

รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาการเพิ่มผลผลิตอ้อย
2. โครงการวิจัย : โครงการวิจัยการบริหารจัดการศัตรูอ้อย
กิจกรรมที่ 3 : การจัดการ โรคใบขาวแบบผสมผสาน
กิจกรรมย่อย (ถ้ามี) : -

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : 3.4 การศึกษาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วย reverse transcriptase และการหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยด้วย real time PCR

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : **Diagnostic of sugarcane white leaf phytoplasma by reverse transcriptase and quantitation of phytoplasma doses in sugarcane by real time PCR**

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางสาวศุภิรัตน์ สงวนรังศิริกุล¹
ผู้ร่วมงาน : นางทักษิณา ศันสยะวิชัย¹ นางสาวสุนิ ศรีสิงห์²
นายธีรวุฒิ วงศ์วัฒน์¹

5. บทคัดย่อ (ภาษาไทย และภาษาอังกฤษ)

งานวิจัยนี้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อย 2 วิธี ได้แก่ (1) real time PCR quantification ที่ตำแหน่งยีน secretory membrane protein A (*secA*) และ 16S rDNA และ (2) Reverse transcriptase real time PCR เพื่อใช้ได้วิธีการตรวจเชื้อใบขาวที่แม่นยำขึ้น การพัฒนาวิธีการตรวจปริมาณเชื้อชนิด Absolute quantification ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (*secA*) เทียบกับกราฟมาตรฐาน และ Relative quantification ใช้ยีนของพืช (18S rRNA) เป็นตำแหน่งอ้างอิง และใช้ยีน *secA* เป็นยีนเป้าหมาย (target gene) พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าปริมาณเชื้อที่ใกล้เคียงกัน ผลการวิเคราะห์ช่วงความเข้มข้นที่เชื่อถือได้ (PCR Efficiency) ของวิธี Realtime PCR พบว่า การตรวจ 16S rDNA ที่ได้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 700 bp มีช่วงความเข้มข้นที่เชื่อถือได้ระหว่าง 10^7 - 10^4 copy/μl และ ดีเอ็นเอขนาด 275 bp ของ *secA* มีช่วงความเข้มข้นที่เชื่อถือได้ระหว่าง 10^{10} - 10^2 copy/μl ผลการตรวจการแสดงออกของยีนของเชื้อไฟโตพลาสมาภายในอ้อยที่เป็นโรคใบขาว พบการแสดงออกของยีน *secA* ได้อย่างชัดเจนในตัวอย่างใบที่มีการติดเชื้อ

ปริมาณสูง มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกันตามอาการและลำดับใบ ผลการตรวจการแสดงออกของยีนของอ้อยที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไฟโตพลาสมา พบว่ายีนที่มีการแสดงออกมากขึ้นในต้นที่มีอาการยอดขาว ได้แก่ *Sucrose synthase (SuSy)*, *Alcohol dehydrogenase I (AdhI)* และ *Callose synthase (CaSy)* และพบว่าสภาวะแล้งจากความร้อนและขาดน้ำ ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *AdhI* และ *CaSy* การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *Adh I*, และ *CaSy* ด้วย quantitative Realtime PCR พบว่ายีน *Adh I* มีการแสดงออกในตัวอย่างอาการใบขาว ใบขาวเขียว และ ใบเขียว ในระดับประมาณ 7.5, 5.4 และ 1.5 เท่าของยีนอ้างอิง (*Actin*) ตามลำดับ ส่วนยีน *CaSy* มีการแสดงออกที่แตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างตัวอย่างอาการใบขาว ใบขาวเขียว และ ใบเขียว ในระดับประมาณ 0.56, 0.47 และ 0.43 เท่าของยีนอ้างอิงตามลำดับ

ABSTRACT

Two sugarcane white leaf phytoplasma detection methods were developed in this research for improving sugarcane white leaf disease diagnosis. The techniques are including (1) real time PCR quantification of phytoplasma targeting secretory membrane protein A (*secA*) and 16S rDNA genes, and (2) reverse transcription real time PCR targeting *secA* gene. The absolute quantification of phytoplasma concentration employed standard curve with known *secA* gene copy for evaluation while relative quantification employed plant *18S rRNA* as reference gene. Result showed that both techniques gave rise similar phytoplasma concentrations. The detection of *16S rDNA* of the 700 bp DNA fragment revealed PCR efficiency in the range of 10^4 to 10^7 copy/ μ l and 275 bp of *secA* gene were in the range of 10^2 to 10^{10} copy/ μ l. Expression of the phytoplasma *secA* gene was noticeable in leaf with white symptom. Differential expression levels of *secA* gene were found in relation to symptom severity and leaf order. Some plant genes including *Sucrose synthase (SuSy)*, *Alcohol dehydrogenase I (AdhI)* and *Callose synthase (CaSy)* were up-regulated in leaf of sugarcane with white leaf symptom. It was found that the expression of *AdhI* and *CaSy* were not affected by drought stress caused by heat and water deficit. The quantitation of *Adh I* and *CaSy* by quantitative Realtime PCR revealed *Adh I* expression level at 7.5, 5.4 and 1.5 times higher than that of the reference gene (*Actin*) in leaf with fully white, partial white and green color respectively. While those of *CaSy* revealed low differences among each other i.e., 0.56, 0.47 and 0.43 times in leaves with the same order symptoms respectively.

