การจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทยด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา

Molecular Characterization of Phytoplasma Associated with Sesame phyllody in Thailand

นาถยา พานทอง[1,2] สุภาพร กลิ่นคง[3] วิชัย โฆสิตรัตน[1,2,3] และสุจินต์ ภัทรภูวดล[2,3]
Natthaya Panthong[1,2] Supapron Klinkong[3] Wichai Kositratana[1,2,3] and Sujin Patarapuwadol[2,3]

Abstract

Sesame plants (*Sesamum indicum* L.) with phyllody symptoms were collected from sesame plantations in 10 provinces of Thailand. The 16S rRNA and *secY* genes of phytoplasma were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using specific primer pairs of R16F2/R16R2 and AYsecYF1/AYsecYR1 with the expect amplified PCR products size of 1.2 kb and 1.3 kb respectively. Fifteen isolates of sesame phyllody phytoplasma were identified by nucleotide sequence of 16S rRNA gene and further analyzed for the relationship with reference phytoplasma strains (16SrI-16SrXV group). The results indicated that the phytoplasmas associated with sesame phyllody were grouped into the 16SrI (Aster yellows group) and 16SrII (Peanut witches'-broom group). The subgroup of phytoplasmas were identified *in silico* analysis of 16S rRNA restriction fragment length polymorphism (RFLP). The RFLP patterns of 16S rRNA gene sequence were classified as a 16SrI-B and 16SrII-A subgroup with a similarity coefficient > 0.97. Result of phylogenetic tree analysis of *secY* gene sequence of 8 isolates grouped within the 16SrI, were classified as SecY-I group.

Keywords : phyllody, sesame, phytoplasma, 16S rRNA gene, *secY* gene

บทคัดย่อ

งาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยที่เก็บมาจากแหล่งปลูกงาสำคัญ 10 จังหวัดในประเทศไทย ทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และ *secY* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 และ AYsecYF1/AYsecYR1 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.2 และ 1.3 กิโลเบส ตามลำดับ นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้จาก15 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทนกลุ่ม 15 กลุ่ม คือ 16SrI-16SrXV พบว่าเชื้อจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI (Aster yellows group) และ 16SrII (Peanut witches'-broom group) และจัดกลุ่มย่อยด้วยยีน 16S rRNA โดยการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ *in silico* restriction fragment length polymorphism (RFLP) พบว่าเชื้อจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrI-B และ 16SrII-A โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง > 0.97 และการจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อกลุ่ม 16SrI ที่นำมาศึกษา พบว่า เชื้อทั้ง 8 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม SecY-I

[1] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพ
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[3] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : กุมภาพันธ์ 2554

Corresponding author : agrsujp@ku.ac.th

คำนำ

โรคแตกพุ่มฝอยของงาเป็นโรคที่สำคัญของงาโดยมีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมา ต้นงาที่เป็นโรคจะแสดงอาการแตกเป็นพุ่มฝอย ดอกเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมีรูปร่างคล้ายใบ อาการของโรคขึ้นกับระยะการเจริญเติบโตของงาและระยะเวลาที่เชื้อเข้าทำลาย ส่งผลให้ผลผลิตเสียหาย ความสามารถในการงอก และองค์ประกอบของน้ำมันในเมล็ดลดลงสูงถึง 93.66, 37.77 และ 25.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Vyas, 1981) และเชื้อสามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยจักจั่น *Orosius albicinctus, O. cellulosus* และ *Neoaliturus haematoceps* (Nakashima and Murata, 1993) การจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA มีรายงานพบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI, 16SrII-A และ 16SrVI ในประเทศอินเดีย (Khan *et al*., 2007) ไทย (Khan *et al*., 2002) และตุรกี (Sertkaya *et al*., 2007) ตามลำดับ ในการจัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมา นอกจากใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA แล้ว ยังมีรายงานการใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ซึ่งมีความผันแปรในลำดับนิวคลีโอไทด์สูงกว่ายีน 16S rRNA โดยค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* และ 16S rRNA ระหว่างเชื้อไฟโตพลาสมาต่างกลุ่มกันอยู่ระหว่าง 53.5-77.9 และ 85.1-96.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีผลทำให้การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ในการแบ่งกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมามีความชัดเจนมากกว่าการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เพียงอย่างเดียว (Lee *et al*., 2010)

