

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาในใบอ้อยโดยใช้เทคนิค nested-PCR ร่วมกับสีย้อมเรืองแสง

Development of Diagnostic Method for Phytoplasma in Sugarcane Leaves Using Nested-PCR Technique Combine with Fluorescent Dyes

นพรัตน์ อินธา^{1*} และนุชนาฏ ภักดี¹Nopparat Intha^{1*} and Nutchanat Phakdee¹

Received date: 19 พ.ย. 67 Revised date: 5 มี.ค. 68 Accepted date: 25 มี.ค. 68

DOI: <https://doi.org/10.55003/kmaj.2025.265163>

บทคัดย่อ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นหนึ่งในพืชที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลรายใหญ่เป็นอันดับสองของโลก อย่างไรก็ตาม ปัญหาหลักของการผลิตอ้อย คือ โรคใบขาวของอ้อย (Sugarcane white leaf disease; SCWL) ซึ่งมีเชื้อไฟโตพลาสมา (Phytoplasma) ที่เป็นสาเหตุติดมากับท่อนพันธุ์อ้อยที่ใช้ในการขยายพันธุ์ ทำให้อ้อยแคระ ใบสีขาว และผลผลิตต่ำ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยไฟโตพลาสมาอย่างรวดเร็วโดยใช้เทคนิค nested-PCR และใช้สีย้อมเรืองแสงในการตรวจสอบผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ ผลการทดลองพบว่า ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ รอบที่ 1 โดยใช้ไพรเมอร์ MLO-X และ MLO-Y ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ขนาด 714 bp ในอ้อย SCWL แต่ไม่พบในอ้อยปลอดโรค ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ รอบที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ P1 และ P2 ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ จำนวน 4 แถบ ขนาด 714, 616, 302 และ 204 คู่เบส ในอ้อย SCWL แต่ไม่พบในอ้อยปลอดโรค เมื่อนำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ รอบที่ 2 มาเติมสีย้อมเรืองแสง พบว่า เกิดการเรืองแสงภายใต้แสง UV ในหลอดทดลองของอ้อย SCWL แต่ไม่พบการเรืองแสงในอ้อยปลอดโรค ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเทคนิคที่พัฒนาขึ้นนี้มีความแม่นยำ และสามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบผลผลิต nested-PCR ได้

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ ไพรเมอร์ โรคใบขาวของอ้อย

Abstract

Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) is an important field crop of Thailand. Thailand is the second largest sugar exporter in the world. However, the main problem in sugarcane production is sugarcane white leaf disease (SCWL), which is caused by Phytoplasma transmitted through the seed cane that is used for propagation. This disease causes stunted sugarcane, white leaves, and low yields. This research aimed to develop a rapid diagnostic method for phytoplasmas using the nested-polymerase chain reaction (PCR) technique and using fluorescent dye to detect the PCR products. The results showed that the 1st PCR with MLO-X and MLO-Y primers produced a single DNA band was 714 bp in SCWL but not in disease-free sugarcane. The 2nd PCR with P1 and P2 primers produced four DNA bands 714, 616, 302 and 204 bp in SCWL but not in disease-free sugarcane. The 2nd PCR products, which was added with a fluorescent dye, was found that fluorescence glow under UV light in SCWL tubes but not in disease-free sugarcane. The results indicate that the developed technique is accurate and can reduce the time for verifying nested-PCR products.

Keywords: DNA, polymerase chain reaction, primer, sugarcane white leaf disease

คำนำ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) จัดเป็นพืชที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมน้ำตาล และสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้ เช่น กระดาษ พลาสติก เอทานอล และอาหารสัตว์ ในปีการผลิต 2566/2567 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมด 11,125,480 ไร่ (Office Of the Cane and Sugar Board, 2024) อย่างไรก็ตาม ในการเพาะปลูกอ้อยมักประสบปัญหาการระบาดของโรคพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคใบขาวที่สร้างความเสียหายอย่างรุนแรง ส่งผลให้รายได้ของเกษตรกรผู้ปลูกอ้อยลดลง (Sroykaew et al., 2018) โรคใบขาว (sugarcane white leaf disease; SCWL) เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไฟโตพลาสมา (Kirdat et al., 2021) สามารถสร้างความเสียหายต่อผลผลิตอ้อยตั้งแต่ 5 – 20 % หรือสูงถึง