¹ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

² ศูนย์วิจัยพืชไร่สุพรรณบุรี

6. คำนำ

ในการตรวจวินิจฉัยโรคใบขาวของอ้อยที่นิยมในปัจจุบันเป็นการตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิค nested-PCR ซึ่งตรวจ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อตรงช่วงบริเวณ 16S rRNA gene หรือส่วนของ 16S-23S rRNA intergenic spacer region ซึ่งเป็นส่วนที่ระบุวิธีการที่ใช้ในการจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคกับพืช ดังนั้นการนำเทคนิคนี้ มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยนั้น จึงเป็นเทคนิคที่มีความไว และมีความเฉพาะเจาะจงสูง แต่เทคนิคนี้ต้องทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสองครั้ง โดยการนำผลผลิตจากครั้งที่หนึ่งมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ทำให้มักประสบปัญหาการเกิดผลบวกปลอม (false positive) โดยมักพบจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่สอง สาเหตุอาจเกิดจากการปนเปื้อนของผลผลิตพีซีอาร์ครั้งก่อน (carry over contamination) ซึ่งการปนเปื้อนนี้พบบ่อยในการตรวจวินิจฉัย (Tasaka et al., 1997; Llop et al., 2000) หรือการใช้ชนิดของไพรเมอร์ไม่เหมาะสมกับตัวอย่าง (Wally et al., 2008) ซึ่งได้เคยมีรายงานว่าไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาที่ออกแบบจากบริเวณ 16S rRNA gene นั้นสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอนี้ของแบคทีเรียบางชนิดได้ (Lee et al., 2002; Gundersen et al., 1996) นอกจากนี้แล้วการกระจายของเชื้อที่ไม่สม่ำเสมอภายในต้นทำให้ยากต่อการสุ่มตัวอย่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวอย่างที่มีปริมาณเชื้อต่ำ เมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจึงทำให้ได้ผลเป็นผลลบปลอมได้ (false negative) (Tasaka et al., 1997) ส่งผลต่อความแม่นยำของวิธีการ และทำให้เกิดความแปรปรวนของเทคนิค

แต่การตรวจวินิจฉัยโรค โดยใช้ mRNA นั้นอาศัยหลักการแสดงออกของยีน โดยเฉพาะ ribosomal gene ซึ่งมีการแสดงออกของยีนสูง (highly expressed ribosomal gene) หรือยีนอื่น เช่น sec gene family หรือ immune dominant protein gene (imp) จึงน่าจะเป็นเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยโรคที่ดีกว่า การตรวจด้วย DNA นอกจากนี้การใช้เครื่อง Real time PCR ซึ่งอาศัยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ที่ถูกปลดปล่อยออกมาตามการเพิ่มขึ้นของผลผลิตพีซีอาร์ และปริมาณ DNA ของเชื้อเริ่มต้น จึงเป็นวิธีการที่ได้ผลดีกว่า รวดเร็ว และมีความไวสูงกว่าการใช้ Conventional PCR โดยเฉพาะในกรณีที่ต้องการผลิตต้นปลอดโรคที่แท้จริง หรือ ตรวจการเพิ่มปริมาณของเชื้อภายในต้นในระยะเวลาต่างๆ โดยเครื่องสามารถรายงานผลตรวจวัดปริมาณผลผลิตพีซีอาร์ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น รวมทั้งข้อมูลในเชิงคุณภาพและปริมาณของเชื้อ เหมาะสำหรับการตรวจที่ต้องการผลที่รวดเร็ว และตัวอย่างจำนวนมาก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อด้วย Reverse transcriptase real time PCR และหาปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยด้วย real time PCR quantification

7. วิธีดำเนินการ

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยวิธีดัดแปลงเทคนิค Lid and Midmore, 1999 บดตัวอย่าง 0.2 กรัมใน extraction buffer 800 μ l ในหลอดทดลองพลาสติกขนาด 1.5 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที โดยทุกๆ 10 นาทีให้พลิกหลอดไปมา นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม Chloroform : Isoamyl (24 : 1) 500 μ l ผสมให้เข้ากัน นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 10 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้วเติม Isopropanol 500 μ l พลิกไปมาเบาๆ จนกระทั่งเห็นสายดีเอ็นเอ นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม 95% ethanol 500 μ l คีดให้ตะกอนลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เติม 95% ethanol 500 μ l อีกครั้งหนึ่ง ตากตะกอนให้แห้ง เติมน้ำกลั่นมาเชื้อแล้ว 180 μ l 5M NaCl 20 μ l และ 95% ethanol 200 μ l พลิกไปมาจนกระทั่งเห็นตะกอนดีเอ็นเอ นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที เทสารละลายทิ้ง เติม 70% ethanol 500 μ l คีดตะกอนให้ลอย นำมาหมุนเหวี่ยง 12,000 rpm 1-2 นาที ทำซ้ำ ตากตะกอนจนแห้ง เติม TE buffer ที่มี RNase A 40 μ l จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง nanodrop spectrophotometer (Maestrogen, Taiwan)

การเพิ่มปริมาณยีน *secA*

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีนเอ็นเอบริเวณยีน *secA* โดยทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SecAfor (5'GTTTTATATGGATGCTAATCGTTTT-3') และ SecArev (5'CTAYTGTCTTCCTGTAA ATTGATC-3') (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Sakuanrungsirikul *et al.*, 2012) โดยมีปริมาตรรวม 15 μ l มีส่วนผสมของปฏิกิริยาดังนี้ 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA); สารต้นแบบดีเอ็นเอ (100 ng/ μ l) ปริมาตร 3 μ l และ 0.5 μ M SecAfor/SecArev นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Perkin Elmer PE 9700 Thermo Cycler, USA) มีขั้นตอนดังนี้ Pre-denaturing 94 °C นาน 5 นาที, denaturing 94 °C นาน 1 นาที, annealing 60 °C นาน 30 วินาที, extension 72 °C นาน 45 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 30 รอบ) และ final extension 72 °C นาน 7 นาที โดยมีขนาดยีนดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *secA* เป็น 275 bp

การโคลนยีนยีน

นำยีนดีเอ็นเอของยีน *secA* มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GEL/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBCBioscience, Taiwan) จากนั้นนำยีนดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pUC1318 (RBC TA cloning kit, RBCBioscience, Taiwan) ได้เป็น pUC1318-secA และนำพลาสมิดนี้เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5 α competent cells (HIT Competent Cells, RBC TA cloning kit, RBCBioscience, Taiwan) คัดเลือกโคโลนีบนอาหารแข็ง blue/white selection ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน นำโคลนที่คัดเลือกได้เลี้ยงในอาหารเหลว LB ข้ามคืน แล้วนำมาสกัดพลาสมิด pUC1318-secA ด้วยน้ำยาสำเร็จรูป GF-1 plasmid DNA extraction kit (Vivantis, Malaysia) จากนั้นนำมาหาความเข้มข้นพลาสมิด pUC1318-secA มีหน่วยเป็น copy number ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง nanodrop spectrophotometer แล้วนำมาคำนวณตามสูตร (Whelan *et al.*, 2003)

$$\text{Number of copies (copy}/\mu\text{l)} = \frac{[6.02 \times 10^{23} \text{ (copy.mol}^{-1})][\text{DNA amount (g}/\mu\text{l)}]}{[\text{DNA length (bp)}][650 \text{ (g.mol}^{-1}.\text{bp}^{-1})]}$$