การทดลองนี้ มีวัตถุประสงค์ในการจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่พบในแหล่งปลูกงาสำคัญในประเทศไทยและเปรียบเทียบกับเชื้อที่เคยศึกษาทั้งในและนอกประเทศ เพื่อศึกษาถึงความผันแปรทางพันธุกรรมในลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ ยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา 15 ไอโซเลท

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างโรคและตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในงาที่เป็นโรค

เก็บตัวอย่างงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยจากแหล่งปลูกงาที่มีการระบาดของโรคครอบคลุมพื้นที่ปลูกงาที่สำคัญของประเทศไทยใน 10 จังหวัด จำนวน 55 ไอโซเลท ในช่วงปี พ.ศ. 2551-2553 ให้หมายเลขตัวอย่างเป็นอักษร 4 ตัว คืออักษร 2 ตัวแรก คือชื่อย่อของงา (Sesame: SE) อักษร 2 ตัวหลัง คือชื่อย่อจังหวัด (ลพบุรี: LB, นครราชสีมา: NM, สระแก้ว: SK, สุโขทัย: ST, เพชรบูรณ์: PB, นครสวรรค์: NW, กาญจนบุรี: KB, เลย: LE, พิษณุโลก: PL และบุรีรัมย์: BR) ตัวเลข คือหมายเลขไอโซเลท และนำตัวอย่างงาที่แสดงอาการโรคและงาปกติมาตรวจดูเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (JEOL model JEM-1230, Japan) เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี ultrathin section โดยการฝังตัวอย่างใน Spurr's resin

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอจากงาที่แสดงอาการของโรคและงาปกติ โดยใช้ส่วนก้านใบและเส้นกลางใบด้วยวิธี CTAB ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่ได้โดย 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X Tris-borate EDTA (TBE) buffer จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และยีน *secY* โดยใช้ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 (5´-ACGACTGCTGCTAAGACTGG-3´/5´-TGACGGGCG GTGTGTACAAACCCCG-3´) (Gundersen and Lee, 1996) และไพรเมอร์ AYsecYF1/AYsecYR1 (5'CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGG-3´/5´-CAGAAG CTTGAGTGCCTTTACC-3´) (Lee *et al*., 2006) ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับยีน 16S rRNA และยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมา ตามลำดับ โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Taq buffer 2.5 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 2 ไมโครลิตร 10 mM dNTP 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward

และ reverse (10 pmol/µL) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (0.1 unit/µL) 0.25 ไมโครลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 16.25 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ (10 ng/µL) 1 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (MJ Research PTC-100) (GMI, USA) ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ประกอบด้วย initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ แต่ละรอบ ประกอบด้วย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที ตามด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส ในรอบสุดท้าย 10 นาที จากนั้นนำผลผลิตจากเทคนิค PCR มาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

การโคลนยีนและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.2 และ 1.3 กิโลเบส จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และยีน *secY* ตามลำดับ มาเป็นตัวแทนจากแต่ละจังหวัดเพื่อโคลนยีนและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (Promega, USA) สกัดดีเอ็นเอจาก agarose gel เพื่อแยกแถบดีเอ็นของยีนเป้าหมายที่ได้จากการทำ PCR จากนั้นนำมาเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pGEM®-T Easy Vector (Promega, USA) และนำพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี $CaCl_2$/heat shock transformation คัดเลือกโคลนบนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (100 µg/mL) และ IPTG และ X-gal (20 mg/mL) อย่างละ 40 µL โดยวิธี blue-white colony screening และตรวจสอบโคลนอีกครั้งด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ปฏิกิริยาเหมือนการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายข้างต้น และสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Canada) และนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ First Base Laboratories ประเทศมาเลเซีย นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และยีน *secY* เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

การจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยโปรแกรม clustalW2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทนใน 15 กลุ่ม (16SrI-16SrXV) ดังนี้ 16SrI (D12569; Onion yellows), 16SrII (L33765; Peanut witches'-broom), 16SrIII (L04682; Western X), 16SrIV (U18747; Coconut lethal yellowing), 16SrV (AF189214; *Candidatus* Phytoplasma ulmi), 16SrVI (AY390261; *Ca.* Phytoplasma trifolii), 16SrVII (AF189215; *Ca.* Phytoplasma fraxini), 16SrVIII (AF086621; Loofah witches'-broom), 16SrIX (AF248957; Pigeon pea witches'-broom), 16SrX (AF248958; *Ca.* Phytoplasma mali), 16SrXI (D12581; *Ca.* Phytoplasma oryzae), 16SrXII (AF248959; *Ca.* Phytoplasma solani), 16SrXIII (AF248960; Mexican periwinkle virescence), 16SrXIV (AJ550984; *Ca.* Phytoplasma cynodontis), 16SrXV (AF147708; *Ca.* Phytoplasma brasiliense), เชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม *Acholeplasma laidlawii* (M23932) และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่เคยมีรายงาน ได้แก่ สายพันธุ์ SEPN (EF193357) ในประเทศไทยสายพันธุ์ SIF (EU072504) และสายพันธุ์ SIL (EU072505) ในประเทศโอมาน และสายพันธุ์ SP-MYAN (AB558132) ในประเทศพม่า นำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ของเชื้อด้วยโปรแกรม MEGA version 4.1

การจัดกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี *in silico* RFLP

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน F2nR2 ของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นบริเวณที่เพิ่มปริมาณได้ของเชื้อไฟโตพลาสมา

มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *in silico* RFLP โดยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 17 ชนิด (*Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau3*AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I และ *Taq*I) ด้วยโปรแกรม *i*PhyClassifier (http://www.ba.ars.usda.gov/data/ mppl/iPhyClassifier.html.) โดยเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอ็นไซม์แต่ละชนิดกับเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นตัวแทนกลุ่มย่อยจากฐานข้อมูล GenBank หากมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (similarity coefficient) > 0.97 จึงจัดว่าเชื้ออยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน (Wei *et al.*, 2008)

การจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของของยีน *secY*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* 8 ไอโซเลท มาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา 11 กลุ่ม ดังนี้ SecY-I (NC_005303; Onion yellows phytoplasma OY-M), SecY-II (GU004331; Peanut witches'-broom phytoplasma), SecY-III (GU004327; Peach X-disease phytoplasma), SecY-IV (GU004320; Coconut lethal yellows phytoplasma), SecY-V (GU004330; *Candidatus* Phytoplasma ulmi), SecY-VI (GU004315; *Ca.* Phytoplasma trifolii), SecY-VII (GU004329; *Ca.* Phytoplasma fraxini), SecY-VIII (GU004319; Loofah witches'-broom phytoplasma), SecY-X (NC_011047; *Ca.* Phytoplasma mali), SecY-XII (NC_010544; *Ca.* Phytoplasma australiense), SecY-XIII (GU004336; Mexican periwinkle virescence phytoplasma), เชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม *Acholeplasma laidlawii* PG-8A (NC_010163) และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทยที่เคยมีรายงานได้แก่ สายพันธุ์ SEPN (GU004362) และ SEPT (GU004322)

ผลและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างโรคและตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาในงาที่เป็นโรค

