

การจัดจำแนกในระดับชีวโมเลกุลของเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในโรคพุ่มแจ้ – โรคอุบัติใหม่ของมันสำปะหลังในประเทศไทย

Molecular Characterization of Phytoplasma Associated with Witches' Broom Disease - Emerging Disease of Cassava in Thailand

สุภาพร กลิ่นคง¹, วาสนา รุ่งสว่าง¹, ปันหา ขวัญทองยิ้ม¹ และคณิณนิตย์ เจริญวารากร^{1,2,3}
Supaporn Klinkong¹, Wasana Rungsawang¹, Punda Khwantongyim¹ and Kanungnit Reanwarakorn^{1,2,3}

Abstract

The total of 238 cassava samples showing symptoms of witches' broom, yellow and small leaves, lateral shoot stunt and dwarf were collected from 9 provinces in Northeastern and Central Thailand. Disease symptoms were investigated for the causal agent of witches' broom disease in cassava leaf by electron microscopy. Phytoplasmas were observed in the phloem of infected cassava isolate CPCS4-1. All of the collected cassava samples were determined by nested PCR technique with 16S rRNA gene specific primers, P1A/P7A, R16F2n/R16R2 and R16 (I)-F1/ R16 (I)-R1. DNA fragments around 1,100 bp in size were obtained from the extracted DNAs of 174 cassava samples. The DNA fragments of 39 isolates of cassava witches' broom phytoplasma were sequenced and further analyzed for the relationship compared with the referenced phytoplasma strains (16Srl-16SrXV groups) from the GenBank Database. Results indicated that phytoplasma sequences of DNA fragments associated with cassava witches' broom symptom in the main planting areas of Thailand were closely related to phytoplasma CW-VN strain from Viet Nam and arranged in 16Srl group of phytoplasma (*Candidatus* Phytoplasma asteris) with 98.0-100.0% similarity. This is the first report confirming the phytoplasma associated with cassava witches' broom disease in Thailand.

Keywords: Cassava, phytoplasma, witches' broom, electron microscopy, 16S rRNA gene

¹ 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

² ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

³ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ กรุงเทพฯ

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand

รับเรื่อง : กุมภาพันธ์ 2559

รับตีพิมพ์ : พฤษภาคม 2559

Corresponding author : agrsup@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างมันสำปะหลัง 238 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการพุ่มแจ้ ลำต้นแคระแกร็น ใบเหลือง จากแปลงปลูกใน 9 จังหวัด ได้แก่ ฉะเชิงเทรา (CS) กำแพงเพชร (KP) ระยอง (RY) หนองคาย (NK) นครพนม (PN) มุกดาหาร (MH) บุรีรัมย์ (BR) ศรีสะเกษ (SS) และสุรินทร์ (SR) ศึกษาอาการโรคของต้นที่ปลูกจากท่อนพันธุ์เป็นโรคในสภาพโรงเรือน พบว่าต้นมันสำปะหลังเริ่มแสดงอาการหลังจากปลูกประมาณ 3 เดือน เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบเชื้อไฟโตพลาสมาขนาดประมาณ 200-1,000 นาโนเมตร ใน sieve elements บริเวณท่ออาหารของเนื้อเยื่อใบมันสำปะหลังไอโซเลท CPCS4-1 และจากการสังเคราะห์ยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ P1A/P7A, R16F2n/R16R2 และ R16(I)-F1/ R16(I)-R1 ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส จากมันสำปะหลัง 174 ตัวอย่าง ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมา 39 ไอโซเลท และเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีรายงาน (16SrI-16SrXV groups) ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการพุ่มแจ้ในแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทยมีความเหมือนกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ของมันสำปะหลังสายพันธุ์ CW-VN ในประเทศเวียดนาม และจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI (*Candidatus Phytoplasma asteris*) โดยมีความเหมือนที่ 98.0-100.0 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานแรกของประเทศไทยที่ยืนยันการพบเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังที่แสดงอาการพุ่มแจ้

คำสำคัญ: มันสำปะหลัง เชื้อไฟโตพลาสมา โรคพุ่มแจ้ เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ยีน 16S rRNA