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างอ้อยวิธี Absolute quantification

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ้อยได้มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นเอ็นเอบริเวณยีน *secA* การทำปฏิกิริยา PCR ใช้ไพรเมอร์ SecAfor/SecArev การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ซึ่งส่วนผสมของปฏิกิริยา และขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเดียวกัน ดังนี้ ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 15 μ l มีส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังนี้ 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA), ดีเอ็นเอ ต้นแบบ (25 ng/ μ l) ปริมาตร 4 μ l, 0.5 μ M SecAfor/SecArev และ 0.075 μ M dye SYTO9 (Invitrogen, CA,USA) นำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในสภาพจริง (LightCycler[®] 480 Real-time PCR, Roche, Germany) มีขั้นตอนดังนี้ initial-denaturing 94 °C นาน 5 นาที, denaturing 94 °C นาน 1 นาที, annealing 60 °C นาน 30 วินาที, extension 72 °C นาน 45 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 40 รอบ) และ final extension 72 °C นาน 7 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature (Tm) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 72 °C ถึง 95 °C โดยเพิ่ม 0.1 °C/วินาที เมื่อสิ้นสุดให้ลดอุณหภูมิลงที่ 40 °C นาน 30 วินาที วิเคราะห์และคำนวณปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยโปรแกรม Abs Quant/2nd Derivative Max และวิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Tm calling จากเครื่อง LightCycler[®] 480 instrument with software version 1.5 (Roche Diagnostic GmbH, Germany)

วิธี Relative quantification

ใช้บริเวณตำแหน่ง 18s rRNA ของอ้อยเป็นยีนอ้างอิง (reference gene) โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 18s rRNA ของ *Saccharum officinarum* (AY116284), *S. hybrid cultivar* (AB24987 0) และ *S. officinarum* (AJ876760) โดยได้เป็นไพรเมอร์ 18S SGCf1 (CCTTAGGCGTCAAGGAACAC) และ 18S SGCr1 (GCGTTCAAAAACCTCGATGGT) และใช้ยีน *secA* เป็นยีนเป้าหมาย (target gene) ส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ใช้สภาวะเดียวกันกับวิธี absolute quantification

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ทำการเจือจางพลาสมิด pUC1318-secA ให้มีปริมาณเชื้อต่างกัน 10 เท่าระหว่าง 10¹⁰-1 copies ในดีเอ็นเออ้อยปกติ 25 ng (10¹⁰-1 copies /25 ng plant DNA) ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำเช่นเดียวกับการประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อย ทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ด้วยโปรแกรม Abs Quant/2nd Derivative Max ต้องให้ค่า PCR amplification efficiency (E) เท่ากับ 2 ซึ่งมีความสำคัญสำหรับการบ่งชี้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็น 100% efficiency คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 2 เท่า ในแต่ละรอบ

การตรวจการแสดงออกของยีน

สกัดอาร์เอ็นเอจากใบอ้อยโดยใช้ชุด Total RNA isolation (vivantis, Malaysia) สร้างสาย cDNA โดยใช้ชุด First stand cDNA (Fermentas) และตรวจการแสดงออกของยีน *Adh I*, *LOX*, *CaSy* โดยใช้ยีนอ้างอิง ได้แก่ *Actin* และ *TPI*

เวลาและสถานที่ : ระยะเวลา 2557-2558 สถานที่ดำเนินการ : ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสร้างโคลนดีเอ็นเอมาตรฐาน

มีการสร้างโคลนดีเอ็นเอมาตรฐานดำเนินการ โดยใช้ Cloning Vector (pUC1318) เพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบริเวณที่ต้องการ ได้แก่ 1) ตำแหน่ง 16S-23S rDNA ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไฟโตพลาสมาด้วยชุดไพรเมอร์ MLO-X และ MLO-Y ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 700 bp 2) ตำแหน่ง *secA* gene ซึ่งเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไฟโตพลาสมาด้วยชุดไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณ *secA* gene ได้ชิ้นดีเอ็นเอ ขนาด 275 bp

ส่วนดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 210 bp ซึ่งเป็นตำแหน่ง 16S-tRNA gene นั้น ไม่ได้ดำเนินการเนื่องจากการตรวจดีเอ็นเอตำแหน่งนี้เกิดจากการทำ nested-PCR ในตำแหน่ง 700 bp ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ชุดแรก ทำให้ผลที่ได้ไม่สัมพันธ์กับดีเอ็นเอตั้งต้น

2. การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อโรคใบขาวด้วย Realtime PCR

การเจือจางดีเอ็นเอมาตรฐานทั้งสองชนิด ในระดับ 10^{10} -1 copy/ μ l แล้วนำมาทดสอบสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR และตรวจผลโดย Agarose gel electrophoresis เพื่อใช้เปรียบเทียบกับผลของ Realtime PCR พบว่า ดีเอ็นเอมาตรฐาน 16S-23S rDNA ขนาด 700 bp นั้นสามารถมองเห็นแถบได้ตั้งแต่ 10^{10} - 10^2 copy/ μ l โดยมีช่วงที่แยกความแตกต่างของความเข้มแสงได้ คือ 10^6 - 10^2 copy/ μ l แต่พบ primer dimers ตั้งแต่ 10^6 copy/ μ l ลงมา ซึ่งจะส่งผลต่อการตรวจปริมาณด้วย Realtime PCR ส่วนการทดสอบดีเอ็นเอมาตรฐาน *secA* นั้น สามารถมองเห็นแถบได้ตั้งแต่ 10^{10} - 10^3 copy/ μ l โดยมีช่วงที่แยกความแตกต่างของความเข้มแสงได้ คือ 10^4 - 10^3 copy/ μ l และไม่พบ primer dimer (ภาพที่ 1)

