’-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3’) & T7 (5’-CGTCCTTCATCGGCTCTT-3’) และ R16F2 (5’-ACGACTGCTGCTAAGACTGG-3’) & R16R2 (5’-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3’) ซึ่งมีความจำเพาะกับยีน ในส่วน 16S ribosomal RNA (16S rRNA) ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส (Lee *et. al.*,1993 ; Marzachi, 2006) นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที และนำแผ่น agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลที่เกิดขึ้น

6. โคลนแถบดีเอ็นเอใช้พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega)และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้จากเทคนิค Nested PCR และใช้พลาสมิดพาหะ

pGEM-T Easy (Promega) ทำการเพิ่มดีเอ็นเอสายผสมโดยถ่ายฝากสู่แบคทีเรีย *E. coli* โดยวิธีการ heat shock transformation

7. ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่สังเคราะห์ได้ ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซียแล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez)

8. รวบรวม วิเคราะห์ และเขียนรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2553-กันยายน 2555

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1.สำรวจและเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อไฟโตพลาสมา

เลือกเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการที่คล้ายถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อไฟโตพลาสมา

ได้แก่ อาการพุ่มแจ้ ข้อปล้องสั้น และใบเหลืองหดสั้น **(ภาพที่ 1)** จากแปลงปลูก 13 จังหวัด รวม 47 อำเภอ **(ตารางที่ 1)** และนำท่อนพันธุ์ที่แสดงอาการโรคจากแปลงที่สำรวจมาปลูกภายในโรงเรือนเพื่อสังเกตอาการ

2.ผลการสังเกตอาการท่อนพันธุ์มันสำปะหลังภายในโรงเรือน

เมื่อนำท่อนพันธุ์มันสำปะหลังมาหักดูบริเวณข้อที่แสดงอาการอาการพุ่มแจ้ ใบเหลือง ใบหดสั้น จึงนำมาท่อนพันธุ์มันสำปะหลังดังกล่าวมาปลูกภายในโรงเรือนเพื่อสังเกตอาการ พบว่าท่อน้ำท่ออาหารเป็นสีน้ำตาล **(ภาพที่ 2ก)** และพบว่าใบมันสำปะหลังท่อนพันธุ์ที่ท่อน้ำท่ออาหารเป็นสีน้ำตาลสามารถแตกใบใหม่ได้เล็กน้อย บางท่อนแห้งตาย **(ภาพที่ 2ข)** และเมื่อหักดูประมาณข้อที่ 10 นับจากข้อที่แสดงอาการพุ่มแจ้พบว่าท่อน้ำท่ออาหารพืชปกติ **(ภาพที่ 2ค)** ซึ่งท่อนมันสำปะหลังสามารถแตกใบใหม่ได้ปกติ **(ภาพที่ 2ง)** จากผลการทดลองพบว่าพืชสามารถแตกใบใหม่ได้ตามปกติ แต่ถ้าถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลายใบที่แตกใหม่ควรแสดงอาการอาการพุ่มแจ้ ใบเหลือง ใบหดสั้นเช่นเดิม เนื่องจากเชื้อไฟโตพลาสมามีลักษณะการเข้าทำลายแบบ Systemic ไปตามท่อน้ำท่ออาหารพืช ซึ่งมันสำปะหลังที่แสดงอาการพุ่มแจ้ ใบเหลือง ใบหดสั้น อาจเนื่องมาจากเพลี้ยแป้งเข้าลายเป็น

ภาพที่ 1 : แสดงอาการยอดมันสำปะหลังมีการแตกพุ่มฝอยมากกว่าปกติใบมีขนาดเล็กและมีสีเหลืองซีด ซึ่งพบเพลี้ยแป้งจำนวนมาก ที่ จ.ขอนแก่น **(1ก)** และ จ.ระยอง **(1ข)**

จำนวนมากจึงทำให้พืชแสดงอาการดังกล่าว (**ภาพที่** 3)

ภาพที่ 2 : ปักชำท่อนพันธุ์ของมันสำปะหลังที่พบอาการพุ่มแจ้ ใบเหลือง ใบหดสั้นเพื่อสังเกตอาการในโรงเรือน