คำนำ

ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลัง 8.4 ล้านไร่ ในปี พ.ศ. 2557 ประเทศไทยผลิตมันสำปะหลัง 30.2 ล้านตัน อีกทั้งมันสำปะหลังถูกจัดเป็น 1 ใน 4 สินค้ารายพืชเศรษฐกิจที่ทางกระทรวงเกษตรและสหกรณ์มีเป้าหมายผลักดันให้ประเทศไทยเป็นผู้นำด้านมาตรฐาน และศูนย์กลางในการบริหารจัดการสินค้าเกษตรที่สำคัญในภูมิภาคอาเซียน ทั้งนี้เพื่อเพิ่มอำนาจการแข่งขันของสินค้า โดยรายพืชเศรษฐกิจ 4 สินค้า คือ ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ มันสำปะหลัง ปาล์มน้ำมัน และ อ้อยโรงงาน (Office of Agricultural Economics, 2014) ดังนั้นขั้นตอนการผลิตมันสำปะหลังที่ดีมี

คุณภาพจึงเป็นอีกกลไกหนึ่งในการขับเคลื่อนยุทธศาสตร์การพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย การเฝ้าระวังจึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคอันจะก่อให้เกิดความเสียหายระดับเศรษฐกิจ เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้ของมันสำปะหลังได้ถูกกำหนดเป็นศัตรูพืชต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 เนื่องจากยังไม่มีรายงานการระบาดของโรคนี้ในประเทศไทย จากรายงานของ The International Center for Tropical Agriculture (CIAT) ปี พ.ศ. 2554 พบการระบาดมากในหลายพื้นที่ของประเทศในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศเวียดนาม พบการระบาดมากและสร้างความเสียหายต่อพื้นที่เพาะปลูกกว่า 80

เปอร์เซ็นต์ โดยทำให้คุณภาพผลผลิตลดลง 25 – 30 เปอร์เซ็นต์ (Alvarez *et al.*, 2013; New Agriculturist, 2014) และมีรายงานพบโรคนี้ในกัมพูชา ลาว และฟิลิปปินส์ (Reddy, 2015) เช่นกัน ปัจจุบันพบมันสำปะหลังที่แสดงอาการพุ่มแจ้ (witches' broom) ในหลายพื้นที่ของประเทศไทย แต่ยังไม่มีการพิสูจน์โรคว่ามีสาเหตุจากเชื้อชนิดใด โรคพุ่มแจ้ของมันสำปะหลังเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งสามารถเข้าทำลายมันสำปะหลังได้ทุกระยะ และถ่ายทอดผ่านท่อนพันธุ์ โรคจึงแพร่ระบาดได้อย่างกว้างขวาง ลักษณะอาการของโรคมักพบในระยะใกล้เก็บเกี่ยวคือ ลำต้นและรากแคระแกร็นเล็กน้อย เกิดการแตกตายยอดและตาข้างมาก ผิดปกติ ใบมีขนาดเล็กและเกิดเป็นกระจุกหรืออาการแตกพุ่ม บางพันธุ์พบอาการใบเหลือง ใบต่างเหลือง และใบม้วน (Reddy, 2015) การจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นยีนหนึ่งที่น่ามาใช้มากที่สุดโดยแยกกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมา 2 กลุ่มออกจากกันที่ระดับ 97.5 เปอร์เซ็นต์หรือต่ำกว่า (IRPCM, 2004) มีรายงานการจำแนกชนิดเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในมันสำปะหลังที่แสดงอาการพุ่มแจ้ในประเทศเวียดนาม โดยยีน 16S rRNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม 16Srl หรือ *Candidatus Phytoplasma asteris* (Alvarez *et al.*, 2013) การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์ยืนยันการพบเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคพุ่มแจ้ โดยเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรค ครอบคลุมพื้นที่ปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญของประเทศไทยจากแปลงที่มีการระบาดของโรค และแปลงในจังหวัดที่ติดชายแดนประเทศลาว และกัมพูชา ได้แก่ หนองคาย นครพนม และมุกดาหาร โดย

เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับเชื้อที่เคยมีรายงานทั้งในประเทศและต่างประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างโรคและการศึกษาโครงสร้างจุลภาคในใบมันสำปะหลังที่เป็นโรค