ลักษณะอาการของโรคที่พบ คือ แตกพุ่มฝอย และดอกมีสีเขียวคล้ายใบ และพบอาการ อื่นๆ ด้วย เช่น อาการเหลือง ใบและลำต้นหงิกงอ เตี้ยแคระ ลำต้นแบน ฝักแตก และเมล็ดในฝักงอก และในแต่ละต้นพบอาการเดี่ยวๆ หรือพบหลายอาการร่วมกันด้วย (ตารางที่ 1) ซึ่งอาการที่แตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของต้นงาที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย จากการตรวจเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน พบเชื้อไฟโตพลาสมาบริเวณท่ออาหารของต้นงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอย ซึ่งมีรูปร่างและขนาดหลากหลายตั้งแต่กลม รี และค่อนข้างยาว ขนาดประมาณ 100-1,000 นาโนเมตร (ภาพที่ 1) และไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาจากตัวอย่างงาปกติ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในงาที่แสดงอาการของโรคทั้งหมด 55 ไอโซเลท พบว่าเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ได้ 44 ไอโซเลท โดยพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส ส่วนอีก 11 ไอโซเลท ไม่พบแถบดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีอาการลำต้นแบน โดย Tamimi *et al*. (1989) รายงานว่า พบลักษณะบางอย่างที่มีรูปร่างไม่แน่นอนในท่ออาหารของงาที่มีอาการลำต้นแบนเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งมีการสันนิษฐานว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *Rhodococcus fascians* (Wilson *et al*., 2001) ส่วนการเพิ่มปริมาณยีน *secY* จากตัวอย่างทั้งหมด 55 ไอโซเลท พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.3 กิโลเบส จำนวน 18 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) เนื่องจาก ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ออกแบบมาจากลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ Aster yellows phytoplasma (AY) และ Onion yellows phytoplasma (OY) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI และมีความจำเพาะกับเชื้อในกลุ่ม 16SrI เท่านั้น (Hodgetts and Dickinson, 2010)

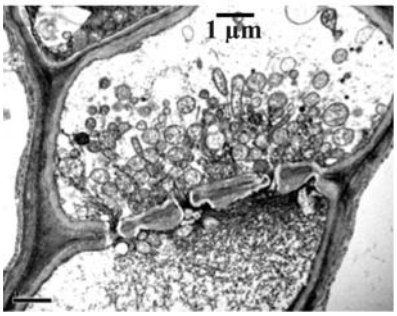
ตารางที่ 1 การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุของโรคแตกพุ่มฝอยของงาด้วยเทคนิค PCR ของยีน 16S rRNA และ *secY* และผลการจัดจำแนก

จังหวัด/ไอโซเลท	ลักษณะอาการ	ผลการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR		กลุ่มและกลุ่มย่อย	
		16S rRNA	*secY*	16Sr/GenBank Accession No.	SecY
ลพบุรี: LB					
SELB1	ยอดแบน	-	-	ND	ND
SELB2	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	ND	ND
SELB3	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	ND	ND
SELB4	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	ND	ND
SELB5	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	16SrII/JN006075	ND
SELB7	ดอกเขียว	+	-	ND	ND
SELB8	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	ND	ND
นครราชสีมา: NM					
SENM1	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	+	16SrI-B/JN006068	SecY-I
SENM2	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	ND	ND
SENM3	ยอดแบน	-	-	ND	ND
SENM4	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	ND	ND
SENM5	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	16SrII-A/JN006077	ND
สระแก้ว: SK					
SESK1	ยอดแบน	-	-	ND	ND
SESK2	ยอดแบน	-	-	ND	ND
SESK3	ยอดแบน	-	-	ND	ND
สุโขทัย: ST					
SEST1*	ดอกเขียว	+	+	16SrI/JN006071	SecY-I
SEST2	ดอกเขียว ใบเหลือง	+	+	16SrI-B/JN006072	SecY-I
SEST3	ดอกเขียว ฝักแตก	+	+	ND	ND
SEST4	ดอกเขียว	+	+	ND	ND
SEST5	ดอกเขียว	+	+	ND	ND