2ก : มันสำปะหลังอาการพุ่มแจ้ ใบเหลือง ใบหดสั้น แสดงท่อน้ำท่ออาหารเป็นสีน้ำตาล

2ข : ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังที่ท่ออาหารเป็นสีน้ำตาลสามารถแตกใบใหม่ได้แต่เล็กน้อยหลังปักชำไปแล้ว 7-10 วัน และบางท่อนพันธุ์ตาย

2ค : ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังแสดงท่อน้ำท่ออาหารเป็นปกติตรงบริเวณประมาณข้อที่ 10 ของพืช

2ง : ท่อนพันธุ์มันสำปะหลังตรงบริเวณประมาณข้อที่ 10 สามารถแตกใบใหม่ได้ตามปกติหลังปักชำไปแล้ว 7-10 วัน

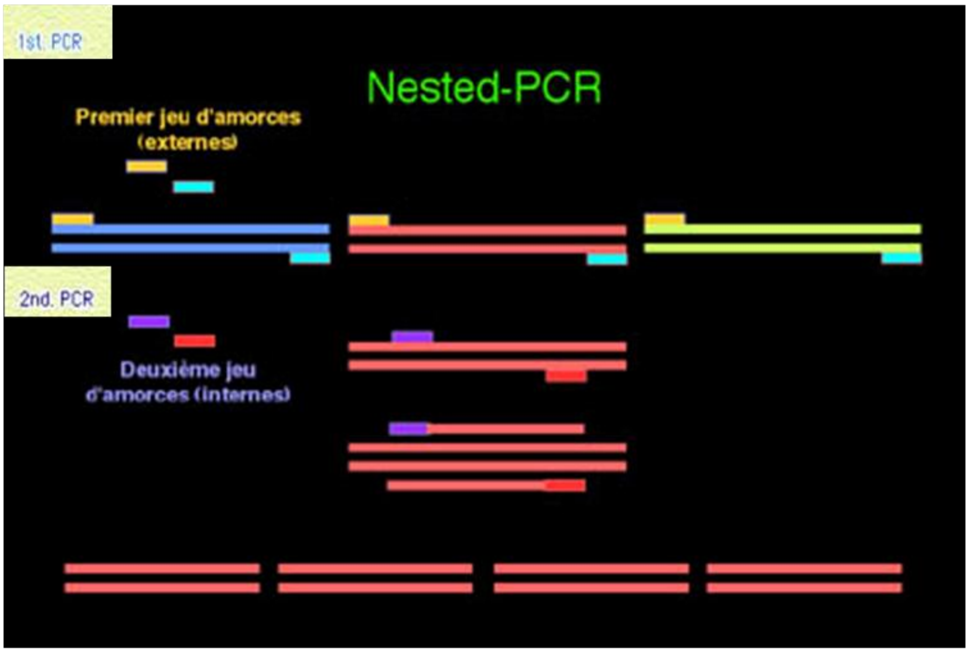
ภาพที่ 3 : มันสำปะหลังแสดงอาการพุ่มแจ้ ใบเหลือง ใบหดสั้น หลังจากถูกเพลี้ยแป้งหลังเข้าทำลาย

3ก : มันสำปะหลังแสดงอาการข้อปล้องถี่และหดสั้น และพบเพลี้ยแป้งเข้าทำลายเป็นจำนวนมาก **(ซ้าย-ขวา)**