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการพุ่มแจ้จากแหล่งปลูกมันสำปะหลังในพื้นที่ 9 จังหวัด ได้แก่ ฉะเชิงเทรา กำแพงเพชร ระยอง หนองคาย นครพนม มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ และสุรินทร์ จังหวัดละ 5 แปลง แปลงละ 5-6 ตัวอย่าง ให้หมายเลขตัวอย่างเป็น 4 ตัว คืออักษร 2 ตัวแรกคือชื่อย่อของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคของมันสำปะหลัง (Cassava phytoplasma : CP) อักษร 2 ตัวหลัง คือชื่อย่อจังหวัด (ฉะเชิงเทรา: CS, กำแพงเพชร: KP, ระยอง: RY, หนองคาย: NK, นครพนม: PN, มุกดาหาร: MH, บุรีรัมย์: BR, ศรีสะเกษ: SS และสุรินทร์: SR) ตัวเลขคือหมายเลขไอโซเลท และนำท่อนพันธุ์มาปลูกไว้ในโรงเรือนกันแมลงเพื่อสังเกตอาการโรคต่อไป สำหรับตัวอย่างจากจังหวัดระยองที่นำมาศึกษาเก็บโดยเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง นำตัวอย่างใบมันสำปะหลังปกติและมันสำปะหลังที่เก็บจากจังหวัดฉะเชิงเทรา (ไอโซเลท CPCS4-1) ซึ่งแสดงอาการแตกพุ่มแจ้หลังจากปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา 3 เดือน มาตรวจด้วยวิธี ultrathin section โดยทำการฝังตัวอย่างใน Spurr's resin (Spurr, 1969) มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยตัดบริเวณเส้นใบขนาดประมาณ 1x2x3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ดองตัวอย่างใน 5% glutaraldehyde เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และแช่ใน 2% osmium tetroxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ขจัด

น้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) ด้วยการแช่ตัวอย่างใน ethanol ความเข้มข้น 30, 50, 80, 90 และ 100% ความเข้มข้นละ 10 นาที ตามลำดับ จากนั้นแช่ตัวอย่างใน 100% ethanol ผสม n-butyl glycidyl ether (QY-1) อัตรา 1:1 นาน 30 นาที และใน QY-1 นาน 30 นาที แล้วนำมาแช่ใน QY-1 ผสม Spurr's resin อัตรา 1:1 นาน 1 ชั่วโมง และแช่ใน Spurr's resin 2 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง อบตัวอย่างที่แช่ใน Spurr's resin ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมงหรือข้ามคืน แล้วนำตัวอย่างไปตัดให้เป็น ultrathin section ด้วยเครื่อง ultramicrotome ให้มีความหนาประมาณ 500-1000 แองสตรอม (Å) ย้อมด้วย 5% uranyl acetate และ 0.01% lead citrate นำไปตรวจดูโครงสร้างจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (JEOL JEM -1230)

การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอจากมันสำปะหลังที่แสดงอาการของโรคและมันสำปะหลังปกติ โดยวิธี CTAB (Namba *et al.*, 1993) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ คู่ที่ 1 P1A/P7A (5'-ACG CTG GCG GCG CGC CTA ATA C-3'/5'- CCT TCA TCG GCT CTT AGT GC -3') (Lee *et al.*, 2004), คู่ที่ 2 R16F2n/ R16R2 (5'- GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG -3'/5'- TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G -3') (Lee *et al.*, 1993; Gundersen and Lee, 1996) และ คู่ที่ 3 R16(I)-F / R16(I)-R (5'- TAA AAG ACC TAG CAA TAG G -3'/5'- CAA TCC GAA CTG AGA CTG T -3') (Lee *et al.*, 1994) ที่มีความจำเพาะ

กับยีน 16S rRNA โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10X Dream Taq buffer 2.5 ไมโครลิตร (Fermentas, Ontario, Canada) 25 mM MgCl₂ 2 ไมโครลิตร 10 mM dNTP 2 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ forward และ reverse (10 pmol/μl) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร Dream Taq DNA polymerase (0.1 unit/μl) 0.25 ไมโครลิตร น้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ 16.25 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ (10 ng/μl) 1 ไมโครลิตร โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler (MJ Research-PT100) ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ประกอบด้วย pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 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 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 1 มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 2 (nested PCR) ด้วยปฏิกิริยาเช่นเดียวกับการใช้ไพรเมอร์คู่แรก นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา nested PCR มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่ 3 นำผลผลิตดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

การโคลนยีนและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยปฏิกิริยา PCR มาเป็นตัวแทนจากแต่ละจังหวัดเพื่อ

โคลนยีนและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (Promega, USA) สกัดดีเอ็นเอจาก agarose gel เพื่อแยกแถบดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายที่ได้จากการทำ PCR มาเชื่อมต่อกับพลาสมิด pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA) นำดีเอ็นเอสายผสมที่ได้ถ่ายเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี heat shock transformation คัดเลือกโคลนบนอาหารแข็ง LB (Luria-Bertani) ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (x-gal) และ Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) โดยวิธี blue-white colony screening โดยแต่ละตัวอย่างคัดเลือกเพียง 1 โคลน สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้ GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Canada) นำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 1st_BASE Laboratories ประเทศมาเลเซีย ซึ่งในแต่ละตัวอย่างจะวิเคราะห์ลำดับเบสสองสาย คือ สายที่จัดเรียงตัวในทิศทาง T7 และในทิศทาง SP6 (pGEM[®]-T Easy) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับยีนที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank โดยโปรแกรม BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) จากฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) เพื่อวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด เพื่อนำมาศึกษาความสัมพันธ์ของเชื้อ

การจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบด้วยโปรแกรม clustalW2 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทนใน 15 กลุ่ม (16SrI-16SrXV) (Lee *et al.*, 1998) ดังนี้ 16SrI (D12569; Onion yellows), 16SrII (L33765; Peanut witches'-broom), 16SrIII (L04682; Western X phytoplasma), 16SrIV (U18747; Coconut lethal yellowing), 16SrV (AF189214; *Candidatus* Phytoplasma ulmi), 16SrVI (AY390261; *Candidatus* Phytoplasma trifolii), 16SrVII (AF189215; *Candidatus* Phytoplasma fraxini), 16SrVIII (AF086621; Loofah witches'-broom), 16SrIX (AF248957; Pigeon pea witches'-broom), 16SrX (AF248958; *Candidatus* Phytoplasma mali), 16SrXI (D12581; *Candidatus* Phytoplasma oryzae), 16SrXII (AF248959; *Candidatus* Phytoplasma solani), 16SrXIII (AF248960; Mexican periwinkle virescence), 16SrXIV (AJ550984; *Candidatus* Phytoplasma cynodontis) และ 16SrXV (AF147708; *Candidatus* Phytoplasma brasiliense) เปรียบเทียบร่วมกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีความสัมพันธ์กับโรคพุ่มแจ้ที่เคยมีรายงาน คือ สายพันธุ์ YB-Xaemroi2012 (KC295283), AHTB20-1 (JN381548) และ S22TE

(KP119154) จากประเทศเวียดนาม และเชื้อไฟโตพลาสมาโคลน 3 – 4 (KJ210318), 4 – 5 (KJ210319) และ 5 – 4 (KJ210312) จากประเทศกัมพูชา และเชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่มคือ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และ *Acholeplasma laidlawii* จาก นั้นใช้โปรแกรม MEGA version 5 สร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) โดยใช้วิธี Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) และทดสอบความเชื่อมั่น ด้วยวิธีทดสอบ bootstrap ทั้งหมด 1,000 ครั้ง

ผลและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างโรคและการศึกษาโครงสร้างจุลภาคในใบมันสำปะหลังที่เป็นโรค

จากการสำรวจสภาพแปลงและเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังจำนวน 238 ตัวอย่าง จากแปลงมันสำปะหลังใน 8 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดฉะเชิงเทรา กำแพงเพชร หนองคาย นครพนม มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ และสุรินทร์ โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 25, 33, 29, 32, 29, 26, 28 และ 26 ตัวอย่าง ตามลำดับ และตัวอย่างจากศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง 10 ตัวอย่าง พบลักษณะอาการของโรคพุ่มแจ้ โดยมักพบอาการในระยะเก็บเกี่ยวกระจายทั่วแปลงปลูก โดยแสดงอาการแตกพุ่มบริเวณยอด แตกกิ่งและใบเป็นกระจุกจำนวนมากที่ลำต้น ก้านใบหัดสั้น ลำต้นแคระแกร็น และพบอาการเหลือง ใบม้วน และใบแห้งตายร่วมด้วยในต้นที่มีอาการรุนแรง (Figure 1 A and B) ซึ่งคล้ายกับอาการถูกทำลายโดยแมลง เช่น เพลี้ยไฟ อาการขาดธาตุ หรือไวรัส ที่มีแมลงหิวขาว (*Bemisia tuberculata*) เป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อ (Alvarez *et al.*, 2009) จากการตรวจตัวอย่าง

เนื้อเยื่อใบมันสำปะหลังที่แสดงอาการไอโซเลท CPCS4-1 จาก จังหวัดฉะเชิงเทรา ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบเชื้อไฟโตพลาสมาบริเวณท่ออาหารของใบ ซึ่งมีรูปร่างและขนาดหลากหลาย ตั้งแต่กลม รี และค่อนข้างยาว ขนาดประมาณ 200-1,000 นาโนเมตร (Figure 1 C) และไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาจากตัวอย่างมันสำปะหลังปกติ

การเพิ่มปริมาณยีน 16SrRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค nested PCR

