สวพ-ว-4(1)

เลขที่เอกสาร: 61120105110141000

ใบนำส่งรายงานวิจัย

เลขที่รับ(สวพ).....

วันที่รับ.....

ขอส่งรายงานวิจัย มก. ประจำปีงบประมาณ (1) 2553

(2) ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว รหัส ก-ษ(ด)103.51 ชื่อโครงการ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมา

สาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

(3) หัวหน้าโครงการ รศ.สุภาพร กลิ่นคง

(4) หน่วยงาน ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน

(5) ประเภทโครงการวิจัย โครงการวิจัย 3 สาขา โครงการวิจัยสาขาเกษตรศาสตร์

(6) รายงานที่ส่ง รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง) จำนวน 3 ชุด พร้อม CD/Diskette 5 แผ่น

(7) การเผยแพร่ผลงานวิจัย ประสงค์ให้ สวพ. เผยแพร่ได้

ลงชื่อ.....

(รศ.สุภาพร กลิ่นคง)

หัวหน้าโครงการ

3 มี.ค. 2558

ใบรับรายงานวิจัย

เลขที่รับ(สวพ).....

วันที่รับ.....

ขอส่งรายงานวิจัย มก. ประจำปีงบประมาณ (1) 2553

(2) ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว รหัส ก-ษ(ด)103.51 ชื่อโครงการ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมา

สาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

(3) หัวหน้าโครงการ รศ.สุภาพร กลิ่นคง

(4) หน่วยงาน ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน

(5) ประเภทโครงการวิจัย โครงการวิจัย 3 สาขา โครงการวิจัยสาขาเกษตรศาสตร์

(6) รายงานที่ส่ง รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง) จำนวน 3 ชุด พร้อม CD/Diskette 5 แผ่น

(7) การเผยแพร่ผลงานวิจัย ประสงค์ให้ สวพ. เผยแพร่ได้

ลงชื่อ.....

(เจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยและพัฒนา)

...../...../.....

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนวิจัย มก.ปีงบประมาณ 2553

รหัสโครงการวิจัย ก-ษ(ด)103.51

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

Study of Genetic Diversity of Phytoplasmas Associated with Phyllody Disease of Sesame

หัวหน้าโครงการ รศ.สุภาพร กลิ่นคง
หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน
หน่วยงานหลัก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน

แหล่งทุน : ทุนอุดหนุนวิจัย มก.
สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบบรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิจัย (Project)
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2553

ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการวิจัย

1.1 รหัส ก-ษ(ด)103.51 ชื่อโครงการวิจัย ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

1.2 ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว

1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ.สุภาพร กลิ่นคง

1.4 หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน
หน่วยงานหลัก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน

1.5 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา โครงการวิจัยสาขาเกษตรศาสตร์

1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 3 ปี ตั้งแต่ปีงบประมาณ 2551 ถึงปีงบประมาณ 2553

1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัย/เก็บข้อมูล

- 1. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร วิทยาเขตกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ 710,000.00 บาท ประกอบด้วย
ปีงบประมาณ 2551 ได้รับ 250,000.00 บาท
ปีงบประมาณ 2552 ได้รับ 260,000.00 บาท
ปีงบประมาณ 2553 ได้รับ 200,000.00 บาท

1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. ทดสอบชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน 16Sr DNA และ ยีน SecY ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา
2. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา โดยการวิเคราะห์ยีน 16Sr DNA หรือ ยีน SecY
3. จัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา โดยการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16Sr DNA หรือ ยีน SecY

1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ

ปีงบประมาณ	เดือนที่	ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
2553	1-6	1. เปรียบเทียบข้อมูลยีนและวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรระเชื้อ
	7-12	1. จัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงากับเชื้อไฟโ

พลาสมาชนิดอื่นๆ

2552	1-6	1. ได้ตัวอย่างงาเป็นโรคแตกพุ่มฝอยเพิ่มเติม
		2. โคลนยีน 16S rDNA หรือ SecY ของเชื้อไฟโตพลาสมา
	7-12	1. ได้ข้อมูลยีน 16S rDNA หรือ SecY ของเชื้อไฟโตพลาสมา
2551	1-6	1. ได้ตัวอย่างงาเป็นโรคแตกพุ่มฝอยแหล่งปลูกงา
		2. ทราบชนิดของไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA และ SecY
	7-12	1. โคลนยีน 16S rDNA หรือ SecY ของเชื้อไฟโตพลาสมา
		2. ได้ข้อมูลยีน 16S rDNA หรือ SecY ของเชื้อไฟโตพลาสมา

1.11 สรุปผลการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

- วัตถุประสงค์ (ตามแผน)

1.1.สำรวจและเก็บตัวอย่างงาเป็นโรคจากแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทยเพิ่มจากปีที่2

2.วิเคราะห์ยีน 16Sr DNA และ ยีน SecY และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

3. วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16Sr DNA และ ยีน SecY และจัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงากับเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีรายงานใน GenBank

- เป้าหมาย/ผลที่คาด (ตามแผน)