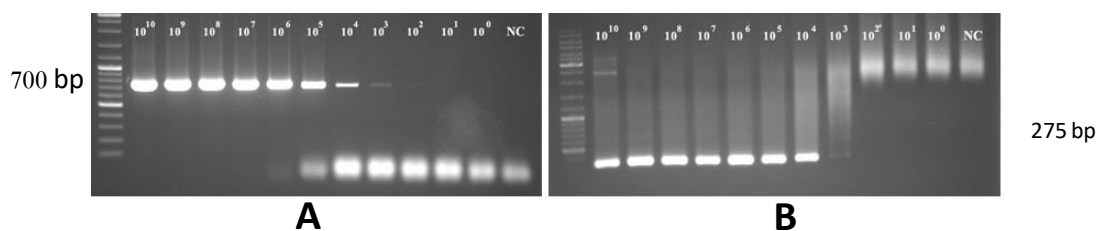


Figure 1. Amplification product of serial dilution of sugarcane white leaf phytoplasma DNA of $10^{10}-1$ copy/ μ l with semi-quantitative PCR using (A) 700 bp fragment of 16S-23S rDNA and (B) 275 bp fragment of *secA* gene as templates.

การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค absolute quantitative PCR โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 700 bp ด้วยไพรเมอร์ MLO-X/Y และ ขนาด 210 bp ด้วยไพรเมอร์ P1/P2 พบว่า การตรวจ 700 bp มักพบ primer dimers แสดงถึงความไม่จำเพาะของไพรเมอร์ ส่วนการตรวจ 210 bp ต้องใช้ผลของ PCR ชุดแรกจาก 700 bp จึงไม่เหมาะกับการตรวจด้วย Realtime PCR และหากทำการตรวจ โดยตรงพบว่าตำแหน่งจะตรวจพบได้ในกลุ่มอ้อยที่มีอาการใบขาวแล้วเท่านั้น จึงไม่เป็นประโยชน์ในการใช้ตรวจวิเคราะห์ (ภาพที่ 2) ดังนั้นจึงใช้เฉพาะ 700 bp และ 275 bp ของ *secA* ในการทดลองต่อ

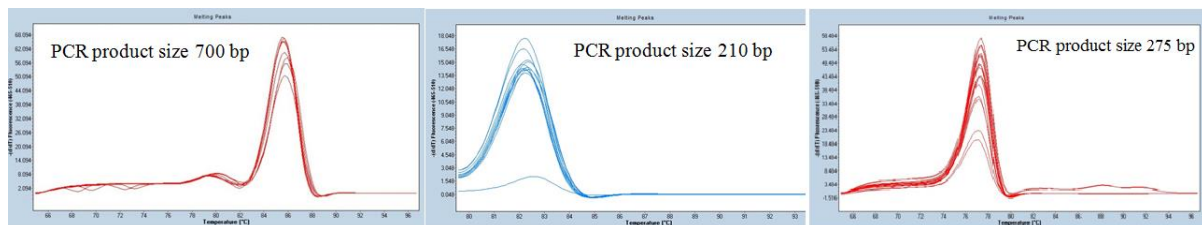


Figure 2. Melting peak profile of 700 bp product amplified by primer set : MLO-X/Y, 210 bp product amplified by P1/P2 primer set and 275 bp product amplified by *secA* primer using Realtime PCR (LightCycler480).

ผลการวิเคราะห์ช่วงความเข้มข้นที่เชื่อถือได้ (PCR Efficiency) หลังการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วย Realtime PCR แล้ว พบว่า ดีเอ็นเอขนาด 700 bp มีช่วงความเข้มข้นที่เชื่อถือได้ระหว่าง $10^7 - 10^4$ copy/ μ l และ ดีเอ็นเอขนาด 275 bp ของ *secA* มีช่วงความเข้มข้นที่เชื่อถือได้ระหว่าง $10^{10} - 10^2$ copy/ μ l ซึ่งดีกว่าขนาด 700 bp และดีกว่าการใช้ semi-quantitative PCR

การพัฒนาวิธีการตรวจปริมาณเชื้อชนิด Absolute quantification และ Relative quantification

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี Absolute quantification เป็นการประเมินเชื้อโดยการนำเอาค่า Ct ของแต่ละตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ในขณะที่ Relative quantification เป็นการหาสัดส่วนของปริมาณเชื้อ (ยีนเป้าหมาย) เทียบกับยีนอ้างอิง ในการตรวจแบบ Absolute quantification นั้นใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ้อยได้มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณชิ้นเอ็นเอบริเวณยีน *secA* โดยวิธีการดังกล่าวข้างต้น แล้วจึงทำการวิเคราะห์และคำนวณปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้สร้าง

ไว้จากการใช้ดีเอ็นเอที่มาจากโคลอกาลิซิสส่วน *secA* ในพลาสมิด ทำให้สามารถคำนวณหาปริมาณ copy number ของยีนนี้ของเชื้อไฟโตพลาสมาได้ ทั้งนี้ยีนนี้มีเพียงหนึ่งชิ้นเท่านั้นในดีเอ็นเอ

ส่วนการตรวจแบบ Relative quantification นั้น เป็นการตรวจโดยใช้ยีนของพืชเป็นตำแหน่งอ้างอิง ซึ่งใช้บริเวณตำแหน่ง 18s rRNA ของอ้อยเป็นยีนอ้างอิง (reference gene) โดยทำการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ 18s rRNA ของ *Saccharum officinarum* (AY116284), *S. hybrid cultivar* (AB24987 0) และ *S. officinarum* (AJ876760) และใช้ยีน *secA* เป็นยีนเป้าหมาย (target gene) แล้วจึงการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเช่นเดียวกับวิธี absolute quantification

ผลการทดสอบปริมาณเชื้อในตัวอย่างอ้อยที่แสดงลักษณะความรุนแรงของโรคใบขาวอ้อยต่างกัน 3 ระดับคือใบขาว ใบเขียวปนขาว และใบเขียวปกติ (ไม่แสดงอาการ) ด้วยเทคนิค Absolute quantification และ Relative quantification พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าปริมาณเชื้อที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1) ทั้งนี้ในงานวิจัยที่มีการสร้างกราฟมาตรฐานแล้วโดยใช้พลาสมิด pUC-1318-*secA* การใช้วิธี Absolute quantification ซึ่งเป็นการประเมินปริมาณเชื้อในตัวอย่างที่มีอยู่จริงจึงง่ายกว่าในการปฏิบัติมากกว่า

Table 1. Sugarcane white leaf phytoplasma estimation by absolute quantification and relative quantification using *secA* as target gene and plant 18s rDNA as reference gene.