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตัวอย่างมันสำปะหลัง 156 ตัวอย่าง จากจังหวัดฉะเชิงเทรา กำแพงเพชร ระยอง หนองคาย นครพนม มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ และสุรินทร์ จำนวน 25, 33, 10, 29, 32, 29, 26, 28 และ 26 ตัวอย่าง ตามลำดับ ด้วยเทคนิค nested PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ P1A/P7A, R16F2n/R16R2 และ R16(I)-F1/R16(I)-R1 และตรวจผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส (Figure 2) จำนวน 174 ตัวอย่าง คิดเป็น 73.1% จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 238 ตัวอย่าง (Table 1)

การจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่เป็นตัวแทนกลุ่มเชื้อทั้งหมด 39 ไอโซเลท ในจังหวัดฉะเชิงเทรา กำแพงเพชร ระยอง หนองคาย นครพนม มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ และสุรินทร์ จำนวน 6, 5, 1, 5, 3, 5, 4, 5 และ 5 ตัวอย่าง ตามลำดับ (Table 2) จากมันสำปะหลัง 174 ตัวอย่างที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ

1,100 คู่เบส จากการสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์และดูค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทนกลุ่มเชื้อ 15 กลุ่ม (16Srl-16SrXV) ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าทุกไอโซเลทจัดอยู่ในกลุ่ม 16Srl (*Candidatus Phytoplasma asteris*) (Figure 3) โดยมีค่าความเหมือนที่ 98.0 – 100.0 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในมันสำปะหลังที่แสดงอาการพุ่มแจ้จากประเทศเวียดนามและกัมพูชา จัดอยู่ในกลุ่ม 16Srl เช่นเดียวกัน โดยเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้จากประเทศเวียดนาม (Ass.No. KC295283, JN381548 และ KP119154) มีค่าความเหมือนที่ 91.1 – 100 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพุ่มแจ้จากประเทศกัมพูชา (Ass.No.KJ210318, KJ210319 และ KJ210312) มีค่าความเหมือนที่ 99.8 เปอร์เซ็นต์ (Figure 3) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังสายพันธุ์อื่นในประเทศไทยเวียดนาม และประเทศกัมพูชาที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16Srl เช่นเดียวกัน (Alvarez *et al.*, 2014; Hoat *et al.*, 2015) โดยแต่ละตัวอย่างมีองค์ประกอบของไนโตรเจนเบสชนิด guanine และ cytosine (G+C content) ปริมาณต่ำประมาณ 18 – 28 เปอร์เซ็นต์

สรุป

การศึกษาครั้งนี้เป็นรายงานแรกของประเทศไทยที่ยืนยันการพบเชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังที่แสดงอาการพุ่มแจ้โดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล และเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยการศึกษาตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการพุ่มแจ้ 238 ตัวอย่าง จากจังหวัดฉะเชิงเทรา กำแพงเพชร ระยอง หนองคาย นครพนม มุกดาหาร บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ และสุรินทร์ นำมาปลูกในโรงเรือนเพื่อสังเกตอาการโรค พบว่าต้นมันสำปะหลังเริ่มแสดงอาการพุ่มแจ้หลังจากปลูกประมาณ 3 เดือน และตรวจพบเชื้อไฟโตพลาสมาใน sieve elements บริเวณท่ออาหารของเนื้อเยื่อใบมันสำปะหลังไอโซเลท CPCS4-1 ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน และจากการศึกษาด้วยเทคนิค nested PCR พบแถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส จำนวน 174 ตัวอย่าง คิดเป็น 73.1% ผลการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA กับเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นตัวแทนกลุ่มเชื้อ 15 กลุ่ม พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาที่จำแนกได้มีความสัมพันธ์กับลักษณะอาการพุ่มแจ้ที่พบในมันสำปะหลัง เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับ

Table 1 Number of cassava witches' broom phytoplasmas positive detected samples by nested PCR technique with 16S rRNA gene specific primers

Provinces	Total number of collected samples/ Province	Number of positive detected samples	Percentage (%) of positive detected samples
Chachoengsao	25	6	24.0
Kamphaeng Phet	33	21	63.6
Rayong	10	8	80.0
Nong Khai	29	29	100.0
Nakhon Phanom	32	32	100.0
Mukdahan	29	28	96.6
Buriram	26	20	76.9
Sisaket	28	14	50.0
Surin	26	16	61.5
Total	238	174	73.1