1.1. ได้ตัวอย่างงาเป็นโรคจากพื้นที่สำรวจ

2. ได้ข้อมูลยีน 16Sr DNA และ ยีน SecY จากตัวอย่างโรคที่เก็บเพิ่ม

3. ทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ และจัดกลุ่มเชื้อ

- ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)

1.1.สำรวจและเก็บตัวอย่างงาเป็นโรคจากแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย 10 จังหวัด 55 ไอโซเลท

2.ได้ข้อมูลยีน 16Sr DNA 15 ไอโซเลท และ ยีน SecY 8 ไอโซเลท จากตัวอย่างโรค

3.การจัดกลุ่มเชื้อ

3.1 การจัดกลุ่มโดยยีน 16S rDNA จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI (Aster yellows group) และ 16SrII (Peanut witches'-broom group) และจัดกลุ่มย่อยด้วยยีน 16S rRNA พบว่า เชื้อจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrI -B และ 16SrII-A

3.2 การจัดกลุ่มโดยยีน secY ของเชื้อกลุ่ม 16SrI ที่นำมาศึกษาพบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม SecY -I

1.12 ผลการดำเนินงานวิจัยเป็นไปตามแผนหรือไม่ อย่างไร

- เป็นไปตามแผน

1.13 ปัญหา อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางแก้ไข

- ไม่มีปัญหาและอุปสรรค

1.14 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ

1.15 ผลผลิต/สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs)

- หัวเรื่องวิทยานิพนธ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย

1.16 จุดเด่นของผลงานวิจัย / ผลผลิต / สิ่งที่ได้จากการวิจัย (outputs)

- สร้างองค์ความรู้ใหม่/นวัตกรรมที่ทันสมัย

ข้อมูลยีน 16S rDNA และ secY ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา บันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank

- สร้างนักวิจัยหน้าใหม่/พัฒนานักวิจัย

สร้างนักวิจัยระดับปริญญาโท 1 คน

1.17 การนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

1. การนำผลการวิจัยไปเผยแพร่/ถ่ายทอด

1.1 วารสารวิชาการระดับชาติ/วารสารวิชาการระดับนานาชาติ 1 เรื่อง

ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับชาติ

- ผู้แต่ง : นาถยา พานทอง สุภาพร กลิ่นคง วิชัย โฆสิตรัตน และสุจินต์ ภัทรฎวดล
- ชื่อเรื่อง : การจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทยด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา ชื่อวารสาร : วาราสารวิทยาศาสตร์เกษตร
- ปีที่ตีพิมพ์ : 2554 เดือน: กันยายน ถึง ธันวาคม เล่มที่ : 42 ฉบับที่ : 3 หน้า : 337 ถึง 348

1.2 นำเสนอในการประชุม/สัมมนาระดับชาติและนานาชาติ 1 เรื่อง

นำเสนอในการประชุม/สัมมนาระดับชาติ

- ลักษณะเอกสาร/รูปแบบการนำเสนอ : บทคัดย่อ/ภาคบรรยาย
- ชื่อผู้เสนอผลงาน : Panthong, N., S. Klinkong, W. Kositratana and S. Patarapuwadol
- ชื่อเรื่อง : Molecular Classification of Phytoplasma Associated with Sesame (Sesamum indicum L.) Phyllody in Thailand
- ชื่อการประชุมสัมมนา : AG-BIO/PERDO The 4th AG-BIO/PERDO Graduate Conference on Agricultural Biotechnology and UT-KU Joint Seminar
- วัน/เดือน/ปี : จาก 9 ธ.ค. 2553 ถึง 10 ธ.ค. 2553
- สถานที่/เมือง/ประเทศ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ประเทศไทย
- หน้า : 29 ถึง 29

1.3 เผยแพร่ผลงานในรูปแบบการจัดนิทรรศการ

-

1.4 บทความ

-

1.5 จัดอบรมถ่ายทอด

-

1.6 นำเสนอทางสื่อผสม

-

1.7 ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย

-

1.9 อื่นๆ

-

2. เป้าหมายการนำผลลัพธ์ / ผลสำเร็จที่ได้ / หรือคาดว่าจะได้จากการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1 . ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนการสอน

- ใช้สอนวิชา 02036281 โรคพืชวิทยาเบื้องต้น, 02031412 ไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืช

2 . ด้านการเกษตร

- ช่วยให้มีการจัดการป้องกันกำจัดโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดความเสียหายเนื่องจากโรค ทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น

3 . ด้านคุณภาพชีวิต สุขภาพอนามัย

- ช่วยให้เกษตรกรมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

4 . ด้านเศรษฐกิจ

- การเพิ่มผลผลิตทำให้เกษตรกรมีรายได้ดีขึ้น

5 . ด้านการถ่ายทอดเทคโนโลยี/ฝึกอบรมแก่กลุ่มเป้าหมาย

- ถ่ายทอดความรู้แก่เกษตรกรร่วมกับภาควิชาโรคพืช

6 . นำความรู้ไปวิจัย/พัฒนาขั้นต่อไป

- ข้อมูลที่ได้จากผลงานวิจัยสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรคไฟโตพลาสมาอย่างมีประสิทธิภาพ

1.18 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ด้านใด

- ยุทศาสตร์การบริหารราชการแผ่นดิน (พ.ศ.2548 - 2551)

