

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวด้วยวิธี Absolute และ Relative quantification real-time PCR

Determination of Sugarcane White Leaf Phytoplasma Concentration Using Absolute and Relative Quantification Real-time PCR Assays

ธีรวุฒิ วงศ์รัตน์^{1*} และ ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล¹

Theerawut Wongwarat^{1*} and Suchirat Sakuanrungsirikul¹

บทคัดย่อ

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวด้วยการพัฒนาวิธี Absolute และ Relative quantification real-time PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ secA ที่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคใบขาวด้วยพบว่า วิธี absolute quantification มีกราฟมาตรฐานที่ช่วงความน่าเชื่อถือของความเข้มข้น pUC1318-secA ตั้งแต่ 10^{10} - 10^2 copies/25 ng plant DNA มีค่า efficiency (E) เท่ากับ 1.922 การใช้วิธี relative quantification โดยใช้ความเข้มข้น pUC1318-secA ที่ 10^2 copies/25 ng plant DNA เป็นเป้าหมายอ้างอิง พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลใกล้เคียงกัน การทดสอบตัวอย่างใบขาวและใบขาวเขียว ด้วยวิธี Absolute quantification พบปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.54×10^5 - 7.91×10^5 และ 1.2×10^3 - 1.74×10^4 copies/25 ng plant DNA ตามลำดับ ด้วยวิธี Relative quantification พบปริมาณเชื้อเท่ากับ 1.83×10^5 - 8.75×10^6 , 1.77×10^3 - 1.74×10^4 copies/25 ng plant DNA ตามลำดับ แต่ในตัวอย่างใบเขียวได้ปริมาณเชื้อต่ำกว่า 10^2 copies/25 ng plant DNA ซึ่งต่ำกว่าช่วงที่ยอมรับได้ ทั้งนี้หากมีกราฟมาตรฐานแล้ววิธี Absolute quantification สามารถปฏิบัติได้ง่ายกว่าและไม่ซับซ้อน

ABSTRACT

Absolute and relative quantification real-time PCR assays for the specific detection quantification of sugarcane white leaf phytoplasma were established by the aid of secA primer set. The reliability of standard curves for absolute quantification ranging from 10^{10} - 10^2 copies/25 ng plant DNA and a efficiency (E) was 1.922. The pUC1318-secA with 10^2 copies/25 ng plant DNA was used as target/reference calibrator for relative quantification. It was found that the concentration obtained from both assays were not difference. The phytoplasma concentration of white and white-green leaves were estimated at 1.54×10^5 - 7.91×10^5 and 1.2×10^3 - 1.74×10^4 copies/25 ng plant DNA, respectively by absolute quantification and 1.83×10^5 - 8.75×10^6 and 1.77×10^3 - 1.74×10^4 copies/25 ng plant DNA, respectively by relative quantification. While, very low phytoplasma concentration, of less than 10^2 copies/25 ng plant DNA, were measured in green leaves. The absolute quantification was more easily applied and accurately measured the white leaf pathogen concentration than absolute quantification if standard curve is available.

Keyword: sugarcane white leaf phytoplasma, absolute and relative quantification, real-time PCR

* Corresponding author: e-mail address: theerawut_ng@hotmail.com

¹ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น 180 ถ. มิตรภาพ ต. ศิลา อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40000

คำนำ

โรคใบขาวอ้อย (sugarcane white leaf disease) มีสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่มีผนังเซลล์ อาศัยอยู่ในท่อลำเลียงอาหารของพืช มีเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) (Chen, 1978) และ *Yamatotettix flavovitatus* (ยุพา และคณะ, 2548) เป็นแมลงพาหะ ลักษณะการแสดงอาการของโรคใบขาวอ้อยเกิดขึ้นได้กับทุกระยะของการเจริญเติบโต ความรุนแรงของอาการของโรคเกิดจากปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา ความแข็งแรงของต้น อายุที่เริ่มติดเชื้อ และสภาพอากาศ (Marzachi *et al.*, 2004) อาการของโรคจะเห็นเด่นชัดในระยะการแตกหน่อ หน่อจะไม่เจริญเป็นลำอ้อย มีใบเป็นสีขาว หากอาการรุนแรงมากก็จะมีอาการแตกหน่อใบขาวจำนวนมาก และแห้งตายทั้งกอ กรณีอ้อยที่มีเชื้อแฝง จะไม่แสดงอาการและสามารถพัฒนาเป็นลำได้ มีใบสีเขียวปกติ หากนำลำอ้อยเหล่านี้ไปขยายพันธุ์จะมีการแพร่ระบาดของโรคใบขาวอ้อยอย่างกว้างขวาง ซึ่งถ้าหากท่อนพันธุ์มีปริมาณเชื้ออยู่มาก จะแสดงอาการใบขาวหลังการปลูกใหม่ ส่วนต้นที่มีเชื้อในปริมาณน้อย อาจจะไม่แสดงผลผลิตได้ถึงสอง (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2554)