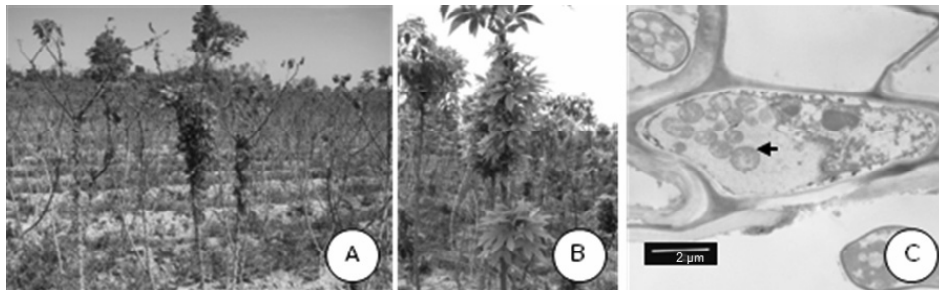


Figure 1 The Cassava witches' broom (CWB) disease is distributed throughout cassava producing areas (A). The infected cassavas appeared dwarfism, an exaggerated proliferation of buds, many sprouts on short internodes of branches and small leaves (B). Transmission electron microscopy (TEM) revealed the presence of CWB phytoplasma in the phloem tissue of infected cassava leaves (C)

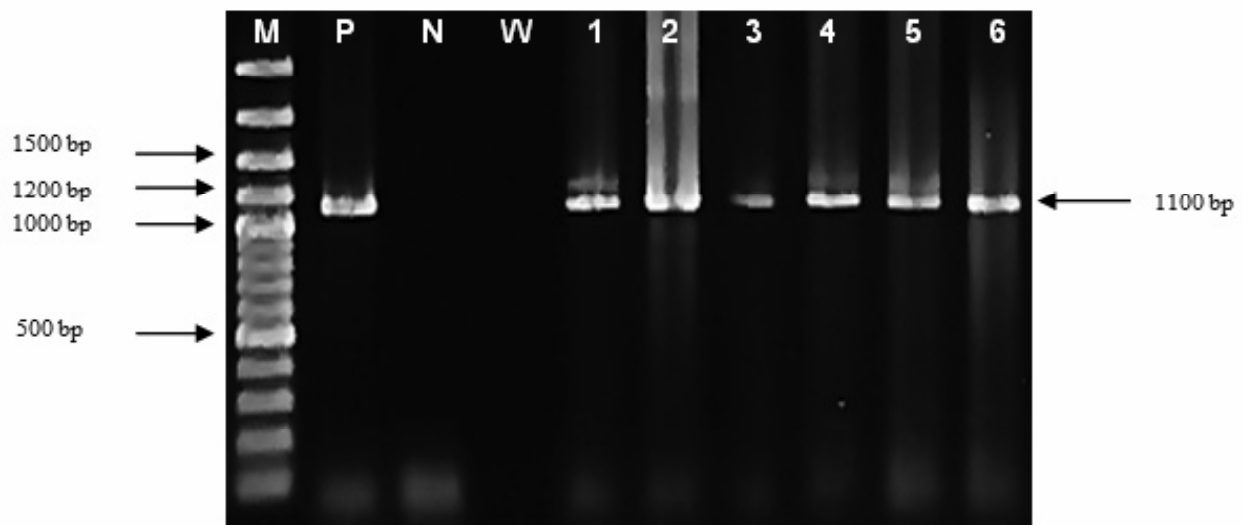


Figure 2 Amplification of the 16S rRNA gene showed a fragment of about 1100 bp in size by nested PCR with specific primers R16(I)-F1/ R16(I)-R1. Lane M: 100 bp DNA ladder plus; lane P: positive control (Infected cassava plant); lane N: negative control (healthy sample); lane W: non template control (water); Lanes 1 – 6: the collected cassava samples from Nong Khai showed CWB symptoms, CPNK1-1 (1), CPNK1-2 (2), CPNK1-3 (3), CPNK1-4 (4), CPNK1-5 (5) and CPNK1-6 (6).

Table 2 Results of classification of cassava witches' broom phytoplasma by comparison of 16S rRNA gene sequences