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

¹ Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000

* Corresponding author: nopparati@nu.ac.th

100 % ในรุ่นอ้อยตอ (Nasare et al., 2007) หรือคิดเป็นมูลค่าประมาณ 30–40 ล้านบาทต่อไร่ต่อปี (Hanboonsong et al., 2016) โรคใบขาวพบครั้งแรกในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2497 โดยพบการระบาดเป็นบริเวณแคบ ๆ ในอำเภอเกาะคา จังหวัดลำปาง เชื้อไฟโตพลาสมาอาศัยอยู่ในท่ออาหารของอ้อย และสามารถถ่ายทอดไปยังต้นพันธุ์ของอ้อยได้ เมื่อเกษตรกรนำต้นพันธุ์ที่มีเชื้อไฟโตพลาสมาไปปลูก จะทำให้เกิดการแพร่กระจายและระบาดไปยังพื้นที่อื่น ๆ จนกระทั่งในปีการผลิต 2505/2506 พบการระบาดเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า ทำให้ผลผลิตอ้อยลดลงมากกว่า 50% ต่อมาในปีการผลิต 2554/2555 มีพื้นที่การระบาดเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 170,000 ไร่ ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลทรายของประเทศไทยไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาท (Hamarn, 2017) โรคใบขาวนี้สามารถเกิดได้ทุกระยะการเจริญเติบโตของอ้อย มีลักษณะอาการ ได้แก่ ใบเหลืองซีดจนขาวเนื่องจากไฟโตพลาสมาทำลายคลอโรพลาสต์ในใบ อ้อยที่เป็นโรครุนแรงจะแตกต่าข้างและหน่อมากกว่าปกติ หน่อมีขนาดเล็กเหมือนหญ้าสีขาวยาว ไม่เจริญเติบโตทำให้ไม่มีลำอ้อยให้เก็บเกี่ยวได้ ความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ อายุของอ้อย ความแข็งแรงของพันธุ์อ้อย ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย ปริมาณธาตุอาหารในดิน อุณหภูมิและสภาพภูมิอากาศ (Hamarn, 2017)

การตรวจวินิจฉัยไฟโตพลาสมาสามารถทำได้โดยใช้เทคนิค DNA hybridization (Webb et al., 1998) ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Kavakita et al., 2000) ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (Polymerase chain reaction, PCR) (Smart et al., 1996) และ nested-PCR (Hanboonsong et al., 2005) nested-PCR เป็นเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบซ้อน 2 รอบ ใช้ไพรเมอร์จำนวน 2 คู่ โดยรอบที่ 1 จะใช้ไพรเมอร์คู่หนึ่งเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีขนาดใหญ่ โดยใช้จันนิมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบอ้อยเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ จากนั้น ทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์รอบที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์อีกคู่หนึ่งเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่มีตำแหน่งจำเพาะอยู่บนผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์รอบที่ 1 โดยใช้ผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์รอบที่ 1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (Shen, 2019) เทคนิคนี้จึงมีความไวและความจำเพาะสูงกว่าปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์แบบธรรมดา และตรวจสอบผลด้วยวิธี gel electrophoresis (Pessoa et al., 2024) สีย้อมเรืองแสง (fluorescent dye) เป็นสารประกอบทางเคมี เมื่อเติมลงในผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์จะแทรกตัวอยู่ระหว่างดีเอ็นเอสายคู่ และจะเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง (Stockert and Blázquez-Castro, 2017; Chinnappan et al., 2019; Intha et al., 2021)

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้พัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาในใบอ้อยโดยเติมสีย้อมเรืองแสง (fluorescent dye) ในผลผลิต nested-PCR เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่รวดเร็ว ลดขั้นตอนและอุปกรณ์ให้น้อยกว่าวิธีเดิมและยังคงความถูกต้องสามารถนำไปใช้คัดกรองพันธุ์อ้อยที่ปราศจากไฟโตพลาสมาเพื่อนำไปใช้ขยายพันธุ์ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเตรียมตัวอย่างพืช

นำใบอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (KK3) ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง (*in vitro* sugarcane) จากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก มาใช้เป็นตัวอย่างพืชที่ปราศจากเชื้อไฟโตพลาสมา (ชุดควบคุมเชิงลบ : negative control)