Leaf symptom	Detection method	
	Absolute quantification (copies/25 ng plant DNA)	Relative quantification (copies/25 ng plant DNA)
10 ² copies/25 ng plant DNA	-	100
Fully white*	1.54x10 ⁵ - 7.91 x10 ⁵	1.83x10 ⁵ - 8.75 x10 ⁶
Partial white*	1.2x10 ³ - 1.74x10 ⁴	1.77x10 ³ - 1.74x10 ⁴
Green*	No detected	20-30

*3 leaves samples collected from different hill and planting locations.

3. การพัฒนาตรวจโรคด้วยการตรวจการแสดงออกของยีน

แบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือ การแสดงออกของยีนของอ้อยที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไฟโตพลาสมา และการแสดงออกของยีนของไฟโตพลาสมาในอ้อยที่เป็นโรคใบขาว

3.1 การแสดงออกของยีน *secA* ของเชื้อไฟโตพลาสมาภายในอ้อยที่เป็นโรคใบขาว

จากการทดลองปรับสภาวะในการเพิ่มปริมาณเป็น 35 รอบ และใช้ตัวอย่างลำที่มีอาการใบขาวที่ ยอดจำนวน 3 ต้นและลำที่ไม่มีอาการใบขาวมาทดสอบ โดยแยกเก็บตามอาการของใบและลำค้ำของใบ คือ ใบขาว ใบขาวเขียว และใบเขียว และใบที่ 1, 2 และ 3 จากยอด พบว่าสามารถตรวจพบดีเอ็นเอและการ แสดงออกของ *secA* ได้อย่างชัดเจนในตัวอย่างใบจากทั้ง 3 ลำที่มียอดขาว ทั้งใบขาว ใบขาวเขียวและใบ เขียว (ภาพที่ 3ข และค) ส่วนตัวอย่างใบจากลำที่ไม่มีอาการใบขาว สามารถตรวจพบดีเอ็นเอของ *secA* ได้ อย่างชัดเจนเช่นกัน และสามารถตรวจพบการแสดงออกของ *secA* ได้เช่นเดียวกัน แต่ในปริมาณที่ต่ำกว่า กลุ่มตัวอย่างใบขาว ทั้งยังพบว่ากลุ่มใบเขียวนี้นี้มีระดับการแสดงออกของ *secA* แตกต่างกันตามลำค้ำใบด้วย (ภาพที่ 3ก) ทั้งนี้ต้องทำการทดสอบเพิ่มเติมในตัวอย่างที่ไม่มีอาการใบขาว

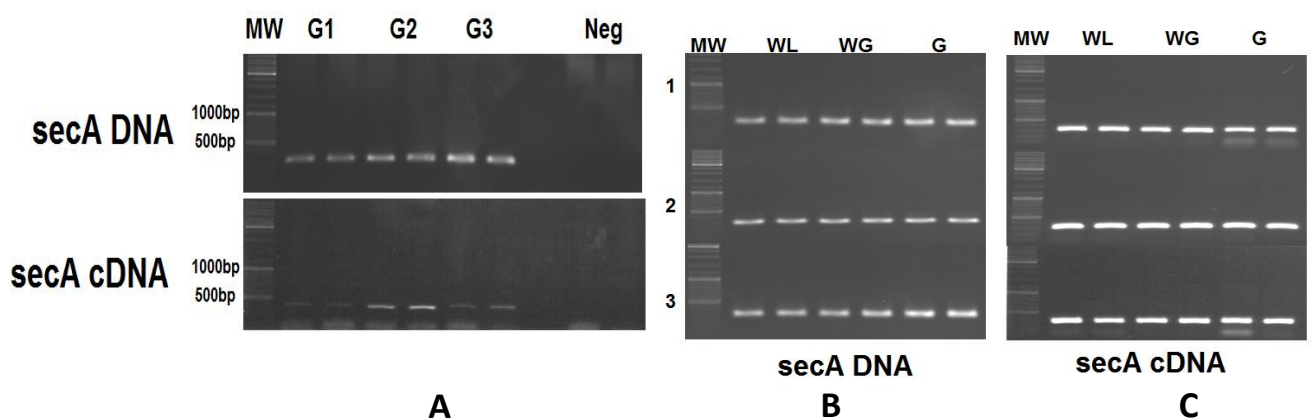


Figure 3. *secA* genes and their expression detected as cDNA in asymptomatic sugarcane (A), leaf 1, 2, 3 from top (G1-3) and 3 sugarcane stalks with white leaf symptom (1-3) expressed full white leaf (WL), partial white (WG) and green (G) in order from shoot. Neg : negative control with water to replace DNA; MW: molecular marker

3.2 การแสดงออกของยีนของอ้อยที่ตอบสนองต่อการติดเชื้อไฟโตพลาสมา

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านการถูกทำลายโดยเชื้อ ได้แก่ *Lipoxygenases (LOXs)* ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ *Sucrose synthase (SuSy)* และ *Invertase (Inv)* ยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) ได้แก่ *Alcohol dehydrogenase I (AdhI)* พบว่ายีนดังกล่าวมีการแสดงออกมากขึ้นในต้นที่มีอาการใบขาว ภายใต้การแสดงออกของยีนควบคุม (*TPI*) ที่เท่ากัน (ภาพที่ 4) อย่างไรก็ตามยีนดังกล่าวนี้บางยีนสามารถถูกกระตุ้นให้แสดงออกมากขึ้นได้เมื่อ อยู่ในภาวะเครียดอื่น เช่น แล้ง น้ำท่วม หรือ ภาวะขาดออกซิเจนชั่วคราวจากการสังเคราะห์แสง