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสามารถทำได้ด้วยเทคนิค conventional PCR (cPCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาในส่วนของยีน 16s-23s rRNA intergenic spacer region เทคนิคนี้คำนวณหาปริมาณเชื้อจากตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบกันระหว่างความเข้มแสงของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน แต่พบปัญหาที่สำคัญคือการเกิดผลลบปลอม (false negative) และให้แถบดีเอ็นเอหลายแถบทำให้ไม่สามารถประเมินปริมาณเชื้อได้ (ศุจิรัตน์, 2556) การใช้ไพรเมอร์ที่จับกับบริเวณส่วนหนึ่งของยีน *secA* ที่ถูกพัฒนาขึ้นให้มีความจำเพาะเจาะจงกับเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อยเท่านั้น สามารถนำมาใช้ในการประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาอย่างคร่าวๆได้เช่นกัน (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556) การนำเทคนิค quantitative real-time PCR (qPCR) มาใช้ในการประเมินปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายมี 2 วิธีได้แก่ 1) absolute quantification และ 2) relative quantification ทั้งสองวิธีอาศัยการตรวจหาสัญญาณเรืองแสงที่แทรกเข้าจับ minor groove ของดีเอ็นเอสายคู่ ด้วยตัวรับสัญญาณแสงที่ติดตั้งอยู่กับเครื่อง real-time PCR ซึ่งสามารถแยกสัญญาณการเรืองแสงที่เกิดจากดีเอ็นเอเป้าหมาย, primer-dimer และ non-specific ได้โดยการเปรียบเทียบค่า T_m และสามารถหาปริมาณดีเอ็นเอตั้งต้นได้จากค่า C_t (threshold cycle) ซึ่งวิธีการนี้นำมาใช้ในการตรวจปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชหลายชนิดเช่น มันฝรั่ง, องุ่น, บัวย, (Crosslin and Vademark., 2006; Hren *et al.*, 2007; Jarusch *et al.*, 2010) งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนาวิธีการประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค qPCR โดยใช้ไพรเมอร์ *secA* เพื่อให้ได้ข้อมูลปริมาณเชื้อที่ถูกต้องและแม่นยำสำหรับใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกท่อนพันธุ์ และการจัดการควบคุมการระบาดของโรคได้

อุปกรณ์และวิธีการ

การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่ออ้อย

เก็บตัวอย่างอ้อยที่มีระดับความรุนแรงของอาการของโรคใบขาวอ้อยต่างกันคือใบขาว ใบเขียวปนขาว ใบเขียว จำนวนอาการละ 10 ตัวอย่าง และในการทดลองนี้ใช้ตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการของโรคใบขาวอ้อยซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นตัวอย่างควบคุม นำตัวอย่างเนื้อเยื่อใบอ้อย 3 กรัมใส่ลงโกร่งแล้วเติมไนโตรเจนเหลวจากนั้นบดให้ละเอียดเป็นผงใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ แล้วสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงวิธีการ

สกัดดีเอ็นเอของ Li and Midmore (1999) จากนั้นตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง nanodrop spectrophotometer (Maestrogen, Taiwan)