นำใบอ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 (KK3) ที่แสดงอาการของโรคใบขาว อ้อยตอ 1 อายุ 2 เดือน จากแปลงปลูกอ้อยในตำบลวังชะโอน อำเภอบึงสามัคคี จังหวัดกำแพงเพชร จำนวน 7 ตัวอย่าง (7 กอ) (Figure 1) มาใช้เป็นตัวอย่างพืชที่มีเชื้อไฟโตพลาสมา (positive control)

วิธีสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ้อย

สกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากใบอ้อยด้วยวิธี Cetyl-trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) ดัดแปลงจาก Doyle and Doyle (1990) นำจีโนมิกดีเอ็นเอมาตรวจสอบปริมาณและคุณภาพด้วยเทคนิค gel electrophoresis บนที่ภาพด้วย SmartView Pro 1200 Imager System (Scientific Biotech, Taiwan) และเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอกับ DNA Ladder RTU (Genedirex[®], Taiwan) จากนั้น เจือจางจีโนมิกดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้นประมาณ 50 ng/μL โดยใช้ elution buffer และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป



Figure 1 Two-month-old sugarcanes cv. Khon Kaen 3 (KK3) showing symptoms of sugarcane white leaf disease (SCWL).

การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี nested-PCR

เตรียมไพรเมอร์คู่ที่ 1 และ 2 ให้มีความเข้มข้น 1 μM เพื่อใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction; PCR) โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ (Hanboonsong et al., 2005) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ไพรเมอร์คู่ที่ 1. MLO-X: 5' GTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGC 3'

MLO-Y: 5' GTGCAAGGCATCCACTGTATGCC 3'

ไพรเมอร์คู่ที่ 2. P1: 5' GTCGTAACAAGGTATCCCTACCGG 3'

P2: 5' GGTGGGCCTAAATGGACTTGAACC 3'

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ รอบที่ 1 ประกอบด้วยจิโนมิกดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 μL ไพรเมอร์ MLO-X และ MLO-Y ปริมาตรชนิดละ 1 μL , One PCRTM Plus (Genedirex[®], Taiwan) ปริมาตร 8 μL และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 20 μL เริ่มต้นปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที, ตามด้วยอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และสุดท้ายอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที นำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ ไปใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ รอบที่ 2

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ รอบที่ 2 ประกอบด้วยผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ รอบที่ 1 ปริมาตร 3 μL ไพรเมอร์ P1 และ P2 ปริมาตรชนิดละ 1 μL , One PCRTM Plus (Genedirex[®], Taiwan) ปริมาตร 8 μL และเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ครบปริมาตร 20 μL เริ่มต้นปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 2 นาที, ตามด้วยอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ และสุดท้ายอุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้สีย้อมเรืองแสง

นำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ รอบที่ 2 มาเติมสีย้อมเรืองแสง (PCR-fluorescent) ปริมาตร 3 μL (1 μL of RedSafeTM Nucleic Acid Staining Solution [iNtRON Biotechnology; South Korea] : 99 μL of water) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้น ตรวจสอบผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) หลอด PCR ของอ้อยที่แสดงอาการของโรคใบขาวจะเรืองแสงภายใต้แสง UV ในขณะที่หลอด PCR ของอ้อยที่ปราศจากไฟโตพลาสมาจะไม่เรืองแสงภายใต้แสง UV

การตรวจสอบยืนยันผลการวินิจฉัย

นำผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ รอบที่ 1 และ 2 มาตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1.2% agarose กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ และถ่ายภาพด้วย SmartView Pro 1200 Imager System (Scientific Biotech, Taiwan)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส รอบที่ 1 ด้วยไพรเมอร์ MLO-X และ Y พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ขนาดประมาณ 714 คู่เบส ในเลน 1 – 7 (อ้อยตัวอย่างที่ 1 – 7 แสดงอาการของโรคใบขาว) ในขณะที่เลน 8 – 14 (อ้อยตัวอย่างที่ 8 – 14 ปราศจากเชื้อไฟโตพลาสมา) และเลน N (ไม่เติมจีโนมิกดีเอ็นเอ) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (Figure 2)