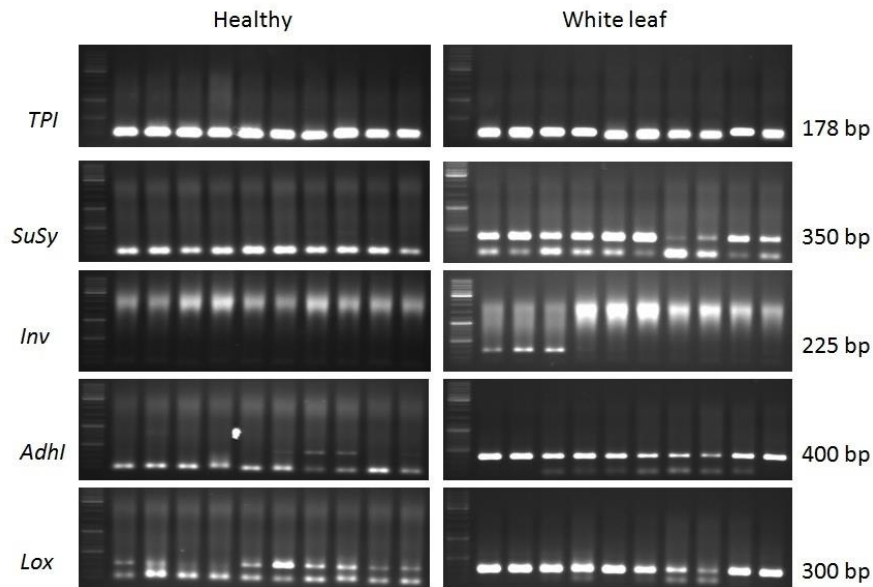


Figure 4. Gene expression in leaves of sugarcane var. KK3 of 1 month old. *TPI*: Topoisomerase (control gene), *SuSy* : Sucrose synthase, *Inv* : Invertase, *AdhI* : Alcohol dehydrogenase I, *Lox* : Lipoxygenase, Healthy : sugarcane propagated by tissue culture. White leaf : sugarcane with white leaf symptom.

การวิเคราะห์ยีนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการทำลายของเชื้อไฟโตพลาสมาเพิ่มเติมได้แก่ *Cytokinin oxidase (Cko)* ที่สลายไซโตไคนินเพื่อรักษาระดับฮอร์โมนนี้ในพืช ซึ่งคาดว่าไฟโตพลาสมาอาจจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้เพื่อให้พืชไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตได้ จากการพัฒนาวิธีการสามารถตรวจพบการแสดงออกได้ในอ้อย โดยมีขนาดประมาณ 600 bp การทดสอบในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 อายุ 1-2 เดือนที่ไม่มีอาการใบขาวและมีเชื้อต่ำ พบว่าสามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนนี้ได้ในบางตัวอย่าง และอยู่ระหว่างการตรวจการแสดงออกในตัวอย่างใบขาว ส่วนการศึกษาอื่นที่สร้างสาร flavonoid ซึ่งพืชใช้ในการกำจัดเชื้อไฟโตพลาสมา ได้แก่ *Flavanone -3-hydroxylase (F3h)* นั้น ไม่สามารถตรวจพบได้ในอ้อย สำหรับยีนที่เกี่ยวข้องกับสร้างสารทุติยภูมิในการจำกัดการเคลื่อนที่ของเชื้อไฟโตพลาสมา ได้แก่ *Callose synthase (CaSy)* นั้น สามารถตรวจพบได้ในอ้อยที่มีอาการใบขาวที่ขอด โดยจากการทดสอบใบจากลำที่มียอดขาว โดยมีอาการใบขาวระดับต่างกันจากใบขอดที่มีอาการขาวซีดทั้งใบ จนถึงใบลำดับที่ 5-6 ที่ใบยังเขียวอยู่นั้น สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *CaSy* ได้ทั้งหมด แต่ในระดับที่แตกต่างกันหรือไม่ ยังคงต้องทำการศึกษาต่อ ในการทดลองนี้สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *SuSy*, *AdhI* และ *TPI* ได้อย่างชัดเจน ในขณะที่ไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีน *Lox* และ *Inv* ได้ (ภาพที่ 5) ซึ่งการแสดงออกของยีนเหล่านี้ยังต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่มีอาการ และมีอาการระดับต่างกัน รวมถึงอายุของต้นด้วยอีกในขั้นต่อไป โดยจะทำการพัฒนาการตรวจเพิ่มด้วย Realtime PCR

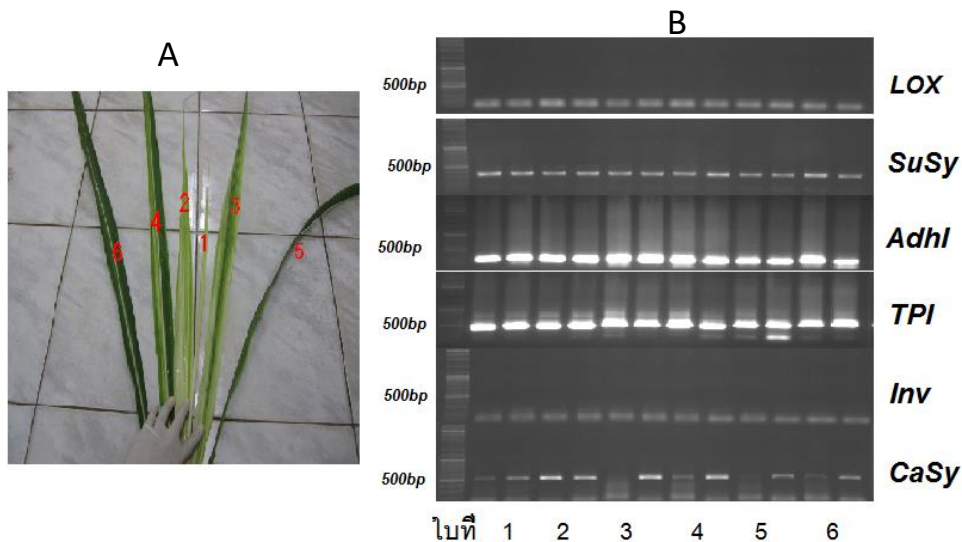


Figure 5. Expression of genes in 5 months old sugarcane with top white leaf. Different level of white leaf symptom severity express from top (1-fully white) to bottom (6-green) leaves (A). Expression of genes *Lox* : *Lipoxygenase*, *SuSy* : *Sucrose synthase*, *AdhI* : *Alcohol dehydrogenase I*, *TPI*: *Topoisomerase* (control), *Inv* : *Invertase*, and *CaSy*: *Callose Synthase* were detected in leaves order 1-6 (B)