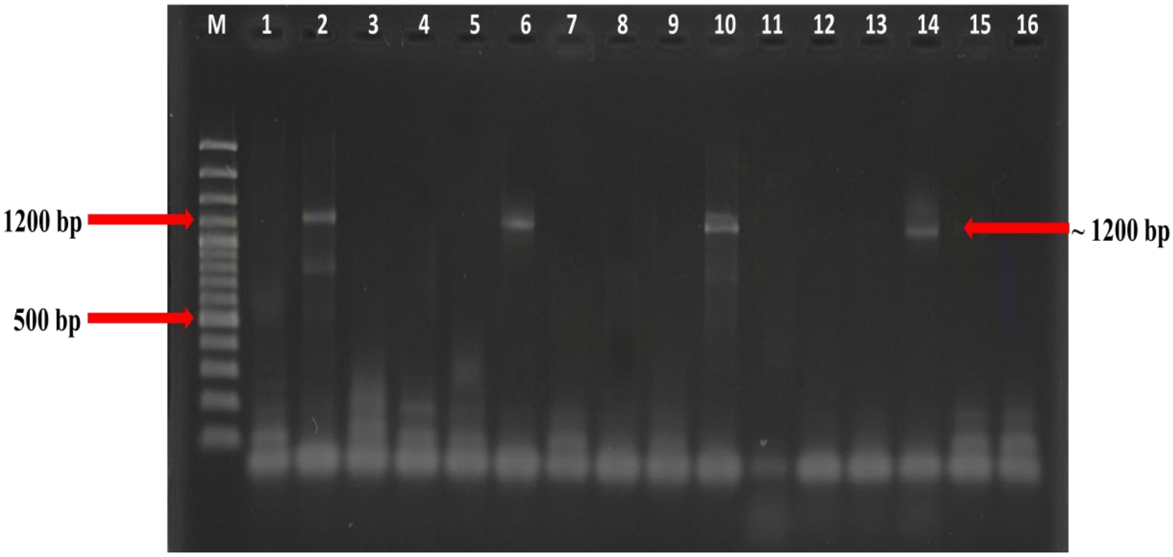
3ข : มันสำปะหลังแสดงอาการพุ่มแจ้ ใบเหลือง ใบหดสั้น **(ซ้าย)** และพบเพลี้ยแป้งซ่อนอยู่บริเวณใต้ใบพืช **(ขวา)**

3. การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการคล้ายถูกเข้าทำลายด้วยเชื้อไฟโตพลาสมา รวม 13 ตัวอย่างด้วยเทคนิค nested PCR

นำดีเอ็นเอมาตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested polymerase chain reaction (Nested PCR) คือ การทำ PCR 2 ครั้ง (**ภาพที่ 4**) ครั้งที่ 1 ใช้คู่ไพร์เมอร์ คือ P1 (5'AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT 3') และ T7 (5'CGTCCTTCATCGGCTCTT 3') และครั้งที่ 2 ใช้คู่ไพร์เมอร์ R16F2n (5'GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3'), R16R2 (5' TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G 3') ถ้าพืชมีเชื้อไฟโตพลาสมาควรแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,200 เบส เมื่อเปรียบเทียบขนาดแถบดีเอ็นเอกับ Manihot esculenta witches'-broom (Positive control) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากนักวิจัยของ CIAT มาเป็นตัวเชื้อควบคุมผลของปฏิกิริยา PCR ผลจากการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสในมันสำปะหลังรวม 13 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,200 เบสในตัวอย่างมันสำปะหลัง รวม 3 ตัวอย่าง ได้แก่ตัวอย่างจากจาก อ.บำเหน็จณรงค์ จ.ชัยภูมิ อ.บ้านแฮ จ.ขอนแก่น และ อ.ปลวกแดง จ.ระยอง (**ภาพที่ 5**)



<u>ภาพที่ 4</u> ภาพจำลองการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค nested polymerase chain reaction **(แหล่งที่มา** http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BGbioch/POLY.Chp.8.11.html)

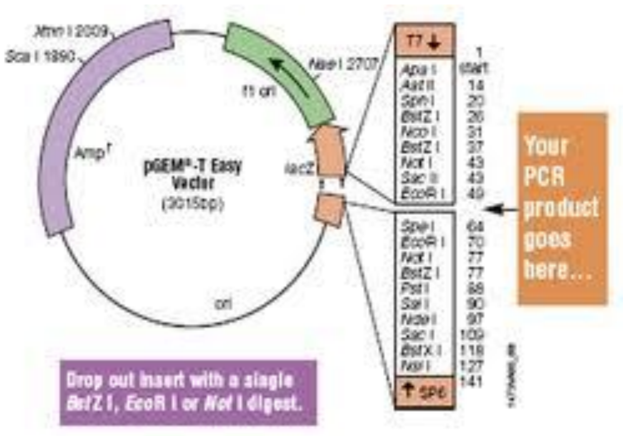


<u>ภาพที่ 5</u> แสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,200 เบสจากการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังรวม 13 ตัวอย่าง