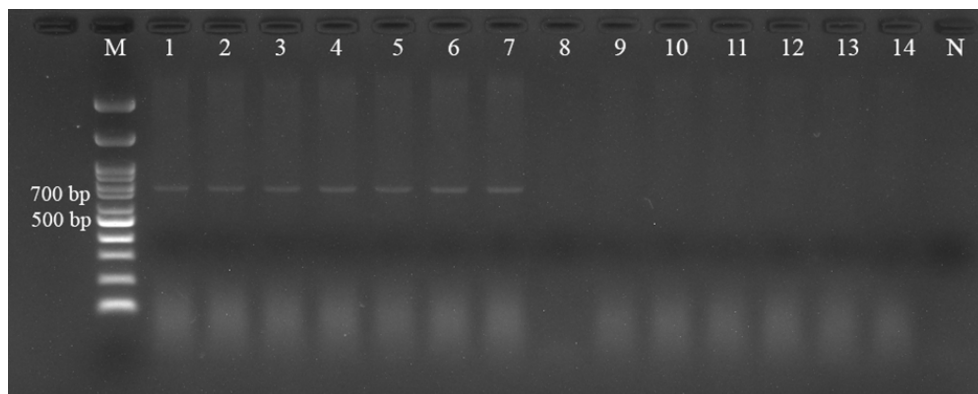


Figure 2 PCR results of MLO (X+Y) primers on SCWL diagnostic (the 1st PCR). The 714 bp DNA band of SCWL was shown in lanes 1 – 7 (SCWL). There was no corresponding DNA band in lanes 8 – 14 (*in vitro* sugarcane) and Lane N (negative control without genomic DNA). Lane M was a 100 bp DNA ladder.

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส รอบที่ 2 ด้วยไพรเมอร์ P1 และ P2 และใช้ผลผลิตจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส รอบที่ 1 เป็นดีเอ็นเอแม่แบบ พบว่า ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จำนวน 4 แถบ มีขนาด 714, 616, 302 และ 204 คู่เบส ในเลน 1 – 7 (อ้อยตัวอย่างที่ 1 – 7 แสดงอาการของโรคใบขาว) ในขณะที่เลน 8 – 14 (อ้อยตัวอย่างที่ 8 – 14 ปราศจากเชื้อไฟโตพลาสมา) และเลน N (ไม่เติมจีโนมิกดีเอ็นเอ) ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (Figure 3) ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การตรวจวินิจฉัยไฟโตพลาสมาในใบอ้อยด้วย nested-PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน ในอ้อยตัวอย่างที่ 1 – 7 ที่แสดงอาการของโรคใบขาว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอ้อยที่เพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อ (*in vitro* sugarcane) สอดคล้องกับ Hanboonsong et al. (2005) ที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จำนวน 1 แถบ ขนาด 210 คู่เบส ในการตรวจสอบไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวของอ้อยในเพลี้ยจักจั่น แต่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งมากยิ่งขึ้น จึงปรากฏแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจน จำนวน 4 แถบ

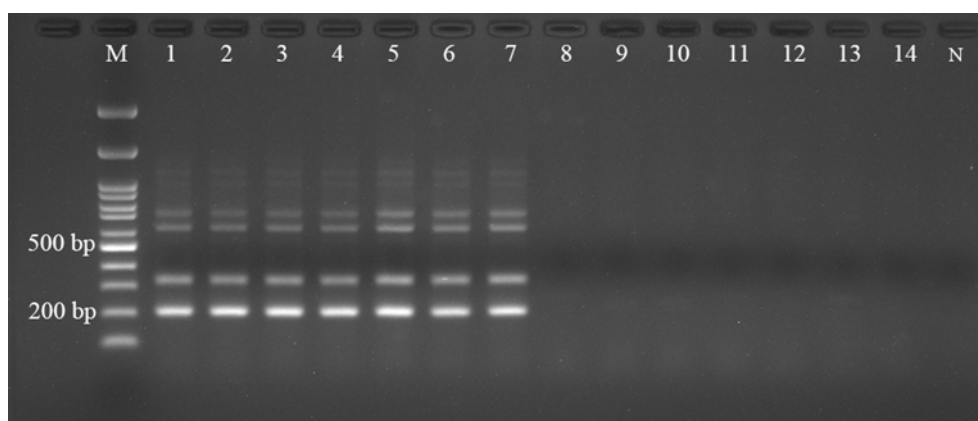


Figure 3 PCR results of P1 and P2 primers on SCWL diagnostic (the 2nd PCR). The 714, 616, 302 and 204 bp DNA bands of SCWL were shown in lanes 1 – 7 (SCWL). There was no corresponding to SCWL DNA band in the Lanes 8 – 14 (*in vitro* sugarcane) and Lane N (negative control without genomic DNA). Lane M was a 100 bp DNA ladder.

ผลการวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ Accession: CU469464.1 จากฐานข้อมูลออนไลน์ National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) พบว่า ตำแหน่งที่ไพรเมอร์จับกับดีเอ็นเอแม่แบบ ดัง Figure 4 และขนาดของผลผลิตปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส ดัง Table 1 ทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอ จำนวน 4 แถบ มีขนาด ดังนี้

- 1) แถบดีเอ็นเอ ขนาด 714 คู่เบส เกิดจากไพรเมอร์ MLO-X และ Y ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส รอบที่ 1
- 2) แถบดีเอ็นเอ ขนาด 616 คู่เบส เกิดจากไพรเมอร์ MLO-X ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส รอบที่ 1 และไพรเมอร์ P2
- 3) แถบดีเอ็นเอ ขนาด 302 คู่เบส เกิดจากไพรเมอร์ P1 และไพรเมอร์ MLO-Y หลงเหลือจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส รอบที่ 1
- 4) แถบดีเอ็นเอ ขนาด 204 คู่เบส เกิดจากไพรเมอร์ P1 และ P2

ผลผลิต nested-PCR ของไพรเมอร์คู่ที่ 1 (MLO-X และ Y) ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 714 คู่เบส ในอ้อยที่แสดงอาการของโรคใบขาว แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในอ้อยที่ปราศจากเชื้อไฟโตพลาสมา (Figure 2) ได้อย่างถูกต้องตั้งแต่ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส รอบที่ 1 นอกจากนี้ ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส รอบที่ 2 ยังปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 714, 616, 302 และ 204 คู่เบส แตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างอ้อยที่แสดงอาการของโรคใบขาวกับอ้อยที่ปราศจากเชื้อไฟโตพลาสมา (Figure 3) ซึ่งเป็นผลมาจากไพรเมอร์ MLO-X และ Y ที่หลงเหลือจากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ส รอบที่ 1 และเกิดการเข้าคู่กันใหม่กับ ไพรเมอร์ P1 และ P2 ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สรอบที่ 2 รวมเป็นไพรเมอร์ จำนวน 4 ชนิด ใน 1 ปฏิกิริยา (Multiplex PCR) ทำให้เกิดรูปแบบการเข้าคู่กันใหม่ของไพรเมอร์ จำนวน 4 แบบ ดังแสดงตำแหน่งและขนาดใน Figure 4 และ Table 1

451,290 bp

ACTCCGCACAAGCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACACGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACAT
 ACTCTGCAAAGCTATAGAAATATAGTGGAGGTTATCAGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
 GTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCGCTAGTTACCATCATTTAGTTG
 GGCACTTTAGTGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGATTACGTCAAATCATCATGCCCCCTT
 ATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGAGTAGCTGAAGCGTGAGTTTTTAGCAAAT
 CTCAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGCTGCAACTCGACTTCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT
 CGCGAATCAGCATGTCGTGGTGAATACGTCTCGGGGTTTGTACACACCGCCCGTCAAACCATGAAAGTT
 GACAATACTCGAAACAGTAGCCTAAGTTGCAAAAAGAGGGAAGTGTCTAAGGTAGGGTCGATGATTGGGG
 TTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACCGGAAGGTGGGGATGGATCACCTCCTTTCTAAGGAAAATATCATC
 TTCAGTTGTGAAAGACTTAAAAAGTTTTTTATTTTTTAAGATAAAAAATAAATAATGGTCCGGGGCCTAT
 AGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTGATAAGCGTGAGGTGATGGTTTCGAGTCCATTTAGGCCACCAA
 AGTATTTATCTTAAGAAAACAAGCTCTTTGAAAAGTAGATAAATTAAGGTTAAAGAATTGAAGAAATTA
 AGGGCGCACAGTGGATGCCTTGGCACTAAGAGACGATGAAGGACGCAATTAACGGCGAAACGTCACGGGG
 AGCTGTACATAAGTGAAGATCCGTGGATTTCCGAATGGGGCAACCCGCTATGTTAAAAACATTAGCATCT
 TTGTTTTATAACAAAGAAGAAAACGCAGTGAAGTGAATATCTAAGTAAGTGCAGGAACAGAAAGTAATA

452,340 bp

Figure 4 Nucleotide sequences of *Candidatus Phytoplasma mali* (accession CU469464.1 on 451,290 – 452,340 bp) from National Center for Biotechnology Information. Bold capital letters with underline indicated the sequence and specific site of each primer. Bold capital letters without underline indicated nucleotides that does not match the primer.