1 . ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุลและยั่งยืน

เป้าประสงค์ การปรับโครงสร้างการผลิตเพื่อเพิ่มผลิตภาพ และคุณค่าของสินค้าและบริการบนฐานความรู้และความเป็นไทย

2 . ยุทธศาสตร์การพัฒนาบนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม

เป้าประสงค์ การรักษาฐานทรัพยากรและความสมดุลของระบบนิเวศน์

3 . ยุทธศาสตร์การพัฒนาคุณภาพคนและสังคมไทยสู่สังคมแห่งภูมิปัญญาและการเรียนรู้

เป้าประสงค์ การเสริมสร้างสุขภาวะคนไทยให้มีสุขภาพแข็งแรงทั้งกายและใจ มีความสัมพันธ์ทางสังคมและอยู่ในสภาพแวดล้อมที่น่าอยู่

4 . ยุทธศาสตร์การสร้างความเข้มแข็งของชุมชนและสังคมให้เป็นรากฐานที่มั่นคงของประเทศ

เป้าประสงค์ การสร้างความมั่นคงของเศรษฐกิจชุมชน

5 . ยุทธศาสตร์การเสริมสร้างธรรมาภิบาลในการบริหารจัดการประเทศ มุ่งเสริมสร้างความเป็นธรรมในสังคมอย่างยั่งยืน

เป้าประสงค์ เสริมสร้างความเข้มแข็งของภาคประชาชน ให้สามารถเข้าร่วมในการบริหารจัดการประเทศ

- นโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ.2551 - 2553)

ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 1 การสร้างศักยภาพและความสามารถเพื่อการพัฒนาทางเศรษฐกิจ

กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 การสร้างมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรและประมง และการพัฒนาศักยภาพในการแข่งขันและการพึ่งพาตนเองของสินค้าเกษตรและประมง

แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาการผลิตพืชเศรษฐกิจเพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มและนำไปสู่การแข่งขันและการพึ่งพาตนเอง เช่น ข้าว ยางพารา ปาล์มน้ำมัน อ้อย มันสำปะหลัง พืชผัก ผลไม้ ไม้ดอกไม้ประดับ

1.19 การรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา

-

1.20 การได้รับรางวัล

-

1.21 งานที่จะทำต่อไป

- ไม่มี

1.22 คำชี้แจงเพิ่มเติม

- ไม่มี

1.23 ได้แนบรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project) ตามหัวข้อในส่วนที่ 2 มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

(รศ.สุภาพร กลิ่นคง)

3 มี.ค. 2558

ส่วนที่ 2 **รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์**
โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2553

โครงการวิจัยรหัส ก-ษ(ด)103.51

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

(1)สุภาพร กลิ่นคง, (2)คนึงนิตย์ เหรียญวรากร
(1)Supaporn Klinkong, (2)Kanungnit Reanwarakorn

บทคัดย่อ

ต้นงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยที่เก็บมาจากแหล่งปลูกงาสำคัญ 10 จังหวัดในประเทศไทย นำมาทำการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และ secY ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 และ AYsecYF1/AYsecYR1 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 และ 1,300 คู่เบส ตามลำดับ นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้จาก 15 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลี-โอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทนกลุ่ม 15 กลุ่ม คือ 16SrI-16SrXV พบว่าเชื้อจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI (Aster yellows group) และ 16SrII (Peanut witches'-broom group) โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ? 97.5 เปอร์เซ็นต์ และจัดกลุ่มย่อยด้วยยีน 16S rRNA โดยการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ in silico restriction fragment length polymorphism (RFLP) พบว่า เชื้อจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrI-B และ 16SrII-A โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง > 0.97 ส่วนการจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน secY ของเชื้อกลุ่ม 16SrI ที่นำมาศึกษา เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทนกลุ่ม 11 กลุ่ม พบว่า เชื้อทั้ง 8 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม SecY-I

คำสำคัญ : งา, โรคแตกพุ่มฝอย, ไฟโตพลาสมา, ยีน 16S r

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 primers pairs of R16F2/R16R2 and AYsecYF1/AYsecYR1 which the expect amplified PCR products size of 1,200 and 1,300 bp respectively. Fifteen isolates of sesame phyllody phytoplasma were identified by using nucleotide sequences of 16S rRNA gene and further analyzed for the relationship with reference phytoplasma strains (16SrI-16SrXV group). The results indicated that the phytoplasma associated with sesame phyllody grouped into the 16SrI

(Aster yellows group) and 16SrII (Peanut witches'-broom group) with ? 97.5% similarity. The subgroup of phytoplasmas were identified by 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 sequences of 8 isolates, which grouped in the 16SrI, were classified as SecY-I group.