ช่องที่	ตัวอย่าง	ผลการตรวจ
M	marker 100 bp (fermentus)	
1	ใบมันสำปะหลัง อ.คูเมือง จ.บุรีรัมย์	-
2	ใบมันสำปะหลัง อ.บำเหน็จณรงค์ จ.ชัยภูมิ	+
3	ใบมันสำปะหลัง อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
4	ใบมันสำปะหลัง อ.จังหาร จ.ร้อยเอ็ด	-
5	ใบมันสำปะหลัง อ.กมลาไสย จ.กาฬสินธุ์	-
6	ใบมันสำปะหลัง อ.บ้านแฮ จ.ขอนแก่น	+
7	ใบมันสำปะหลัง อ.ร่องคำ จ.กาฬสินธุ์	-
8	ใบมันสำปะหลัง อ.กุมภวาปี จ.อุดรธานี	-
9	ใบมันสำปะหลัง อ.โป่งน้ำร้อน จ.จันทบุรี	-
10	ใบมันสำปะหลัง อ.ปลวกแดง จ.ระยอง	+
11	ใบมันสำปะหลัง อ.บางละมุง จ.ชลบุรี	-
12	ใบมันสำปะหลัง อ.พนมสารคาม จ.ฉะเชิงเทรา	-
13	ใบมันสำปะหลัง อ.วังน้ำเย็น จ.สระแก้ว	-
14	ดีเอ็นเอของเชื้อ Manihot esculenta	-
	witches'-broom (Positive control)	+
15	ใบมันสำปะหลังปกติ (Negative control)	-
16	น้ำ	-

4. โคลนแถบดีเอ็นเอใช้พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega)และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เลือกนำแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,200 เบสของตัวอย่างมันสำปะหลังจาก อ.ปลวกแดง จ.ระยองทำการโคลนแถบดีเอ็นเอโดยใช้พลาสมิดพาหะ pGEM®-T Vector Map(Promega) (ภาพที่ 6) และถ่ายฝากดีเอ็นเอสายผสมสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* โดยวิธีการ heat shock transformation และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย



<u>ภาพที่ 6</u> ภาพจำลองพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega)
(แหล่งที่มา