เพชรบูรณ์: PB					
SEPB1	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	16SrII/JN006078	ND
SEPB2*	แตกพุ่มฝอย ใบเหลือง	+	-	16SrII-A/JN006079	ND
SEPB3	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	-	ND	ND
SEPB4	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	-	ND	ND
SEPB5	ดอกเขียว	+	-	ND	ND
นครสวรรค์: NW					
SENW1	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	+	16SrI-B/JN006069	SecY-I
SENW2	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ลำต้นหงิกงอ	+	+	ND	ND
SENW3	ดอกเขียว ใบเหลือง	+	-	ND	ND
SENW4	ดอกเขียว ลำต้นหงิกงอ	+	+	ND	ND
นครสวรรค์: NW					
SENW5	ดอกเขียว ลำต้นหงิกงอ	+	+	ND	ND
SENW6	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	+	ND	ND
SENW7	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ลำต้นหงิกงอ	+	+	ND	ND
SENW9	ดอกเขียว	+	-	ND	ND
SENW10	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลืองหงิกงอ	+	-	ND	ND
SENW11	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	ND	ND
SENW12	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	ND	ND
กาญจนบุรี: KB					
SEKB1	ยอดแบน	-	-	ND	ND
SEKB2	ยอดแบน	-	-	ND	ND
SEKB3	ยอดแบน	-	-	ND	ND
SEKB4	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ลำต้นเตี้ยแคระ	+	-	16SrII/JN006073	ND
SEKB5	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-	16SrII-A/JN006074	ND
SEKB6	ยอดแบน	-	-	ND	ND

เลย: LE					
SELE1	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	+	16SrI-B/JN006067	SecY-I
SELE2	ดอกเขียว ลำต้นเตี้ย แคระ	+	-	16SrII-A/JN006076	ND
SELE3	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ลำต้นเตี้ยแคระ	+	-	ND	ND
SELE4	ยอดแบน	-	-	ND	ND
SELE5	แตกพุ่มฝอย	+	-	ND	ND
SELE6	แตกพุ่มฝอย	+	-	ND	ND
พิษณุโลก: PL					
SEPL2	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	+	ND	ND
SEPL3	แตกพุ่มฝอย	+	+	16SrI-B/JN006070	SecY-I
บุรีรัมย์: BR					
SEBR1	ยอดแบน	-	-	ND	ND
SEBR2	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	-	ND	ND
SEBR3	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	+	ND	ND
SEBR4	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ฝักแตก เมล็ดในฝักงอก	+	+	16SrI-B/JN006065	SecY-I
SEBR5	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ฝักแตก เมล็ดในฝักงอก	+	+	16SrI-B/JN006066	SecY-I

หมายเหตุ: + คือ สามารถเพิ่มปริมาณได้; - คือ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้; ND คือ ไม่ได้ทำการทดลอง;
* คือ ไอโซเลทที่นำมาตรวจเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน



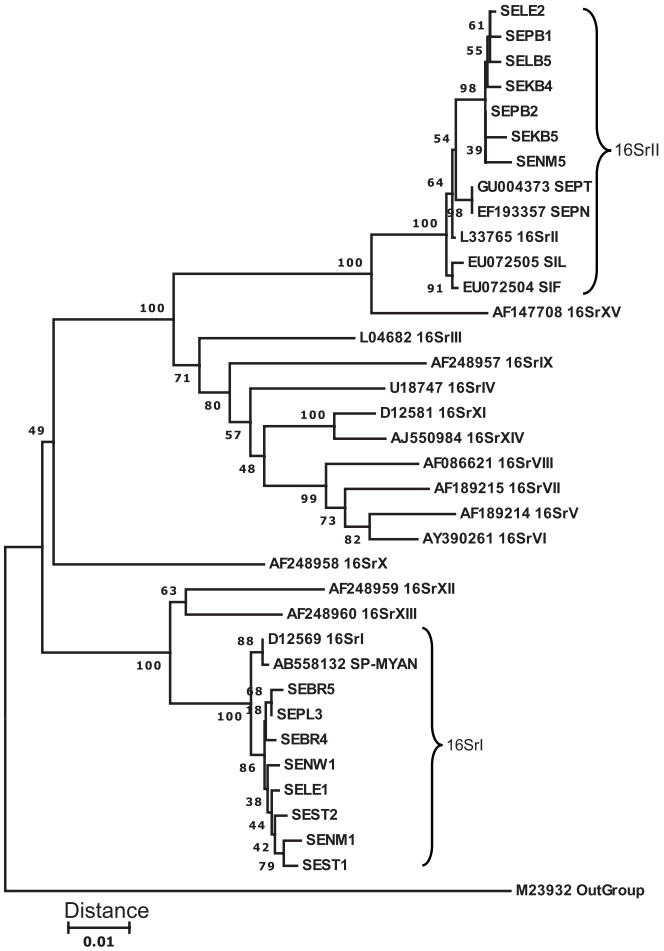
ภาพที่ 1. ภาพตัดขวางของเซลล์ท่ออาหารของงาที่ติดเชื้อไฟโตพลาสมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

การจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

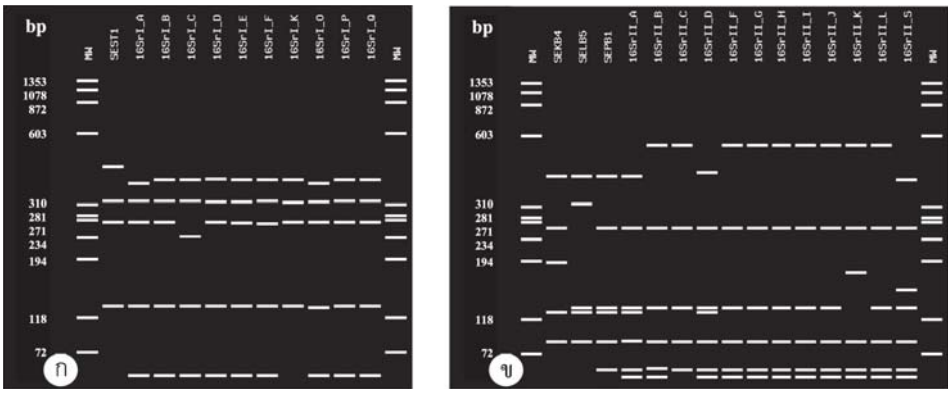
การจัดกลุ่มเชื้อ 15 ไอโซเลท จาก 9 จังหวัด (เนื่องจากไม่พบแถบดีเอ็นเอของไอโซเลทในจังหวัดสระแก้ว) ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA (ตารางที่ 1) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,246-1,248 นิวคลีโอไทด์ พบว่าจัดได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 16SrI (Aster yellows group) ได้แก่ ไอโซเลท SENM1, SEST1, SEST2, SENW1, SELE1, SEPL3, SEBR4 และ SEBR5 โดยมีค่าความคล้ายคลึง 98.9-99.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่ม 16SrII (Peanut witches'-broom group) ได้แก่ ไอโซเลท SELB5, SENM5, SEPB1, SEPB2, SEKB4, SEKB5 และ SELE2 โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.0-99.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่เคยพบในประเทศไทย (SEPN และ SEPT) และโอมาน (SIF และ SIL) ที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII เช่นกัน โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.7-99.8 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการรายงานไว้ในประเทศพม่า (SP-MYAN) (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2) ซึ่งจากการสำรวจเก็บตัวอย่างในการศึกษานี้ในแหล่งปลูกงาจังหวัดนครราชสีมาและเลย พบเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI และ 16SrII จึงเป็นไปได้สูงที่โรคแตกพุ่มฝอยของงามีเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นสาเหตุอย่างน้อย 2 ชนิด

การจัดกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยวิธี *In silico* RFLP