การเพิ่มปริมาณยีน secA

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน secA โดยทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SecAfor (5'GTTTTATATGGATGCTAATCGTTTT-3') และ SecArev (5'CTAYTGTTCCTCCTGTAAATTGATC-3') (ศุจิรัตน์ และคณะ, 2556; Sakuanrungrasirikul *et al.*, 2012) โดยมีปริมาตรรวม 15 µl มีความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนผสมดังนี้ 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA); สารต้นแบบดีเอ็นเอ (100 ng/µl) และ 0.5 µM SecAfor/ SecArev และนำไปทำปฏิกิริยาในเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (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 โดยมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายบางส่วนของยีน secA เป็น 275 bp

การโคลนยีน และการสร้างกราฟมาตรฐาน

นำชิ้นดีเอ็นเอของยีน secA มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป GEL/PCR DNA Fragment Extraction Kit (RBCBioscience, Taiwan) จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pUC1318 (RBC TA cloning kit, RBCBioscience, Taiwan) ได้เป็น pUC1318-secA และนำพลาสมิดนี้เข้าสู่ *Escherichia coli* DH5α competent cells (HIT Competent Cells, RBC TA cloning kit, RBCBioscience, Taiwan) คัดเลือกโคโลนีบนอาหารแข็ง blue/white selection ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สกัดพลาสมิด 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)

$$\text{Number of copies} = \frac{[6.022 \times 10^{23} (\text{copy mol}^{-1})] \times [\text{DNA amount (g)}]}{[(\text{DNA length (bp)} \times 650 (\text{g mol}^{-1} \text{ bp}^{-1}))]}$$

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างอ้อย

วิธี Absolute quantification

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดจากใบอ้อยมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีน secA โดยการทำปฏิกิริยา PCR ด้วยไพรเมอร์ SecAfor/SecArev ซึ่งมีส่วนผสมของปฏิกิริยา และขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ ปริมาตรของปฏิกิริยารวม 15 µl มีความเข้มข้นสุดท้ายของส่วนผสมได้แก่ 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 U Taq polymerase (Fermentas, USA), ดีเอ็นเอต้นแบบ (25 ng/µl), 0.5 µM SecAfor/SecArev และ 0.075 µM 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 วิเคราะห์และคำนวณปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยโปรแกรมจากเครื่อง 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* (AB249870) และ *S. officinarum* (AJ876760) โดยได้เป็นไพรเมอร์ 18S SGCf1 (CCTTAGGCGTCAAGGAACAC) และ 18S SGCr1 (GCGTTCAAAAACTCGATGGT) ใช้ยีน *secA* เป็นยีนเป้าหมาย (target gene) ส่วนผสมสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ และโปรแกรมการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใช้สภาวะเดียวกันกับวิธี absolute quantification

การสร้างกราฟมาตรฐาน

ทำการเจือจางพลาสมิด pUC1318-secA ให้มีปริมาณเชื้อต่างกัน 10 เท่าระหว่าง 10^0 - 10^{-1} copies ในดีเอ็นเอของอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 25 ng/μl ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทำเช่นเดียวกับการประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อย ทำการสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ซอฟต์แวร์ Abs Quant/2nd Derivative Max ต้องให้ค่า PCR amplification efficiency (E) เท่ากับ 2 ซึ่งมีความสำคัญสำหรับการบ่งชี้ประสิทธิภาพของปฏิกิริยาพีซีอาร์ เป็น 100% efficiency คือการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้จำนวน 2 เท่า ในแต่ละรอบ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) ด้วยโปรแกรม Statistix 8.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี LSD All-Pairwise Comparisons Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) สำหรับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่ออ้อยที่ระดับความรุนแรงของอาการต่างกัน และการเปรียบเทียบวิธีการประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี Absolute quantification และ Relative quantification

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

กราฟมาตรฐานและค่า PCR amplification efficiency (E)