Key words : Sesame, Phyllody, Phytoplasma, 16S rDNA

---

(1)ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน

(1)Faculty of Agriculture

(2)คณะเกษตร กำแพงแสน

(2)Faculty of Agriculture

ส่วนที่ 2 รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปีงบประมาณ 2553

โครงการวิจัยรหัส ก-ษ(ด)103.51

ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

Study of Genetic Diversity of Phytoplasma Associated with Phyllody Diseases of Sesame

(1)สุภาพร กลิ่นคง,(2) คนึงนิตย์ เหรียญวรากร

(1)Supaporn Klinkong, (2) Kanungnit Reanwarakorn

บทคัดย่อ

ต้นงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยที่เก็บมาจากแหล่งปลูกงาสำคัญ 10 จังหวัดในประเทศไทย นำมาทำการเพิ่มปริมาณยีน 16 S rRNA และ *secY* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 และ AYsecYF1/AYsecYR1 ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 และ 1,300 คู่เบส ตามลำดับ นำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้จาก 15 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทนกลุ่ม 15 กลุ่ม คือ 16SrI-16SrXV พบว่าเชื้อจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI (Aster yellows group) และ 16SrII (Peanut witches'-broom group) โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ $\geq$ 97.5 เปอร์เซ็นต์ และจัดกลุ่มย่อยด้วยยีน 16S rRNA โดยการวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคการวิเคราะห์ *in silico* restriction fragment length polymorphism (RFLP) พบว่า เชื้อจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrI-B และ 16SrII-A โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง > 0.97 ส่วนการจัดกลุ่มโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อกลุ่ม 16SrI ที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทนกลุ่ม 11 กลุ่ม พบว่า เชื้อทั้ง 8 ไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม SecY-I

คำสำคัญ : งา, โรคแตกพุ่มฝอย, ไฟโตพลาสมา, ยีน 16S rDNA, ยีน *secY*

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 primers pairs of R16F2/R16R2 and AYsecYF1/AysecYR1 which the expect amplified PCR products size of 1,200 and 1,300 bp respectively. Fifteen isolates of sesame phyllody phytoplasma were identified by using nucleotide sequences of 16S rRNA gene and further analyzed for the relationship with reference phytoplasma strains (16SrI-16SrXV group). The results indicated that the phytoplasma associated with sesame phyllody grouped into the 16SrI (Aster yellows group) and 16SrII (Peanut witches'-broom group) with ≥ 97.5% similarity. The subgroup of phytoplasmas were identified by *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 sequences of 8 isolates, which grouped in the 16SrI, were classified as SecY-I group.

Keywords: Sesame, Phyllody, 16S rDNA gene, SecY gene

---

(1) ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน

(1) Faculty of Agriculture

(2) คณะเกษตร กำแพงแสน

(2) Faculty of Agriculture

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ 7

สารบัญ 9

สารบัญตาราง 10

สารบัญภาพ 11

สารบัญภาคผนวก 15

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 16

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 17

ขอบเขตของโครงการวิจัย 17

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 17

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 18

วิธีวิจัย 19

ผลการวิจัย 31

สรุปและข้อเสนอแนะ 66

เอกสารและสิ่งอ้างอิง 67

ภาคผนวก 71

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนไอโซเลทงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยแยกตามจังหวัดในแต่ละภาคของประเทศไทย	19
2	แสดงข้อมูลของเชื้อไฟโตพลาสมาที่นำมาใช้เป็นตัวแทนในการจัดกลุ่มเชื้อไฟโต-พลาสมาที่ศึกษา โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA	27
3	แสดงข้อมูลของเชื้อไฟโตพลาสมาที่นำมาใช้เป็นตัวแทนในการจัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาที่ศึกษา โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY*	29
4	แสดงลักษณะอาการของโรคแตกพุ่มฝอยของงา และผลการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และ *secY* ด้วยเทคนิค PCR	39
5	ผลของรูปแบบการตัดยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค *in silico* RFLP	62
6	แสดงชนิดของงา ลักษณะอาการ และผลการจัดกลุ่มและกลุ่มย่อยเชื้อทั้ง 15 ไอโซเลทโดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *secY*	64

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงจังหวัดที่เก็บตัวอย่างงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยในประเทศไทย	20
2	สภาพแปลงงาในจังหวัดลพบุรี แสดงอาการแตกพุ่มฝอยบริเวณยอดและอาการดอกเขียว	32
3	สภาพการระบาดของโรคแตกพุ่มฝอยในแปลงงาในจังหวัดนครราชสีมา แสดงอาการดอก เขียว อาการลำต้นแบน ติดฝักน้อยและฝักลีบ	33
4	สภาพแปลงงาในจังหวัดเพชรบูรณ์ แสดงอาการแตกพุ่มฝอยบริเวณยอด และอาการดอก เขียว	34
5	โรคแตกพุ่มฝอยในแปลงงาในจังหวัดสุโขทัย งาแสดงอาการแตกพุ่มฝอย อาการดอกเขียว และบางต้นเริ่มแสดงอาการดอกเขียว	35
6	สภาพแปลงงาในระยะติดฝักในจังหวัดนครสวรรค์ แปลงที่มีการระบาดรุนแรงในระยะเก็บเกี่ยว อาการดอกเขียวที่พบในแปลง	36
7	โรคแตกพุ่มฝอยในแปลงงาในจังหวัดกาญจนบุรี งาอาการแตกพุ่มฝอยร่วมกับดอกเขียว และบางต้นเริ่มแสดงอาการแตกพุ่มฝอยบริเวณยอดและมีอาการต้นแบนร่วมด้วย	37
8	ภาพตัดขวางของเซลล์ท่ออาหารของงาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบเชื้อไฟโตพลาสมาในงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอย และไม่พบเชื้อในงาปกติ	38
9	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดลพบุรี	42
10	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดลพบุรี	42
11	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดนครราชสีมา	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดนครราชสีมา	43
13	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดเพชรบูรณ์	44
14	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดเพชรบูรณ์	44
15	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดสุโขทัย	45
16	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดสุโขทัย	45
17	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดนครสวรรค์	46
18	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดนครสวรรค์	46
19	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดกาญจนบุรี	47
20	gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดกาญจนบุรี	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