Table 1 Primers used in nested-PCR and expected size of multiplex PCR products

No.	Primers (F)	Primers (R)	Expected size
1	MLO-X	MLO-Y	714 bp
2	MLO-X	P2	616 bp
3	P1	MLO-Y	302 bp
4	P1	P2	204 bp

ผลการเติมสีย้อมเรืองแสงในผลผลิต nested-PCR พบว่า หลอดทดลองที่ 1 – 7 (อ้อยตัวอย่างที่ 1 – 7 แสดงอาการของโรคใบขาว) เกิดการเรืองแสงภายใต้แสง UV ในขณะที่หลอดทดลอง 8 – 14 (อ้อยตัวอย่างที่ 8 – 14 ปราศจากเชื้อไฟโตพลาสมา) และ N (ไม่เติมจีโนมิกดีเอ็นเอ) ไม่เกิดการเรืองแสงภายใต้แสง UV (Figure 5) สอดคล้องกับ Figure 3 ที่พบแถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน จำนวน 4 แถบ ในเลน 1 – 7 แต่ไม่พบแถบดีเอ็นเอในเลน 8 – 14 และเลน N

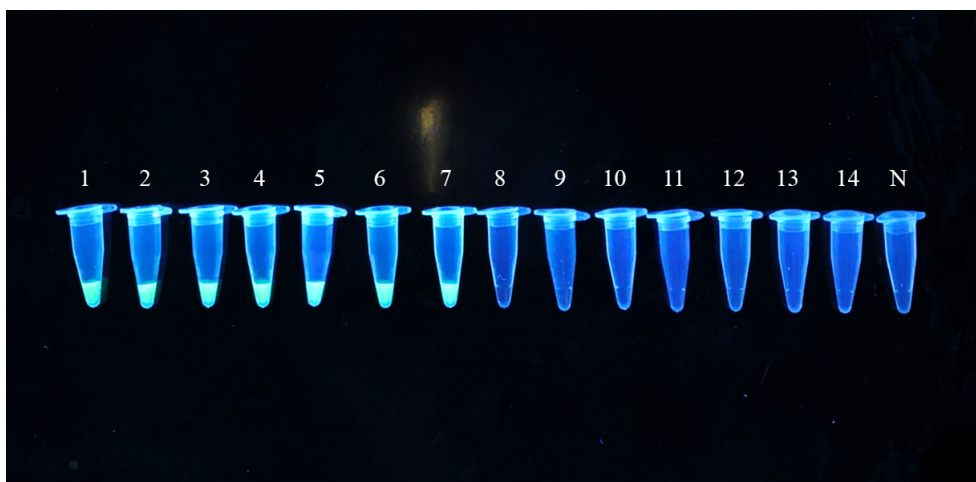


Figure 5 The fluorescence detection of nested-PCR results on SCWL diagnostic. The tubes 1 – 7 (SCWL) emitted green fluorescence under UV light but the tube 8 – 14 (*in vitro* sugarcane) and N (negative control without genomic DNA) did not emit.