Provinces	Number of isolates	Isolate	Group/Acc.no.
Chachoengsao	6	CPCS 2-1	16Srl
		CPCS 2-2	16Srl (KP054297)
		CPCS 2-4	16Srl
		CPCS 2-6	16Srl (KP054298)
		CPCS 3-5	16Srl (KP054299)
		CPCS 4-1	16Srl (KP054300)
Kamphaeng Phet	5	CPKP 1-3	16Srl
		CPKP 3-3	16Srl
		CPKP 4-3	16Srl
		CPKP 5-4	16Srl
		CPKP 6-3	16Srl
Rayong	1	CPRY13-2	16Srl
Nong Khai	5	CPNK 1-4	16Srl
		CPNK 2-4	16Srl
		CPNK 3-3	16Srl
		CPNK 4-1	16Srl
		CPNK 5-1	16Srl
Nakhon Phanom	3	CPPN 2-1	16Srl
		CPPN 3-1	16Srl
		CPPN 4-1	16Srl
Mukdahan	5	CPMH 1-4	16Srl
		CPMH 2-5	16Srl
		CPMH 3-1	16Srl
		CPMH 4-3	16Srl
		CPMH 5-2	16Srl
Buriram	4	CPBR1-5	16Srl
		CPBR2-4	16Srl
		CPBR3-1	16Srl
		CPBR5-4	16Srl

Table 2 (Continued)

Provinces	Number of isolates	Isolate	Group
Sisaket	5	CPSS1-1	16Srl
		CPSS2-3	16Srl
		CPSS3-5	16Srl
		CPSS4-2	16Srl
		CPSS5-3	16Srl
Surin	5	CPSR1-4	16Srl
		CPSR2-4	16Srl
		CPSR3-2	16Srl
		CPSR4-5	16Srl
		CPSR5-5	16Srl
Total	39	-	-