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในงานวิจัยนี้ ทำโดยการเทียบปริมาณเชื้อในตัวอย่างอ้อยกับกราฟมาตรฐานที่มีความเข้มข้นพลาสมิด pUC1318-secA ต่างกัน 10 เท่าระหว่าง 10^{10} - 10^1 copies ในดีเอ็นเอของอ้อยจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 25 ng/μl (10^{10} - 10^1 copies /25 ng plant DNA) พบว่าเส้นกราฟของความเข้มข้นพลาสมิด 10^{10} copies/25 plant DNA แสดงเส้นกราฟได้เร็วกว่าความเข้มข้นอื่นๆ มีค่า Threshold cycles (Ct) น้อยกว่าความเข้มข้นอื่นๆ และมีค่า Ct เพิ่มขึ้นผกผันกับความเข้มข้นพลาสมิด pUC1318-secA (Figure 1A) ขณะที่ความเข้มข้น พลาสมิด pUC1318-secA ต่ำ (10^1 - 10^0 copies/25 ng plant DNA) สามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอได้แต่กราฟขึ้นไม่ชัดเจน เมื่อพิจารณาค่า Tm ของแต่ละความเข้มข้นให้ค่าเฉลี่ยที่ประมาณ 77.10 °C เพียงค่าเดียวเท่านั้นจึงน่าจะเป็นค่า Tm ของขึ้นดีเอ็นเอเป้าหมาย ยกเว้นความเข้มข้นของพลาสมิดที่ 10^0 - 10^1 copies/25 ng plant DNA มีค่า Tm ที่ 73.22 °C และ 77.10 °C ตามลำดับซึ่งค่า Tm ที่ 73.22 °C น่าจะได้อาจมาจากการจับกันเองของไพรเมอร์ (primer-dimer) (Figure 1B)

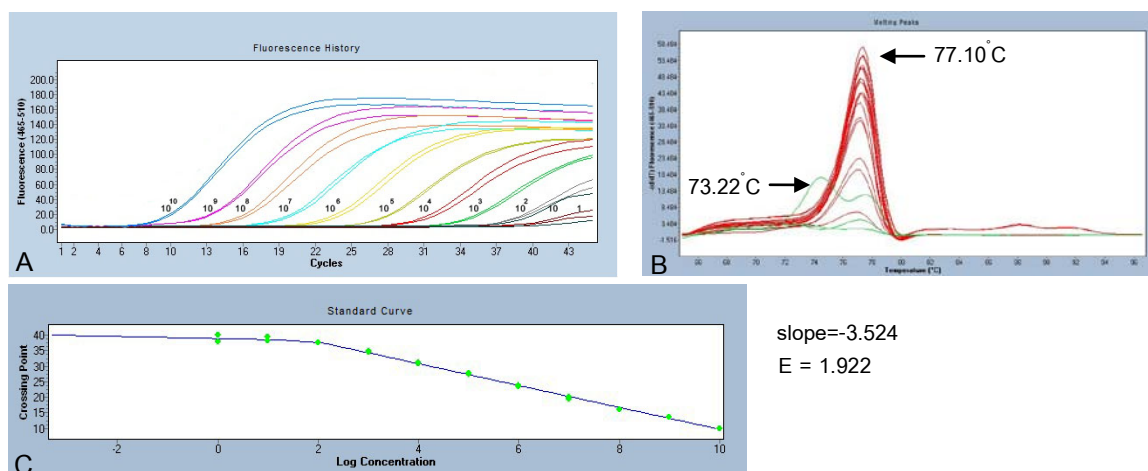


Figure 1 (A) Amplification curve of serial dilution; pUC1318-secA plasmid concentration ranging from 10^{10} -1 copies/25 ng plant DNA, (B) The melting temperature (T_m) peak at 77.10°C, indicate specific amplification of target DNA, (C) Standard curve of serial dilution mixes obtained by the threshold cycler (Ct) versus log of starting quantity (copies/25 ng plant DNA)