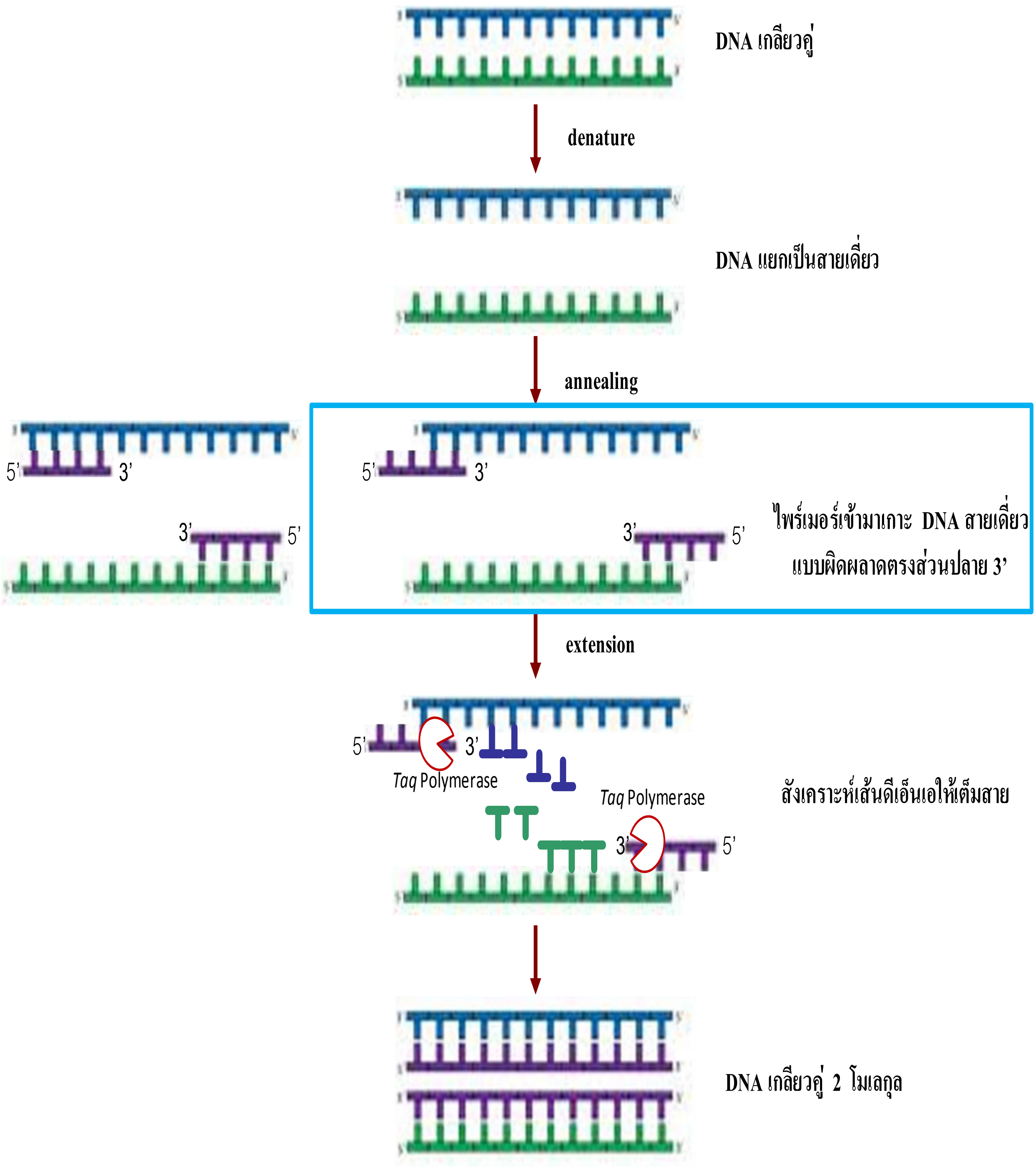
5. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างมันสำปะหลังจาก อ.ปลวกแดง จ.ระยอง ที่เลือกส่งแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,200 เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) พบว่าข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างมันสำปะหลัง อ.ปลวกแดง จ.ระยอง มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลังส่วนยีน 18S ribosomal RNA Manihot esculenta (GenBank : AB233568.1) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ จึงสรุปว่าแถบดีเอ็นเอที่พบขนาดประมาณ 1,200 เบส เป็นแถบดีเอ็นเอของพืชพืชไม่ใช่เชื้อไฟโตพลาสมา จากการตรวจสอบคู่ไพร์เมอร์พบมีเบสของคู่สมกับดีเอ็นเอของมันสำปะหลังตรงส่วนปลาย 3’ ทั้ง forword primer คือ R16F2n (5’GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG 3’และ reverse primer คือ R16R2 (5’ TGA