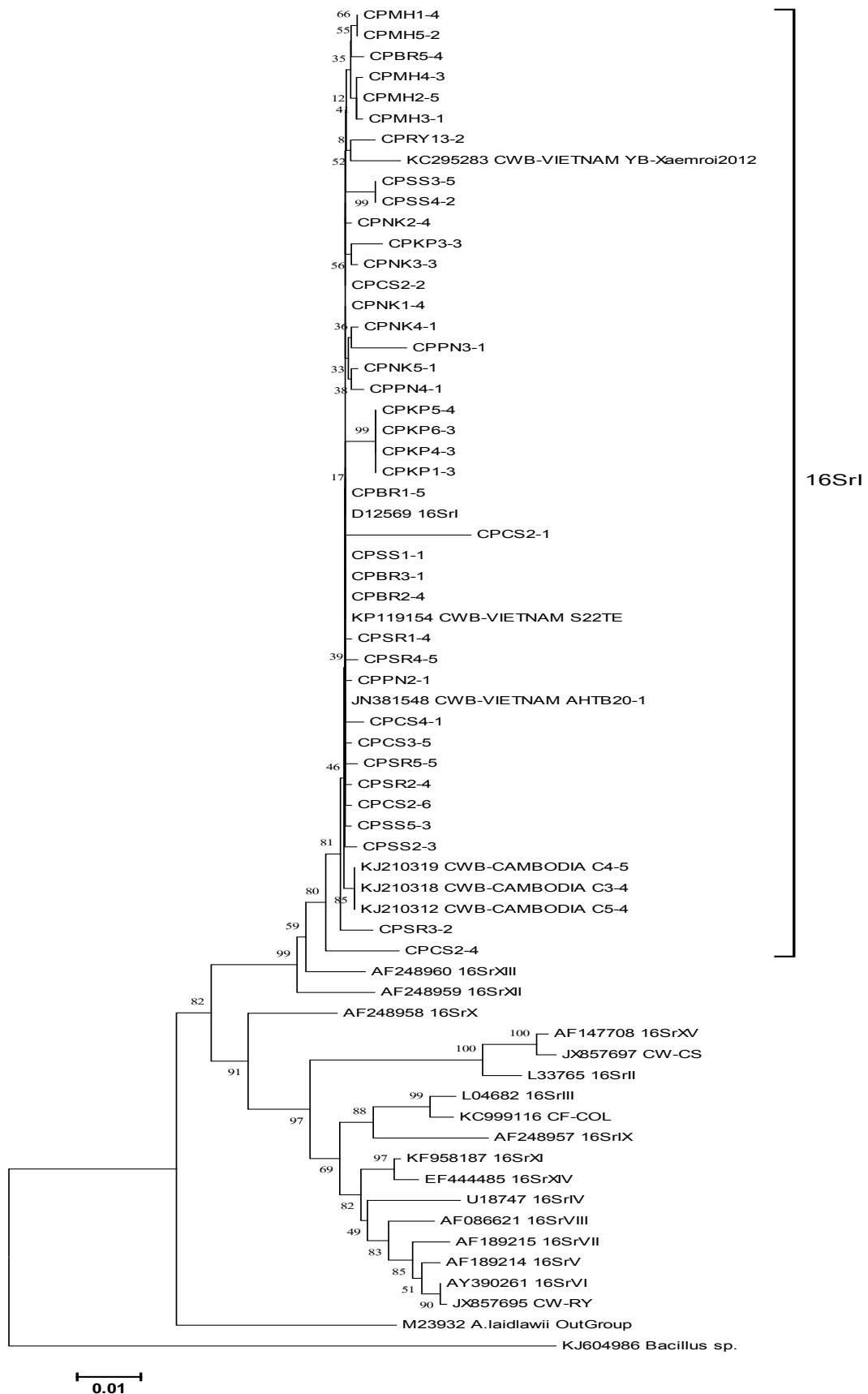


Figure 3 Phylogenetic tree representing 16S rRNA gene sequences derived from CWB phytoplasma found in this work compared with CWB phytoplasma strains from Vietnam (CW-VN), 15 groups of phytoplasma strains (16SrI-16SrXV groups) from the GenBank database, *Achole plasma laidlawii* and *Bacillus sp.* were used as the outgroup by neighbor-joining method.

เชื้อไฟโตพลาสมาในมันสำปะหลังที่แสดงอาการโรคพุ่มแจ้ที่มีรายงานในประเทศเวียดนามและกัมพูชา และจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI (*Candidatus Phytoplasma asteris*) โดยมีความเหมือนที่ 98.0 – 100.0 เปอร์เซ็นต์

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่สนับสนุน ห้องปฏิบัติการ เครื่องมือทดลอง และโรงเรียนปลูกพืช

เอกสารอ้างอิง

- Alvarez, E., J.F. Mejia, G.A. Llano, J.B. Loke, A. Calari, B. Duduk and A. Bertaccini. 2009. Characterization of a phytoplasma associated with frog skin disease in cassava. *Plant Dis.* 93: 1139 – 1145.
- Alvarez, E., J.M. Pardo, J.F. Mejia, A. Bertaccini, N.D. Thanh and T.X. Hoat. 2013. Detection and identification of '*Candidatus Phytoplasma asteris*'-related phytoplasmas associated with a witches' broom disease of cassava in Vietnam. *Phytopathogenic Mollicutes.* 3(2): 77 – 81.
- Alvarez, E., J.M. Pardo and M.J. Truke. 2014. Detection and identification of '*Candidatus Phytoplasma asteris*'- Related phytoplasma associated with a witches' broom disease of cassava in Cambodia. In: APS-CPS Joint meeting. August 9-13, 2014. Minneapolis, Minnesota Minneapolis, MN, USA. Vol. 104 (supplement3,) No.11 S3.7.
- Gundersen, D.E. and I.-M. Lee. 1996. Ultra-sensitive detection of phytoplasma by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopath. Medit.* 35: 114 – 151.
- Hoat, T.X., M.V. Quan, D.T.L. Anh, N.N. Cuong, P.T. Vuong, E. Alvarez, T.T. D. Nguyen, K. Wyckhuys, S. Paltrinieri, J.M. Pardo, J.F. Mejie, N.D. Thanh, M. Dickinson, C.A. Duong, N.C. Kumasinghe and A. Bertaccini. 2015. Phytoplasma disease on major crops in Vietnam. *Phytopathogenic Mollicutes.* 5 (1-Supplement): S69 - S70.
- 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.
- Lee, I.-M., R.W. Hammond, R.E. Davis and D.E. Gunderson. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S

- rRNA for classification and identification of mycoplasma-like organism. *Phytopath.* 83: 834 – 842.
- Lee, I.-M., D.E. Gundersen, R.W. Hammond, and R.E. Davis. 1994. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopath.* 84 : 559 – 566.
- Lee, I.M., D.E. Gundersen-Rindal, R.E. Davis and I.M. Bartoszyk. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1153 – 1169.
- Lee, I.-M., D. E. Gundersen-Rindal, R. E. Davis, K.D. Bottner, C. Marcone and E. Seemuller. 2004. '*Candidatus* Phytoplasma asteris' a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases. *Int. of Syst. Evol. Microbiol.* 54: 1037 – 1048.
- Namba, S., H. Oyaizu, S. Kato, S. Iwanami and T. Tsuchizaki. 1993. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 461–467.
- New Agriculturist. 2014. Witches' broom - a curse on cassava. Available Source: <http://www.new-ag.info/en/focus/focusItem.php?a=3184>. October 20, 2014.
- Office of Agricultural Economics. 2014. Annual Report 2014. Office of Agricultural Economics, Ministry of Agriculture and Cooperatives. Bangkok. 154 p. (in Thai)
- Reddy, P.P. 2015. Plant protection in tropical root and tuber crops. Springer India. 336 p.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406 – 425.
- Spurr, A.R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26: 31 – 43.