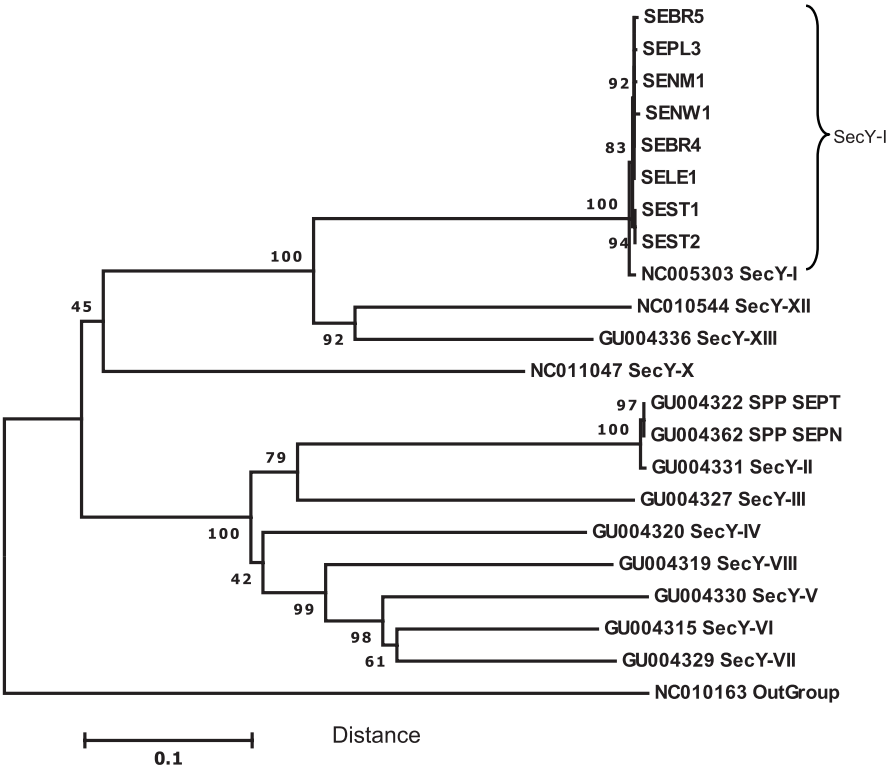
ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA ส่วน F2nR2 ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 17 ชนิด โดยโปรแกรม *i*PhyClassifier ไอโซเลทที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI จำนวน 8 ไอโซเลท คือ SENM1, SEST1, SEST2, SENW1, SELE1, SEPL3, SEBR4 และ SEBR5 พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrI-B ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงระหว่าง 0.98-1.00 ยกเว้น SEST1 มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 0.94 ส่วนไอโซเลทที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII จำนวน 7 ไอโซเลท คือ SELB5, SENM5, SEPB1, SEPB2, SEKB4, SEKB5 และ SELE2 พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrII-A ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 1.00 ยกเว้น SELB5, SEPB1 และ SEKB4 มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงระหว่าง 0.92-0.97 ไอโซเลทที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง $\leq$ 0.97 นั้น อาจเป็นตัวแทนเชื้อในกลุ่มย่อยใหม่ จึงยืนยันโดยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 17 ชนิดทีละชนิด ตามรายงานของ Wei *et al*. (2008) ที่พบว่าความแตกต่างของตำแหน่งการตัดเพียง 1 หรือ 2 ตำแหน่งตัดที่แตกต่างไปจากกลุ่มย่อยเดิมก็สามารถจัดเป็นกลุ่มย่อยใหม่ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่เป็นตัวแทนกลุ่มย่อยในแต่ละกลุ่มของทั้งสองกลุ่ม พบว่าเอ็นไซม์บางชนิด เช่น *Mse*I สามารถให้ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของเชื้อที่ศึกษาและเชื้อที่เป็นตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่มนั้นๆ ได้ (ภาพที่ 3) ซึ่งจากรายงานของ Khan *et al*. (2002) ได้จัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากประเทศไทย 2 สายพันธุ์ คือ SEPN และ SEPT โดยวิเคราะห์และเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrII-A เพียงกลุ่มย่อยเดียวเท่านั้น ส่วนการศึกษาในครั้งนี้พบเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาของไทยจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrI-B และ 16SrII-A



ภาพที่ 2. ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย เปรียบเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน 15 กลุ่มจากฐานข้อมูล Genbank และเชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม *(A. laidlawii)* โดยวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987)



ภาพที่ 3. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริงที่ได้จากการตัดส่วน F2nR2 ของยีน 16S rRNA ของเชื้อที่ศึกษาเทียบกับตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่ม 16SrI และ16SrII ซึ่งตัดด้วย *Mse*I โดยไอโซเลท SEST1 เทียบกับตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่ม 16SrI (ก), ไอโซเลท SELB5, SEPB1 และ SEKB4 เทียบกับตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่ม 16SrII (ข), ดีเอ็นเอมาตรฐาน (MW) คือ ØX174 ที่ตัดด้วย *Hae*III