เทคนิค PCR-fluorescent เผยแพร่ครั้งแรกในปี 2564 ใช้ในการตรวจสอบเพศอินทผลัม จะเติมสีย้อมเรืองแสงลงในหลอด PCR หลังจากปฏิกิริยาเสร็จสิ้น แทนการตรวจสอบผลด้วย electrophoresis ทำให้ลดระยะเวลาในการตรวจอย่างน้อย 40 นาที จึงเป็นเทคนิคที่รวดเร็วกว่าเทคนิคดั้งเดิม (Intha et al., 2021) จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีผลงานวิจัยการใช้สีย้อมเรืองแสงในการตรวจวินิจฉัยโรคใบขาวในอ้อย การตรวจสอบผลการทดลองด้วยวิธีเติมสีย้อมเรืองแสง จึงเหมาะสำหรับการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอภายในหลอดทดลองที่แสดงผลเป็นบวก (positive) หรือ ลบ (negative) หากมีดีเอ็นเอเกิดขึ้นในหลอดทดลองจำนวนมาก การเรืองแสงก็จะชัดเจนมากยิ่งขึ้น สีย้อมเรืองแสง (fluorescent dye) ส่วนมากถูกใช้ในการติดฉลากกับโพรบ (fluorophore-labeled probe) (Melinger et al., 2016) สำหรับ real-time PCR (Wilson et al., 2011) สีย้อมเรืองแสงเป็นสารประกอบทางสารเคมีจะเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง (Stockert and Blázquez-Castro, 2017; Chinnappan et al., 2019; Intha et al., 2021) สีย้อมเรืองแสงมีบทบาทสำคัญในการศึกษารดนิวคลีอิก มักถูกใช้เป็น reporter ร่วมกับแสง UV ตัวอย่างเช่น RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, USA) ดูดกลืนแสงที่มีความยาว 514 นาโนเมตร แล้วเรืองแสงที่มีความยาว 537 นาโนเมตร ในขณะที่ SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific, Australia) ดูดกลืนแสงที่มีความยาว 497 นาโนเมตร แล้วเรืองแสงที่มีความยาว 520 นาโนเมตร (Intha et al., 2021) เมื่อเติมสีย้อมเรืองแสงลงในผลผลิตปฏิกิริยาถูกใช้เพื่อลิเมอเรส (PCR product) สีย้อมเรืองแสงจะแทรกตัวเข้าไประหว่างดีเอ็นเอสายคู่ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสง UV ก็จะเรืองแสงออกมา หากไม่มีดีเอ็นเอ

สายคู่สารเรืองแสงจะอยู่อย่างอิสระจึงไม่เกิดการเรืองแสงหรือเปล่งแสงที่ความเข้มแสงต่ำ (Zipper et al., 2004; Intha et al., 2021) ด้วยเหตุนี้จึงสามารถตรวจสอบผลได้ด้วยการเรืองแสง (positive) หรือ ไม่เรืองแสง (negative)

ข้อเสนอแนะ ควรทำการศึกษาความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ที่ใช้ใน nested-PCR เพิ่มเติม เช่น เปรียบเทียบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน เปรียบเทียบอุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยา เป็นต้น อีกทั้งยังควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างพืชทดสอบและทำซ้ำ เพื่อยืนยันความแม่นยำของวิธีการตรวจวินิจฉัย

สรุปผลการศึกษา

การพัฒนาเทคนิค nested-PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไฟโตพลาสมาได้อย่างจำเพาะ ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 714, 616, 302 และ 204 คู่เบส แต่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอในตัวอย่างอ้อยปลอดโรค การตรวจสอบผลด้วยสีย้อมเรืองแสง (PCR-fluorescent) พบการเรืองแสงในหลอดทดลองของอ้อยที่มีไฟโตพลาสมาอย่างชัดเจน แต่ไม่พบการเรืองแสงในตัวอย่างอ้อยปลอดโรค เทคนิคที่ผู้วิจัยพัฒนาขึ้นมีความแม่นยำ และสามารถลดระยะเวลาในการตรวจสอบผล nested-PCR ได้

ผลประโยชน์ทับซ้อน

ผู้เขียนขอประกาศว่าบทความนี้ไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอุทยานวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวรที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย และขอขอบพระคุณคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนครุภัณฑ์และสถานที่ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

การมีส่วนร่วมในการเขียนบทความของผู้เขียน

ความคิดริเริ่ม ออกแบบการทดลอง การปฏิบัติการวิจัย เก็บข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูลและเขียนต้นฉบับ: นพรัตน์ อินธา. มีส่วนร่วมในการปฏิบัติการวิจัย เก็บข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูลและเขียนต้นฉบับ: นุชนาฏ ภักดี.