ค่า PCR amplification efficiency (E) จากการคำนวณด้วยซอฟต์แวร์ Abs Quant/2nd Derivative Max พบว่าระหว่างช่วงความเข้มข้นพลาสมิด pUC1318-secA 10^{10} - 10^2 copies/25 ng plant DNA สามารถมาใช้หาความลาดเอียงของกราฟมาตรฐานได้ ส่วนความเข้มข้นพลาสมิด pUC1318-secA 10 - 1 copies/25 ng plant DNA เป็นค่าที่ตกอยู่ในช่วงไม่น่าเชื่อถือ จากกราฟนี้พบว่าได้ค่าความลาดเอียงของกราฟมาตรฐานเท่ากับ -3.524 หมายความว่าแต่ละความเข้มข้นที่ต่างกัน 10 เท่า ให้ค่า Ct ต่างกัน 3.524 รอบ หรือกล่าวได้ว่าเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น 3.524 สามารถการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใกล้เคียง 10 เท่า ($2^{3.524} = 11.5$) เมื่อนำค่าความลาดเอียงมาหาค่า E จากสมการ $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ ได้ค่า E เท่ากับ 1.922 (Figure 1C) แสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นของขึ้นดีเอ็นเอได้จำนวน 1.922 เท่า ในแต่ละรอบของการทำพีซีอาร์

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาในเนื้อเยื่อด้วยวิธี absolute และ relative quantification

การประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี Absolute quantification เป็นการประเมินเชื้อโดยการนำเอาค่า Ct ของแต่ละตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐาน ในขณะที่ Relative quantification เป็นการหาสัดส่วนของปริมาณเชื้อ (ยีนเป้าหมาย) เทียบกับยีนอ้างอิง

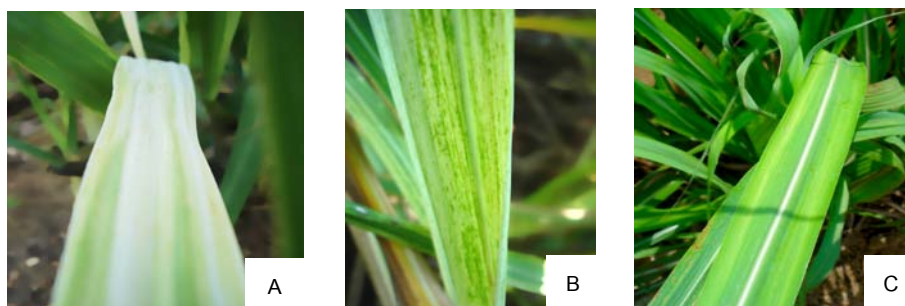


Figure 2 sugarcane white leaf symptom expression from A) white leaves, B) white-green leaves and C) green leaves (healthy leaves)

ผลการทดสอบกับตัวอย่างเนื้อเยื่ออ่อนที่แสดงลักษณะความรุนแรงของโรคใบขาวอ่อนต่างกัน 3 ระดับ คือใบขาว ใบเขียวปนขาว และใบเขียวปกติ (ไม่แสดงอาการ) (Figure 2) นำมาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณบางส่วนของยีน *secA* ด้วยเทคนิค Absolute quantification และ Relative quantification เพื่อประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมา จาก Table 1 พบว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่วัดได้จากทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

Table 1 Quantitative of sugarcane white leaf phytoplasma by absolute and relative quantification in leaf tissue expressed different levels of symptom expression

Samples	Quantification assay			
	Absolute quantification		Relative quantification	
	(copies/25 ng plant DNA)		(copies/25 ng plant DNA)	
	range	mean	range	mean
10 ² copies/25 ng plant DNA	-	-	100	-
White leaves*	1.54x10 ⁵ - 7.91 x10 ⁵	5.69x10 ⁵ aA	1.83x10 ⁵ - 8.75 x10 ⁶	5.81x10 ⁵ aA
White-green leaves*	1.2x10 ³ - 1.74x10 ⁴	9.37 x10 ³ bB	1.77x10 ³ - 1.74x10 ⁴	9.32 x10 ³ bB
Green leaves (healthy)*	No detected	-	20-30	22.10 c

*n = 10

Different lower-case letters in each column indicate the significant differences in the observed values at $p < 0.05$

Different capital letters in each line indicate the significant differences in the observed values at $p < 0.05$

จากกราฟมาตรฐานและการประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยวิธี Absolute quantification จึงใช้ความเข้มข้นพลาสมิต pUC1318-secA 10² copies/25 ng plant DNA เป็น target/reference calibrator ในการประเมินปริมาณเชื้อด้วยวิธี Relative quantification เนื่องจากเป็นบริเวณเชื้อที่น้อยที่สุดที่อยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน โดยพบว่าปริมาณเชื้อในตัวอย่างใบขาวมากที่สุดด้วยการประเมินจากทั้ง Absolute และ Relative quantification วิธีคือ 1.54x10⁵ - 7.91 x10⁵ และ 1.83x10⁵ - 8.75 x10⁶ copies/25 ng plant DNA ตามลำดับ และรองลงมาคือปริมาณเชื้อในตัวอย่างใบเขียวปนขาวคือ 1.2x10³ - 1.74x10⁴ และ 1.77x10³ - 1.74x10⁴ copies/25 ng plant DNA ตามลำดับ แม้ว่าจะสามารถประเมินปริมาณเชื้อในตัวอย่างใบเขียวได้ด้วยวิธี Relative quantification เมื่อพิจารณาที่ค่า Ct พบว่าได้มากกว่า 40 รอบ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทำให้ผลที่ได้ไม่มีความน่าเชื่อถือ มีรายงานว่าปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีน้อยในตัวอย่างประมาณ 4-340 cells/ g of tissue นั้นจะตรวจพบและสามารถประเมินได้ด้วย nested PCR เท่านั้น (Berges *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามจาก table 1 พบว่าปริมาณเชื้อในตัวอย่างใบขาวมากกว่าใบเขียวปนขาว และใบเขียวอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าปริมาณเชื้อที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อระดับความรุนแรงของโรคใบขาว สอดคล้องกับปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาของดอก

ไฮเดรนเยียที่ติดเชื้อ (Japanese hydrangea phyllody phytoplasma) และมีลักษณะแสดงอาการของโรคซึ่งตรวจพบปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมามากกว่าต้นที่ติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ (Kesumawati, et al., 2006) นอกจากนี้ปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมามีความสัมพันธ์โดยตรงกับการแสดงออกของอาการดอกเขียว (virescence) ในแพงพวยด้วย (Kuske and Kirkpatrick, 1992)

สรุป

การประเมินเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ยีน *secA* เป็นยีนเป้าหมายที่มีจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไฟโตพลาสมาโรคใบขาวอ้อย การประเมินปริมาณเชื้อด้วยวิธี Absolute และ Relative quantification พบว่าให้ค่าปริมาณเชื้อที่ใกล้เคียงกันโดยจากวิธี Absolute quantification ได้ปริมาณเชื้อในใบขาวและใบเขียวปนขาวเป็น 1.54×10^5 - 7.91×10^5 และ 1.2×10^3 - 1.74×10^4 copies/25 ng plant DNA ตามลำดับ ส่วนใบเขียวปกติ ไม่สามารถประเมินปริมาณได้ด้วยวิธีนี้ และด้วยวิธี Relative quantification พบปริมาณเชื้อในใบขาว, ใบเขียวปนขาว และใบเขียวปกติเป็น 1.83×10^5 - 8.75×10^6 , 1.77×10^3 - 1.74×10^4 และ 20-30 copies/25 ng plant DNA ตามลำดับ แต่ใบเขียวปกติมี Ct มากกว่า 40 รอบซึ่งเป็นค่าที่ไม่น่าเชื่อถือ จากการทดลองเห็นได้ว่าทั้ง 2 วิธีให้ผลปริมาณเชื้อที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้ในงานวิจัยที่มีการสร้างกราฟมาตรฐานแล้วโดยใช้พลาสมิด pUC-1318-*secA* การใช้วิธี Absolute quantification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางส่วนของยีน *secA* เพียงบริเวณเดียวและใช้การเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานได้โดยตรง ในขณะที่วิธีการ Relative quantification ต้องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งในส่วนของยีนเป้าหมาย (*SecA*) และยีนอ้างอิง (18S rDNA) ทั้งของตัวอย่างที่ต้องการประเมินปริมาณเชื้อและตัวเทียบ (calibrator) จากนั้นจึงนำมาคำนวณซึ่งยุ่งยากกว่า ดังนั้นวิธี Absolute quantification ซึ่งเป็นการประเมินปริมาณเชื้อในตัวอย่างที่มีอยู่จริงจึงง่ายกว่าและประหยัดกว่าในการปฏิบัติ

เอกสารอ้างอิง

พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2542. **โครงการจัดการโรคใบขาวของอ้อย**. คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ขอนแก่นพิมพ์พัฒนา จำกัด. 228 หน้า.