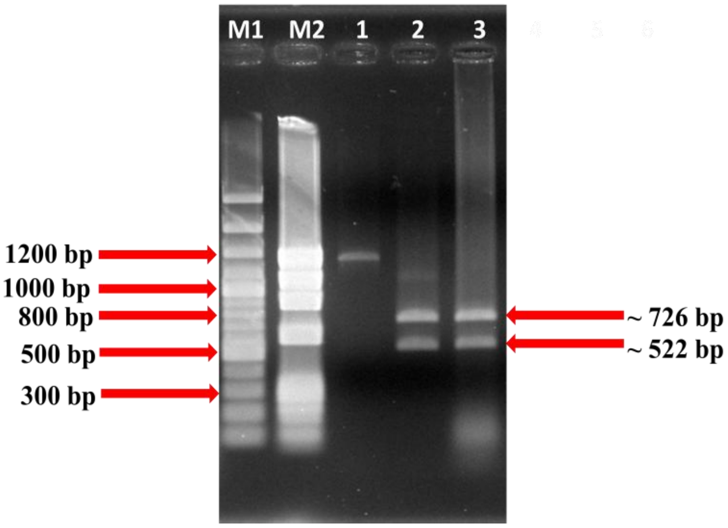
CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G 3') จึงเกิดการเกาะแบบผิดผลาดตรงส่วนปลาย 3' ซึ่งเป็นตำแหน่งการเติมเบสเพื่อให้เกิดการสังเคราะห์เส้นดีเอ็นเอต้นแบบให้เต็มสาย ซึ่งเบสของไพร์เมอร์ของ R16F2n ประกอบด้วย CTGG 3'และ R16R2 ประกอบ CCCCG 3' และมีเปอร์เซ็นต์ GC ค่อนข้างสูงมากจึงเกาะแบบเหนียวแน่นกับต้นแบบดีเอ็นเอของมันสำปะหลัง จะเห็นได้ว่าเพียง 4-5 เบส เท่านั้นที่เป็นคู่สมก็สามารถเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังให้เต็มสายได้ (http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html) จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าตัวอย่างมันสำปะหลังจาก อ.ปลวกแดง จ.ระยอง นี้ไม่มีเชื้อไฟโตพลาสมา ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจมาจากการสกัดดีเอ็นเริ่มต้นในบางครั้งไม่สะอาดได้ส่วน ribosomal ของพืชมาเยอะและเมื่อเกิดสภาวะเหมาะสมของสารประกอบในปฏิกิริยาทำให้ไพร์เมอร์คู่นี้มีโอกาศการเกาะแบบผิดผลาดตรงส่วนปลาย 3' จึงเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของมันสำปะหลังให้เต็มสายได้ในสภาวะเหมาะที่สม (ภาพที่ 7) แต่โอกาศการเกิดไม่มากนักเพราะตามคุณสมบัติของไพร์เมอร์จะมีความสามารถในการทำงานได้เต็มประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อได้เกาะกับเบสคู่สมที่ 95-100 เปอร์เซ็นต์ ไพร์เมอร์ชุดดังกล่าวที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ออกแบบไพร์เมอร์จากส่วน Ribosomal เนื่องมาจากปัญหาที่เชื้อไฟโตพลาสมายังไม่สามารถเลี้ยงได้บนอาหารสังเคราะห์จึงทำให้ไม่รู้องค์ประกอบที่แท้จริงของเชื้อตัวมากนัก นักวิทยาศาสตร์จึงเลือกออกแบบไพร์เมอร์ส่วนยีนที่ทุกสิ่งมีชีวิตจะต้องมีเป็นองค์ประกอบในการดำรงชีวิตอยู่แล้ว ดั้งนั้น คู่ไพร์เมอร์ที่เลือกใช้นักวิทยาศาสตร์ได้ถูกปรับและออกแบบให้มีลำดับเบสคู่สมกับเชื้อไฟโตพลาสมาเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์แล้ว ถ้าเป็นพืชมีเชื้อเชื้อไฟโตพลาสมาจะสามารถตรวจได้อย่างแน่นอนโดยเทียบผลกลับเมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับ Manihot esculenta witches'-broom (Positive control) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากนักวิจัยของ CIAT มาเป็นตัวเชื้อควบคุมผลของปฏิกิริยา PCR ในการตรวจสอบ และจากข้อผิดผลาดที่มีโอกาศเกิดขึ้นเนื่องจากการเกาะแบบผิดผลาดตรงส่วนปลาย 3' ของไพร์เมอร์คู่นี้อาจแก้ไขโดยปรับเปลี่ยนบางเบสหรือตำแหน่งการเกาะของไพร์เมอร์ใหม่หรือเพิ่มอุณหภูมิในช่วงการเกาะของไพร์เมอร์ให้สูงขึ้น เพื่อให้เกิดความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาเท่านั้น