ภาพที่ 4. ความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย เปรียบเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทนแต่ละกลุ่ม และเชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม (*A. laidlawii*) โดยวิธี neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987)

การจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของของยีน *secY*

ผลการเลือกไอโซเลทที่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1.3 กิโลเบสของยีน *secY* ทั้ง 8 ไอโซเลท ที่ทั้งหมดเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI (ตารางที่ 1) ซึ่งผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ที่ได้มีขนาด 1,358 นิวคลีโอไทด์ นำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทน 11 กลุ่ม พบว่า ทุกไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่ม SecY-I (ภาพที่ 4) ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึง 98.9-99.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์ที่มีการศึกษาในประเทศไทย (SEPN และ SEPT) โดย Lee *et al.* (2010) พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม SecY-II โดยมีค่าความคล้ายคลึง 99.6 เปอร์เซ็นต์

สรุป

การจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA พบโรคแตกพุ่มฝอยของงาเกิดจากเชื้อ 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม 16SrI (Aster yellows group) และ 16SrII (Peanut witches'-broom group) จากที่เคยมีรายงานเพียงกลุ่ม 16SrII และการจัดกลุ่มย่อยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค *in silico* RFLP แบ่งเชื้อเป็นกลุ่มย่อย 16SrI-B และ 16SrII-A โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง > 0.97 ส่วนผลการจัดกลุ่มโดยอาศัยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* พบว่าเชื้อที่อยู่ในกลุ่ม 16SrI ทั้ง 8 ไอโซเลท ที่นำมาศึกษาจัดอยู่ในกลุ่ม SecY-I

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ผู้สนับสนุนงบประมาณการวิจัย และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

Gundersen, D. E. and I. -M. Lee. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal primer pairs. Phytopathology Medit. 35: 114-151.

Hodgetts, J. and M. Dickinson. 2010. Phytoplasma phylogeny and detection based on genes other than 16S rRNA, pp. 93-113. *In* P. G. Weintraub and P. Jones, eds. Phytoplasma Genomes, Plant Hosts and Vectors. CABI, UK.

IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group. 2004. '*Candidatus* Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 1243-1255.

Khan, A. J., S. Botti, A. M. Al-Subhi, D. E. Gundersen-Rindal and A. F. Bertaccini. 2002. Molecular identification of a new phytoplasma associated with alfalfa witches' broom in Oman. Phytopathology 92: 1038-1047.

Khan, M. S., S. K. Raj and S. K. Snehi. 2007. First report of '*Candidatus* Phytoplasma asteris' affecting sesame cultivation in India. J. Plant Pathol. 89: 301-305.

Lee, I. -M., Y. Zhao and K. D. Bottner. 2006. SecY gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group. Mol. Cell. Probes 20: 87-91.

Lee, I. -M, K. D. Bottner-Parker, Y. Zhao, R. E. Davis and N. A. Harrison. 2010. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on secY gene sequences. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 2887-2897.

Nakashima, K. and N. Murata. 1993. Destructive plant diseases caused by mycoplasma-like organisms in Asia. Outlook Agric. 22: 53-58.

Saitou, N. and M. Nei, 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol.4: 406-425.

Sertkaya, G., M. Martini, M. Rita and O. Ruggero. 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasmas infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. Bulletin of Insectology 60: 141-142.

Tamimi, K. M., F. A. Fattah and M. A. Al-Hamdany. 1989. Shoot apex fasciation in *Sesamum indicum* associated with mycoplasma-like organisms. Phytopathology. 38: 300-304.

Vyas S. C. 1981. Diseases in sesamum in India and their control. Pesticides 15: 10.

Wei, W., I. -M. Lee, R. E. Davis, X. Suo and Y. Zhao. 2008. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 2368-2377.

Wilson, D., K. R. Blanche and K. S. Gibb. 2001. Phytoplasma and disease symptoms of crops and weeds in the semi-arid tropics of the Northern Territory, Australia. Austral. Plant Pathol. 30: 159-163.