21 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดเลย 48

22 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดเลย 48

23 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดพิษณุโลก 49

24 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดพิษณุโลก 49

25 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดบุรีรัมย์ 50

26 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากจังหวัดบุรีรัมย์ 50

27 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย เปรียบเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมา ที่เป็นตัวแทน 15 กลุ่ม ที่มีรายงานในฐานข้อมูล และเชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม โดยวิธี neighbor-joining 53

28 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย เปรียบเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมา ที่เป็นตัวแทน 15 กลุ่ม ที่มีรายงานในฐานข้อมูล และเชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม โดยวิธี neighbor-joining 54

29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริงที่ได้จากการตัดแบบ *in silico* ด้วยโปรแกรม *i*PhyClassifier บริเวณส่วน F2nR2 ของยีน 16S rRNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 17 ชนิด 56

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริงของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาไอโซเลท SEST1 ที่เกิดความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่ม 16SrI ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I (ก), *Bfa*I (ข), DraI (ค), *Hae*III (ง), *Hpa*II (จ), *Kpn*I(ฉ), *Mse*I(ช) MW (ดีเอ็นเอมาตรฐาน) คือ ØX174 ที่ตัดด้วย *Hae*III 57

31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริงของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาไอโซเลท SELB5, SEPB1 และ SEKB4 ที่เกิดความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่ม 16SrII เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Rfa*I (ก), *Bst*UI (ข), *Hae*III (ค), *Dra*I (ง),*Hha*I (จ), *Hinf*I(ฉ), *Mse*I(ช), *Taq*I (ซ) MW (ดีเอ็นเอมาตรฐาน) คือ ØX174 ที่ตัดด้วย *Hae*III 58

32 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริงที่ได้จากการตัดยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมา 8 ไอโซเลท เทียบกับตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่ม SecY-I ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด *Alu*I (ก), *Bfa*I (ข), *Dde*I (ค), *Hha*I (ง),*Hinf*I (จ), *Hpa*I(ฉ), *Mse*I(ช), *Rsa*I (ซ), *Tsp509*I (ฌ) Markers (ดีเอ็นเอมาตรฐาน) คือ ØX174 ที่ตัดด้วย *Hae*III 60

33 แสดงผลการจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาใน 9 จังหวัดของประเทศไทย 65

สารบัญภาคผนวก

ภาคผนวกที่		หน้า
1	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา	71
2	ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา	80
3	ตารางผนวก	
	ตารางผนวกที่ 3.1 แสดงค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในแต่ละไอโซเลท เมื่อเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน	86
	ตารางผนวกที่ 3.2 แสดงค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในแต่ละไอโซเลท เมื่อเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน	89
	ตารางผนวกที่ 3.3 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และกลุ่ม/กลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในแต่ละไอโซเลท เมื่อเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน	91
	ตารางผนวกที่ 3.4 แสดงข้อมูลของตัวแทนกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16SrI และ 16SrII ที่กำหนดโดยโปรแกรม *i*Phyclassifier	92
4	การนำผลงานวิจัยไปเผยแพร่/ถ่ายทอด	93

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

งา (*Sesamum indicum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่เป็นความหวังใหม่ของเกษตรกร งาถูกจัดเป็นพืชชีวจิต เมล็ดมีคุณค่าทางอาหารสูง ในเมล็ดงามีสารต้านอนุมูลอิสระ 50-60 เปอร์เซ็นต์ สารเหล่านี้ได้แก่ sesamolin, sesamin และ sesamol (Brar and Ahuja, 1979) น้ำมันงาใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพเนื่องจากมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น กรดลิโนเลอิก ที่จำเป็นต่อร่างกายอีกทั้งช่วยควบคุมและลดปริมาณไขมันในเส้นเลือด นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สี เครื่องสำอาง และน้ำมันหล่อลื่น ในปัจจุบันพื้นที่ปลูกงาของประเทศไทยมีประมาณ 380,000-390,000 ไร่ ได้ผลผลิตประมาณ 34,000-41,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 280-370 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547) ปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตงาลดลงคือ โรคแตกพุ่มฝอยที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา ในประเทศอินเดียพบว่าโรคนี้ทำให้ผลผลิตงาลดลง 10-100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่องาเป็นโรคเพิ่มขึ้น 1 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ผลผลิตลดลง 8.4 กิโลกรัม/เฮกตาร์ (เตือนจิตต์ และคณะ, 2539) ประเทศไทยพบโรคนี้ระบาดรุนแรงในปี พ.ศ.2513 และรายงานถึงสาเหตุของโรคว่าเกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมาเป็นครั้งแรก (Choopaya,1973) และยังคงมีการระบาดของโรคนี้ในทุกพื้นที่ที่ปลูกงาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน

เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่พบในประเทศไทยได้ถูกจัดจำแนกโดยการเปรียบเทียบแบบแผน RFLP ของยีน 16 S rRNA พบว่าอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของปอเทือง (สุภาพร, 2540) และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรค Gentian witches' broom มากกว่าโรคเหลืองเตี้ยของข้าว (Rice yellow dwarf) (Nakashima *et al*,1995) ต่อมาได้มีการจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากประเทศไทย 2 สายพันธุ์ คือ SEPN และ SEPT เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของปอเทืองสายพันธุ์ SUNP และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของผักเสี้ยนผีสายพันธุ์ CLP โดยวิเคราะห์และเปรียบเทียบแบบแผน RFLP ของยีน 16 S rRNA กับเชื้อไฟโตพลาสมาอีก 20 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาทั้ง 4 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม 16 SrII-A (Khan *et al*, 2002) การจัดกลุ่มเชื้อโดยใช้ความหลากหลายของ ยีน 16 S rRNA พบว่า ยีน 16 S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคต่างๆ มีความเหมือนกันสูงมาก ทำให้การจัดกลุ่มในระดับ subgroup ไม่ชัดเจน จึงมีการพัฒนาใช้ยีน *secY* มาใช้ในการจัดกลุ่มเชื้อ และพบว่าสามารถใช้ความหลากหลายของ ยีน *secY* แยกความแตกต่างของเชื้อไฟโตพลาสมาที่จัดอยู่ใน subgroup เดียวกันเมื่อใช้การจัดกลุ่มด้วยยีน 16 S rRNA ออกจากกันได้ (Lee *et al*, 2006)

ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย โดยการวิเคราะห์ยีน *secY* ร่วมกับยีน 16S rRNA จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยให้สามารถจัดจำแนกเชื้อ และตรวจวินิจฉัยโรคได้ชัดเจนมากขึ้น เพื่อนำไปสู่การป้องกันกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ทดสอบชนิดของไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และ ยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา
2. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา โดยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA และ ยีน *secY*
3. จัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา โดยการเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ ยีน *secY*

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. สำรวจและเก็บตัวอย่างงาเป็นโรคจากแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย
2. ออกแบบหรือทดสอบชนิดไพรเมอร์ที่มีรายงานแล้วเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน 16S r RNA และ ยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา ด้วยเทคนิค PCR
3. ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา โดยการวิเคราะห์ยีน 16S rRNA หรือ ยีน *secY* ด้วยเทคนิค Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) หรือ การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์
4. วิเคราะห์และจัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงากับเชื้อไฟโตพลาสมาที่มีรายงานใน GenBank

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะสามารถทราบความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่ระบาดในแหล่งปลูกงาที่สำคัญ ได้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA หรือ ยีน *secY* และทราบว่าเชื้อนี้จัดอยู่ในกลุ่มใดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่มีรายงานทั้งในประเทศและต่างประเทศ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาการแพร่ระบาดและการป้องกันกำจัดโรคอย่างมีประสิทธิภาพต่อไป นอกจากนี้ยังสามารถให้บริการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาแก่หน่วยงานอื่นและเกษตรกร

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคแตกพุ่มฝอยของงาพบระบาดในหลายประเทศของทวีปเอเชียและแอฟริกา (Kolte, 1985) ในประเทศไทยมีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2513 (Choopaya, 1973) เป็นโรคที่พบทั่วไปในแหล่งปลูกงาทั้งในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เกิดโรคได้กับงาตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงระยะเก็บเกี่ยว ต้นงาที่เป็นโรคจะแสดงอาการยอดแตกเป็นพุ่ม ดอกเปลี่ยนเป็นสีเขียวและมีรูปร่างคล้ายใบ ทั้งนี้อาการของโรคขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโตของงาและระยะเวลาที่เชื้อเข้าทำลาย ถ้าเข้าเชื้อทำลายในระยะต้นเล็ก ต้นงาจะแสดงอาการแคระแกร็น มีความสูงเพียง 2 ใน 3 ของพืชปกติ ใบหงิก ระยะระหว่างปล้องสั้นกว่าปกติ ถ้าเชื้อเข้าทำลายเมื่อต้นโตก่อนออกดอก ดอกจะเป็นสีเขียว กลีบดอกหนา ติดฝักในตำแหน่งที่ต่ำกว่าปกติ (เตือนจิตต์ และคณะ, 2539) เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคสามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยจักจั่น *Orocius albicinetus, O. cillulosus* และ *Neoaliturus baematoceps* (Nakashima และ Murata, 1993) เมื่อถ่ายทอดเชื้อไปยังแพงพวยด้วยฝอยทอง (*Cuscuta* sp.) ทำให้แพงพวยแสดงอาการดอกเขียวและแตกพุ่มฝอย และมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดสูงถึง 90-100 เปอร์เซ็นต์ (สุภาพร, 2533 ; Sertkaya, 2000)

การจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่พบในงากับเชื้อไฟโตพลาสมาอื่นๆ โดยใช้ยีน 16 S rDNA นั้น Nakashima และคณะ (1995) รายงานว่าเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่พบในประเทศไทยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคในกลุ่มอาการแตกพุ่มแจ้ (witches' broom) คือโรค Gentian witches' broom มากกว่าโรคเหลืองเตี้ยของข้าว (Rice yellow dwarf) สุภาพร และคณะ (2540) ได้จัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาจากการเปรียบเทียบแบบแผน RFLP ของยีน 16S rDNA พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่เก็บจากจังหวัดนครปฐมมีความเหมือนกับเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของปอเทือง 100 เปอร์เซ็นต์ ต่อมาได้มีการจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากประเทศไทย 2 สายพันธุ์ คือ SEPN และ SEPT เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของปอเทืองสายพันธุ์ SUNP และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของผักเสี้ยนผีสายพันธุ์ CLP โดยวิเคราะห์และเปรียบเทียบแบบแผน RFLP ของยีน 16 S rRNA กับเชื้อไฟโตพลาสมาอีก 20 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อไฟโตพลาสมาทั้ง 4 สายพันธุ์จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII-A (Khan และคณะ, 2002)

ปัจจุบันมีการพัฒนาใช้ยีน *secY* มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกเชื้อในกลุ่ม aster yellows หรือ 16SrI group ในระดับ subgroup พบว่า ยีน *secY* มีความผันแปรมากกว่ายีน 16 S rRNA สามารถจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาบางชนิดที่เคยจัดอยู่ใน subgroup เดียวกันเมื่อใช้การจัดกลุ่มด้วยยีน 16 S rRNA ออกเป็น subgroup ใหม่ได้ เช่น Maize bushy stunt จากกลุ่มเดิม 16SrI-B เป็น 16SrI-L เป็นต้น (Lee และคณะ, 2006)

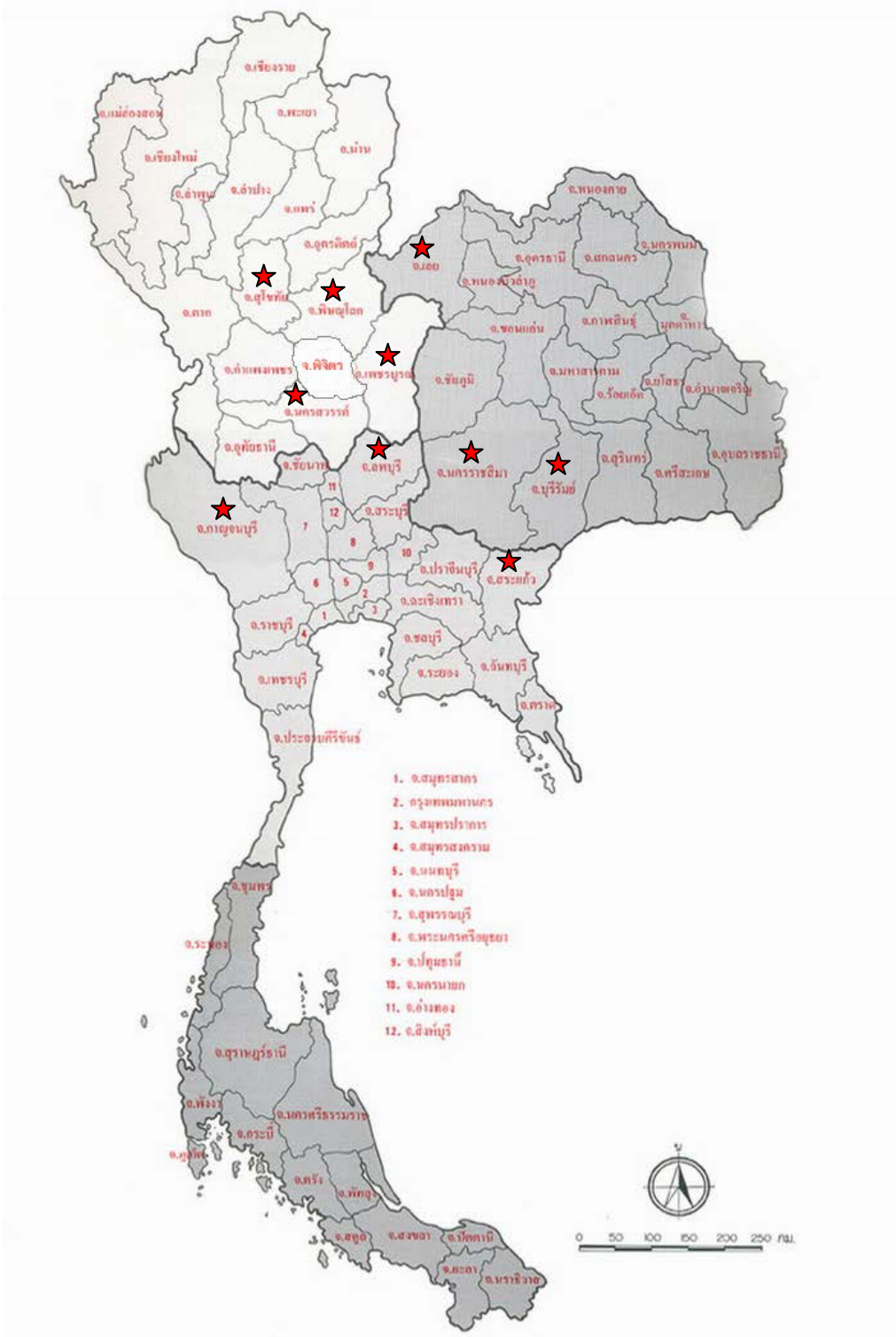
วิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างงาเป็นโรค