จากปัญหาคู่ไพร์เมอร์ R16F2n และ R16R2 ที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอที่ประมาณ 1,200 เบสได้ ทำให้ไม่สามารถแยกได้ว่าเป็นแถบแบบดีเอ็นเอของเชื้อหรือพืช นอกจากทำการส่งอ่านผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย ซึ่งใช้เวลาในการดำเนินตามขั้นตอนประมาณ 2-3 สัปดาห์ถึงจะทราบผล จากการทดสอบครั้งนี้ทางนักวิจัยจึงหาแนวทางการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ตำแหน่งการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย restriction enzyme ที่แต่ต่างหรือเหมือนกัน โดยอาศัยโปรแกรม Restriction Mapper - Saccharomyces Genome Database สามารถบอกขนาดแถบดีเอ็นเอตรงตำแหน่งที่ restriction enzyme ต้องตัดให้ทราบก่อนเริ่มการปฏิบัติงาน โดยเลือกใช้ restriction enzyme *EcroI* สามารถตัดตำแหน่งลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมาได้ 1 ตำแหน่ง เมื่อนำมาตรวจผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จะพบแถบดีเอ็น 2 แถบ คือ ขนาดประมาณ 522 เบส และที่ขนาดประมาณ 726 เบส ส่วนแถบดี

เอ็นเอของมันสำปะหลังไม่มีตำแหน่งตัดด้วย restriction enzyme *EcroI* ของลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อนำมาตรวจผลเจลอิเล็กโทรโฟรีซีสจะพบแถบดีเอ็นที่ขนาดประมาณ 1,200 เบส เท่าเดิม **(ภาพที่ 8)**



<u>ภาพที่ 7</u> ภาพจำรองการเกาะของไพร์เมอร์ (annealing) กับ DNA สายเดี่ยวแบบผิดผลาด
ตรงส่วนปลาย 3’ ของขบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR



<u>ภาพที่ 8</u> แสดงขนาดของแถบดีเอ็นเอตำแหน่งที่ตัดด้วย restriction enzyme EcroI

ช่องที่	ตัวอย่าง	ผลการใช้ restriction enzyme
M	marker 100 bp (fermentus)	
M	marker Ox174 DNA/BsuRI (HaeIII),9 (fermentus)	
1	แถบดีเอ็นเอ อ.ปลวกแดง จ.ระยอง ใช้ restriction enzyme EcroI	uncut
2	แถบดีเอ็นเอของเชื้อ Manihot esculenta ใช้ restriction enzyme EcroI witches'-broom (Positive control)	~521 และ ~726
3	แถบดีเอ็นเอโรคใบขาวอ้อย ใช้ restriction enzyme EcroI	~521 และ ~726

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการตรวจสอบที่ PCR ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 1,200 เบส จำนวน 3 ตัวอย่างจาก อ. บำเหน็จณรงค์ จ. ชัยภูมิ อ. บ้านแฮ จ. ขอนแก่น และ อ. ปลวกแดง จ.ระยอง มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่เท่ากับ ดีเอ็นเอของ Manihot esculenta' witches'-broom (Figure 5) แต่เมื่อส่งชิ้น ดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์หาลำดับเบสด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer (The BigDye® Terminator V3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Labolatories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย พบว่า เป็นลำดับเบสของต้นมันสำปะหลังส่วนยีน 18S ribosomal RNA Manihot esculenta (GenBank:AB233568.1) ถึง 99 % ซึ่งผลที่เกิดขึ้นมาจากการเกาะในตำแหน่งที่ผิดพลาดของคู่ pimers R16F2n และ R16R2 และใช้ restriction enzyme *Eco*RI ตัดพิสูจน์ดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมาโดยตัดบนสายดีเอ็นที่ 1 ตำแหน่ง จะได้ดีเอ็นเอ 2 ชิ้นขนาดประมาณ 522 เบส และ 726 เบส ส่วนดีเอ็นเอของมันสำปะหลังไม่สามารถตัด