จากการตรวจการแสดงออกของยีน 5 ชนิด ในอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 อายุ 1-2 เดือน ที่ไม่มีอาการใบขาว และมีปริมาณเชื้อดำด้วยสภาวะแสงในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต (39 °C; 20,000 LUX; 55% RH; 14:10 Light/dark) เวลานาน 4 วัน และตรวจวัดผลหลังการทดสอบทันที พบการแสดงออกของยีน *Callose synthase* (*CaSy*), *AdhI* และยีนควบคุม *TPI* ไม่แตกต่างกันระหว่างชุดทดลองควบคุมและชุดทดสอบ (ภาพที่ 6) แต่มีการแสดงออกของยีน *Lox* สูงขึ้นชัดเจน ซึ่งตรวจพบได้ในการทดสอบ 2 วันด้วยเช่นกัน ส่วน *SuSy* ผลการทดลองไม่ชัดเจน

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในตัวอย่างอ้อยที่มีการติดเชื้อไฟโตพลาสมาและอ้อยที่ไม่มีอาการและมีปริมาณเชื้อดำ แต่อยู่ในสภาวะเครียดจากแสง พบว่ายีน *SuSy*, *CaSy* และ *AdhI* มีการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้น เมื่ออ้อยมีอาการใบขาว เปรียบเทียบกับอ้อยที่อยู่ในสภาวะเครียดจากสภาพแสง ส่วนการแสดงออกของยีน *Lox* นั้นสามารถเพิ่มขึ้นได้ทั้งสองสภาวะ

การศึกษาระดับการแสดงออกของยีนด้วย quantitative Realtime PCR ของยีน *Adh I*, และ *CaSy* โดยใช้ยีนอ้างอิง *Actin* พบว่ายีน *Adh I* มีการแสดงออกในตัวอย่างอาการใบขาว ใบขาวเขียว และ ใบเขียว ในระดับประมาณ 7.5, 5.4 และ 1.5 เท่าของยีนอ้างอิงตามลำดับ ส่วนยีน *CaSy* มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน

เล็กน้อยระหว่างตัวอย่างอาการใบขาว ใบขาวเขียว และ ใบเขียว ในระดับประมาณ 0.56, 0.47 และ 0.43 เท่าของยีนอ้างอิงตามลำดับ ดังนั้นอาจใช้การตรวจวัดการแสดงออกของยีน *Adh I* ร่วมกับการแสดงออกของยีน *secA* ในการวินิจฉัยการติดเชื้อนี้ได้

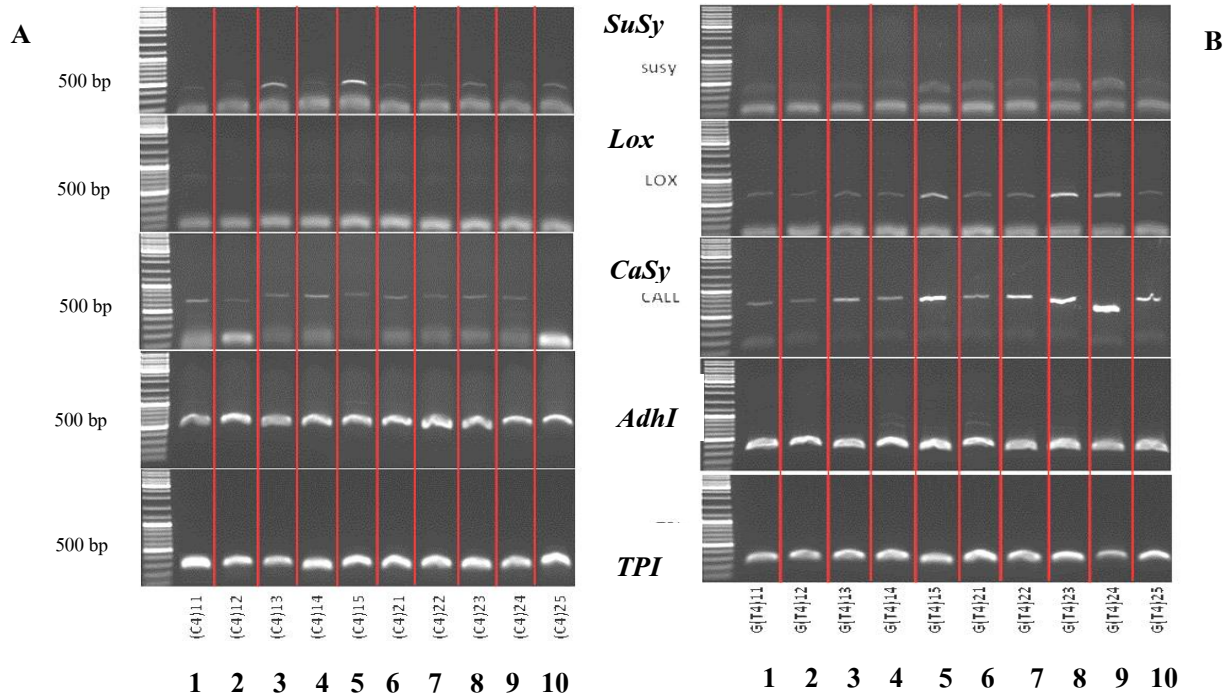


Figure 6. Gene expressions in leaves of 10 (1-10) asymptomatic 1-2 month old sugarcane var. KK3. Cultivated in sand experimenting in two conditions. (A) Non treatment set (Control): Irrigation according to soil moisture. (B) Drought tests in growth chamber programmed with growing condition (39°C; 20,000 LUX; 55% RH; 14:10 Light/dark, non irrigation) for 4 days. *SuSy* : *Sucrose synthase*, *Lox* : *Lipoxygenase*, *CaSy*: *Callose Synthase*, *AdhI* : *Alcohol dehydrogenase I*, *TPI*: *Topoisomerase* ใช้เป็นยีนควบคุม