ยุพา หาญบุญทรง, วรณภา ฤทธสุนธิ์ และ ชูตินันท์ ชูสาย. 2548. การตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในเพลี้ยจักจั่นและการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล. **วารสารวิจัย มข.** 10(1): 13-21.

สุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล. 2556. การตรวจโรคใบขาวของอ้อยด้วยเทคนิค PCR. **เอกสารประกอบการฝึกอบรม** เรื่องการชักนำต้นจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยให้เกิดราก วันที่ 11 มิถุนายน 2556 ณ ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น.

_____, ธีรวุฒิ วงศ์วัฒน์, ปิยะดา ธีระกุลพิสุทธิ์, ทักษิณา คັນสยะวิชัย, สุนี ศรีสิงห์, นิรุบล ทวีกุล, นฤทัย วรสถิตย์ และ รังสี เจริญสถาพร. 2554. วิธีประเมินปริมาณเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อยด้วยเทคนิคพีซีอาร์. **เอกสารประกอบการประชุมเสวนาอ้อยและน้ำตาลแห่งชาติ**. "วิกฤตและโอกาสอ้อยไทยในเวทีโลก" วันที่ 30-31 สิงหาคม 2554 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรสุพรรณบุรีหน้า 74-84.

- _____, _____, สุรศักดิ์ แสนโคตร, ทักษิณา คັນสยะวิชัย, สุนี ศรีสิงห์. 2556. SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูง. ผลงานวิจัยดีเด่น กรมวิชาการเกษตร ประจำปี 2555. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-15.
- Berges, R., M. Rott and E. Seemüller. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plants hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. **Phytopathology** 90(10): 1145-1152.
- Chen, C.T. 1978. Vector pathogen relationships of sugarcane whole leaf disease. **Taiwan Sugar Journal** 25: 50-54.
- Li, M. and D.J., Midmore. 1999. Estimating the genetic relationships of chinese water chestnut (*E. dulcis* (Burm.f.) Hensch) cultivated in Australia, using RAPD. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**. 74(2): 224-231.
- Crosslin, J.M. and G.J. Vademmark. 2006. Development of real-time, quantitative PCR for detection of the Columbia basin potato purple top phytoplasma in plants and beet leafhoppers. **Plant Disease**. 90(5):663-667.
- Hren, M., J. Boben, A. Rotter, P. Kralj, K. Gruden and M. Ravnikar. 2007. Real-time PCR detection systems for Flavescence dorée and Bois noi phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics. **Plant Pathology**. 56: 785-796.
- Kesumawati, E., T. Kimata, T. Uemachi, M. Hosokawa and S. Yazawa. 2006. Correlation of phytoplasma concentration in *Hydrangea macrophylla* with green-flowering stability. **Scientia Horticulturae** 108: 74-78.
- Kuske, C.R. and B.C. Kirkpatrick. 1992. Phylogenetic relationship between the western aster yellows mycoplasma-like organism and other prokaryotes established by 16S rRNA gene sequence **International Journal of Systematic Bacteriology** 42: 226-233.
- Jarausch, W., A. Fuchs, B. Jarausch. 2010. Establishment of a quantitative real-time PCR assay for the specific quantification of *Ca. phytoplasma prunorum* in plants and insect. **21st International Conference on Virus and other Graft Transmissible Disease of Fruit Crops**. 392-427.
- Marzachi, C., R.G. Milne and D. Bosca. 2004. Phytoplasma-plant-vector relationships. In: **Research signpost recent research development in plant pathology** p. 3-31.
- Sakunrungsirikul, S., T. Wongwarat, S. Srisink and P. Theerakulpisut. 2012. SecA, a new marker for an improved detection method of sugarcane phytoplasma. **The international conference on tropical and sub-tropical plant diseases 2012**. February 7-10, 2012. The Empress hotel, Chiang Mai, Thailand.
- Whelan, J.A., N.B. Russel, M.A. and Whelan, M.A. 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. **Journal of Immunological Methods** 278: 261-269.