ตำแหน่งใดได้ **(ภาพที่ 8)** ข้อแนะนำเพิ่มเติมการใช้ตำแหน่งการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย restriction enzyme ให้แต่ต่างหรือเหมือนกัน ควรใช้ restriction enzyme ที่สามารถตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ให้ครอบคลุมทั้งยีนที่ทดสอบอย่างน้อย 2-3 ตำแหน่งจะสามารถควบคุมการแปรผลให้ผิดพลาดได้น้อยลงอีกทาง เช่น restriction enzyme *Alu*I หรือ *Hpa*II มี 3 ตำแหน่งตัดบนลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมา ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของมันสำปะหลังไม่มีตำแหน่งใดตัดได้ เป็นต้น จากผลการทดลองจึงเป็นข้อสรุปว่า ตัวอย่างมันสำปะหลังที่มีอาการแตกพุ่มฝอยที่พบทั้งหมดจาก 13 จังหวัด ไม่ใช่อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา

จากการศึกษาอาการจากท่อนพันธุ์ที่พบอาการแตกพุ่มฝอยนำมาปักชำและสังเกตอาการเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าใบและและกิ่งที่แตกออกมาเป็นปกติไม่พบอาการแตกพุ่มฝอย (**ภาพที่ 2**) และมีข้อสังเกตว่าหากท่อนพันธุ์ติดเชื้อไฟโตพลาสมามาก่อนอาการควรจะเกิดตั้งแต่ต้นเล็กที่เริ่มแตกตา เป็นพุ่มแจ้ตั้งแต่เล็ก ต้นก็ไม่สามารถเจริญเติบโตจนสูงใหญ่และไม่สามารถลงหัวได้ แต่ส่วนมากพบอาการพุ่มแจ้ในมันสำปะหลังอายุประมาณ 7-10 เดือน ลำต้นที่สูงเกิน 180 เซนติเมตรจากยอดลงมาหรือเป็นกลางต้นที่สูงกว่า 180 เซนติเมตร จึงไม่ใช่อาการที่เกิดจากไฟโตพลาสมาที่ติดไปกับท่อนพันธุ์มันสำปะหลัง

สรุปผลการทดลองครั้งนี้ว่ายังไม่พบโรคแตกพุ่มฝอย (Phyllody) ที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา แต่อาจเกิดจากการเข้าทำลายของศัตรูพืชชนิดอื่นเพราะจะสังเกตพบเพลี้ยแป้งจำนวนมากบริเวณแตกพุ่มฝอย (**ภาพที่ 3**) และอาจมีการเข้าทำลายซ้ำจากเชื้อโรคอื่นร่วมด้วย จึงพบบริเวณท่อน้ำท่ออาหารของพืชบริเวณที่แตกพุ่มฝอยนั้นเป็นสีน้ำตาล (**ภาพที่ 2ก**)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ผชช. วันเพ็ญ ศรีทองชัย ที่กรุณาตรวจแก้ไขพร้อมแนะนำ และความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน ขอขอบคุณ คุณสมใจ แก้วสร และคุณแสนชัย คำหล้า ที่ช่วยตรวจแก้ไข และขอขอบบุคลากรทุกท่านที่ให้ความสะดวกในด้านต่าง ๆ เป็นอย่างดี ไว้ ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

แผ่นดินทองเตือนภัย : โคราชโหมป้องกัน เพลี้ยแป้ง ระบาดยก 2. 7 สิงหาคม 2552 . แหล่งที่มา : (http://www.pandintong.com/ViewContent.php?ContentID=3971, 24 สิงหาคม 2552)

รศ.ณรงค์ สิงห์บุระอุดม. 22 มกราคม 2552 : การเฝ้าระวังโรคระบาดพืช ;โรคพุ่มแจ้ มันสำปะหลัง (Phyllody). ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

แหล่งที่มา : (http://www.pandintong.com/ViewContent.php?ContentID=3971, 24 สิงหาคม 2552)

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.

Lee, I M., R.W. Hammond, R.E.Davis and D.E. Gunderson. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16 SrDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms Phytopathology 83 : 834-842.

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

Primer Biosoft Accelerating in Life Science. ________. : PCR Primer Design Guideline. แหล่งที่มา : (http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html, 29 มิถุนายน 2555)

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.