เอกสารอ้างอิง

- Chinnappan, R., Mohammed, R., Yaqinuddin, A., Abu-Salah K., & Zourob, M. (2019). Highly sensitive multiplex detection of microRNA by competitive DNA strand displacement fluorescence assay. *Talanta*, 200(1), 487-493.
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.
- Hamarn, T. (2017). **Management of Sugarcane White Leaf Disease (Report of the Outbreak of Sugarcane White Leaf Disease)**. Office of the Cane and Sugar Board. (in Thai).
- Hanboonsong, Y., Ritthison, W., & Choosai, C. (2005). Molecular detection and transmission of sugarcane white leaf Phytoplasma in leafhoppers. *KKU Research Journal*, 10(1), 13-21. (in Thai).
- Hanboonsong, Y., Wangkeeree, J., Kobori, Y. (2016) Integrated management of vectors of sugarcane white leaf disease in Thailand: an update. In *Proceedings of the 29th International Society of Sugar Cane Technologists*, pp. 1258-1263. Thailand Society of Sugar Cane Technologists.
- Intha, N., Phakdee, N., Tao, R., & Chaiprasart, P. (2021). Single tube amplification and detection of male date palm using polymerase chain reaction and loop-mediated isothermal amplification technique. *Agriculture and Natural Resources*, 55(4), 628-633.
- Kavakita, H., Saiki, T., Mitsuhashi, W., Watanabe, K., & Sato, M. (2000). Identification of mulberry dwarf phytoplasma in the genital and eggs of leafhopper *Hishimonoides sellatiformis*. *Phytopathology*, 90(8), 909-914.
- Kirdat, K., Tiwarekar, B., Thorat, V., Sathe, S., Shouche, Y., & Yadav, A. (2021). *Candidatus* Phytoplasma sacchari, a novel taxon - associated with sugarcane grassy shoot (SCGS) disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(1), 004591.
- Melinger, J. A., Khachatryan, A., Ancona, M. G., Buckhout-White, S., Goldman, E. R., Spillmann, C. M., Medintz I. L., & Cunningham, P. D. (2016). FRET from multiple pathways in fluorophore-labeled DNA. *ACS Photonics*, 3(4), 659-669.
- Nasare, K., Yadav, A., Singh, A. K., Shivasharanappa, K. B., Nerkar, Y. S., & Reddy, V. S. (2007). Molecular and symptom analysis reveal the presence of new phytoplasmas associated with sugarcane grassy shoot disease in India. *Plant Disease*, 91(11), 1413-1418.

- Office of The Cane and Sugar Board. (2024). **Sugarcane Cultivation Situation Report, Production Year 2023/24**. Office of the Cane and Sugar Board. (in Thai).
- Pessoa, F. M. C. d. P., de Oliveira, M. B., Barreto, I. V., Machado, A. K. d. C., Oliveira, D. S. d., Ribeiro, R. M., Medeiros, J. C., Maciel, A. d. R., Silva, F. A. C., Gurgel, L. A., de Albuquerque, K. M. C., Lopes, G. S., Vieira, R. P. G., Arraes, J. A., Alencar Filho, M. S. d., Khayat, A. S., Moraes, M. E. A. d., de Moraes Filho, M. O., & Moreira-Nunes, C. A. (2024). Nested-PCR vs. RT-qPCR: A sensitivity comparison in the detection of genetic alterations in patients with acute leukemias. **DNA**, 4(3), 285-299.
- Shen, C. H. (2019). **Diagnostic Molecular Biology**. Academic Press.
- Smart, C. D., Schneider, B., Blomquist, C., Guerra, L. J., Harrison, N. A., Ahrens, U., Lorenz, K. H., Seemüller, E., & Kirkpatrick, B. C. (1996). Identification of phytoplasma strain-specific PCR primers obtained from 16S/23S rRNA spacer sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, 62(8), 2988-2993.
- Sroykaew, J., Leksakul, K., Boonyawan D., & Akarapisan, A. (2018). Treating white leaf disease in sugarcane cuttings using solution plasma. **Chiang Mai University Journal of Natural Sciences**, 17(1), 61-72.
- Stockert, J. C., & Blázquez-Castro, A. (2017). **Fluorescence Microscopy in Life Sciences**. Bentham Science Publishers.
- Webb, D. R., Bonfiglioli, R. G., Carraro, L., Osler R., & Symons, R. H. (1998). Oligonucleotide as hybridization probes to localize phytoplasmas in host plants and insect vectors. **Phytopathology**, 89(10), 894-901.
- Wilson, P. M., Labonte, M. J., Russell, J., Louie, S., Ghobrial, A. A., & Ladner, R. D. (2011). A novel fluorescence-based assay for the rapid detection and quantification of cellular deoxyribonucleoside triphosphates. **Nucleic Acids Research**, 39(17), e112.
- Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, 32(12), e103.