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวในอ้อยด้วย real time PCR quantification ที่ตำแหน่งยีน *secA* พบว่าวิธีตรวจแบบ Absolute quantification ใช้ดีเอ็นเอต้นแบบ (*secA*) เทียบกับกราฟมาตรฐานและแบบ Relative quantification ใช้ยีนของพืช (18S rRNA) เป็นตำแหน่งอ้างอิง และใช้ยีน *secA* เป็นยีนเป้าหมาย (target gene) พบว่าทั้งสองวิธีให้ค่าปริมาณเชื้อที่ใกล้เคียงกัน ในทางปฏิบัติสามารถใช้วิธีแรกในการตรวจเพื่อความสะดวกและรวดเร็ว โดยช่วงที่ได้จากการตรวจ 16S rDNA ที่ได้ผล

ผลิตภัณฑ์เอ็นเอขนาด 700 bp มีช่วงความเข้มข้นที่เชื่อถือได้ระหว่าง 10^7 - 10^4 copy/ μ l และ ดีเอ็นเอขนาด 275 bp ของ secA มีช่วงความเข้มข้นที่เชื่อถือได้ระหว่าง 10^{10} - 10^2 copy/ μ l ทั้งนี้ยังต้องทำการพัฒนาให้ได้วิธีการที่สามารถตรวจวัดปริมาณเชื้อที่ต่ำกว่านี้ เพื่อเพิ่มความไวของวิธีการ

การตรวจด้วย Reverse transcriptase real time PCR สามารถนำมาใช้ในกรณีตรวจเช็คความมีชีวิตของเชื้อ เนื่องจากการตรวจด้วยดีเอ็นเอ ยังสามารถตรวจพบดีเอ็นเอของเชื้อได้แม้ใบอ้อยที่แห้งตายแล้ว การตรวจการแสดงออกของเชื้อสามารถตรวจได้จากการแสดงออกของยีน *secA* อย่างไรก็ตามความไวของวิธีการอาจไม่ไวมาก เนื่องจากเป็นชนิด direct PCR เช่นเดียวกับยีนของอ้อยที่มีอาการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่ออ้อยถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย ในการทดลองนี้ยังไม่ได้มีการตรวจวัดความไวของวิธีการตรวจด้วย reverse transcriptase การพัฒนาวิธีการเหล่านี้ จะทำให้ได้วิธีการตรวจโรคใบขาวที่ถูกต้อง แม่นยำมากยิ่งขึ้น ลดปัญหาผลลบปลอมจากความไวของวิธีการ รวมทั้งปัญหาผลบวกปลอมจากการปนเปื้อนสิ่งอื่นในตัวอย่างที่ตรวจสอบ ซึ่งส่งผลต่อการตรวจ คัดเลือก แปลงแม่พันธุ์ การแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างประเทศ และงานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ให้ระบุผลงานที่ดีที่สุด ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร พัฒนาต่อหรือถ่ายทอด หรือเผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย (ระบุเป็นข้อๆ)

10.1 เป็นข้อมูลประกอบในผลงานวิจัยดีเด่นของกรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2558

10.2 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการฝึกอบรมนักวิชาการ สวพ. 3 เรื่องการจัดทำแปลงพันธุ์ อ้อยสะอาด วันที่ 11 มีนาคม 2558

10.3 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการฝึกอบรมนักวิชาการและเกษตรกร หลักสูตร การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอ้อยโรงงาน จำนวน 2 รุ่น ระหว่างวันที่ 9-11 มิถุนายน 2558 ที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น และ วันที่ 23-25 มิถุนายน 2558 ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรี

10.4 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการแสดงโปสเตอร์ความรู้เรื่องโรคใบขาวในอ้อย ในงานเปิดบ้านกรมวิชาการเกษตร ปีงบประมาณ 2558

10.5 เผยแพร่ข้อมูลในงานประชุมวิชาการเกษตรแห่งชาติ ปี 2558 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

10.6 ขยายผลโยกการนำมาใช้ตรวจจำแนกชนิดเชื้อใบขาว ในการตรวจตัวอย่างอ้อยใบขาว โครงการร่วมกับหน่วยงานภายในกรมวิชาการเกษตร (สวพ. 3, สวร. จก. และ สวร.) และ โครงการความร่วมมือกับ JIRCAS ในปี 2557, 2558

10.8 เผยแพร่ข้อมูลด้วยการบรรยายในการประชุม JIRCAS-KKU-KKFCRC Collaborative Workshop on Sugarcane IPM Project, 16 กันยายน 2558

11. คำขอบคุณ : ขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานกลุ่มวิจัยโรคใบขาว จากสถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร ดร. ประพันธ์ ประเสริฐศักดิ์ ผชช. กอบเกียรติ ไพบาลเจริญ อาจารย์รังสี เจริญสถาพร ที่ให้ข้อมูล และคำปรึกษา ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยทุกท่าน ที่ร่วมกันดำเนินงานอย่างจริงจัง ทำให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี และสำเร็จตามเป้าหมายเป็นอย่างดี

12. เอกสารอ้างอิง

Gundersen, D. E. and I-M Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathol Mediterr* 35, 144–151.

Lee, C., J.C. Cho, S.H. Lee, D.G. Lee, D.G. and S.J. Kim. 2002. Distribution of *Aeromonas* spp. as identified by 16S rDNA restriction fragment length polymorphism analysis in a trout farm. *J. Appl. Microbiol.* **93**:976–985.

Llop P, A. Bonaterra, J. Peñalver, M. M. López. Development of a Highly Sensitive Nested-PCR Procedure Using a Single Closed Tube for Detection of *Erwinia amylovora* in Asymptomatic Plant Material. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(5):2071-2078.

O. Wally, A. El Hadrami, A.H. Khadhair, L.R. Adam, T. Shinnars-Carnelley, B. Elliott, F. Daayf. 2008. DNA sequencing reveals false positives during the detection of aster yellows phytoplasmas in leafhoppers. *Scientia Horticulturae*. 116 (2) : 130–137.

Tasaka, T., S. Lee, S. Spira, S. Takeuchi, M. Nagai, J. Takahara, H.P. Koeffler. 1997. Microsatellite instability during the progression of acute myelocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, **98**, 219–221