เก็บตัวอย่างงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยจากแหล่งปลูกงาที่มีการระบาดของโรค ครอบคลุมพื้นที่ปลูกงาที่สำคัญของประเทศไทยใน 4 ภาค (ตารางที่ 1) จาก 10 จังหวัด (ภาพที่ 1) ในช่วงปี พ.ศ. 2551-2553 จำนวน 55 ไอโซเลท 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 และ บุรีรัมย์: BR) ตัวเลข คือหมายเลขไอโซเลท

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลทงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยแยกตามจังหวัดในแต่ละภาคของประเทศไทย

ภาค	จังหวัด	จำนวน (ไอโซเลท)
ภาคเหนือตอนล่าง และภาคกลาง	นครสวรรค์	11
	พิษณุโลก	2
	ลพบุรี	7
	สุโขทัย	5
	เพชรบูรณ์	5
ภาคตะวันตก	กาญจนบุรี	6
ภาคตะวันออก	สระแก้ว	3
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	นครราชสีมา	5
	บุรีรัมย์	5
	เลย	6
รวมทั้งหมด		**55**



ภาพที่ 1 แสดงจังหวัด (★) ที่เก็บตัวอย่างงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยในประเทศไทย

2. ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

นำตัวอย่างงาที่แสดงอาการของโรคและงาปกติมาตรวจโดยทำการฝังตัวอย่างงาใน Spurr's resin (Spurr, 1969) มีขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยตัดเนื้อเยื่อพืชให้มีขนาดประมาณ 1 x2x3 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ทำ prefixation โดยแช่ตัวอย่างพืชใน 5% glutaraldehyde ที่เตรียมใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 นาน 1-3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง หรือข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตัวอย่างด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที หรือแช่ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส ทำ postfixation โดยแช่ตัวอย่างใน 2 % osmium tetroxide เตรียมในน้ำกลั่นซึ่งผสมกับ Dalton's solution (solution A:B =1:1; Solution A:4% $K_2Cr_2O_7$ เตรียมในน้ำ pH 7.2 Solution B : 3.4% NaCl) เตรียมในน้ำในอัตราส่วน 1 :1 แช่นาน 1-3 ชั่วโมงในน้ำแข็ง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydration) ด้วยการแช่ตัวอย่างใน ethanol ที่ความเข้มข้น 30 , 50, 70, 80, 90 และ 100% ความเข้มข้นละ 10 นาที ตามลำดับ ทำการแทนที่ด้วย Spurr's resin โดยแช่ในสารผสม 100% ethanol กับ n-butyl glycidyl ether (QY-1) อัตรา 1:1 นาน 15-30 นาที และย้ายลงในสาร QY-1 นาน 15-30 นาที ย้ายตัวอย่างแช่ในสาร QY-1 ผสม Spurr' s resin อัตรา 1:1 นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายมาลงในสาร Spurr' s resin 2 ครั้งๆ ละ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างใน Spurr' s resin (ประกอบด้วย ERL 4206 (vinyl cyclohexene dioxide) 4.6 มิลลิลิตร Quetol 653 2.8 มิลลิลิตร NSA (nonenyl succinic anhydride) 12.6 มิลลิลิตร S-1 DMAE (dimethylaminoethanol) 0.1 มิลลิลิตร) ไปใส่ในแบบพิมพ์ (Block) และทำให้ Spurr' s resin แข็งตัวโดยอบความร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 8 ชั่วโมงหรือข้ามคืน นำตัวอย่างมาตัด ด้วยเครื่อง ultramicrotome ให้มีความหนาประมาณ 500-1000 แองสตรอม (° A) ย้อมสีตัวอย่าง เพื่อเพิ่มความทึบแสงต่ออิเล็กตรอน โดยย้อมด้วย 5 % uranyl acetate ในน้ำ นาน 30-45 นาที และย้อมครั้งที่ 2 ด้วย 0.01 % lead citrate ในน้ำ นาน 2-10 นาที ตรวจดูเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (JEOL model JEM-1230)

3. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากงาที่แสดงอาการของโรคและงาปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ด โดยวิธี CTAB (Namba *et al.*, 1993) โดยมีขั้นตอนโดยสังเขปดังนี้ นำตัวอย่างงาส่วนก้านใบ 0.5 กรัม บดในไนโตรเจนเหลว เติม Extraction buffer (1.4M NaCl, 20mM EDTA pH 8.0, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 2% 2-mercaptoethanol, 2% PVP-1000, 2% SDS, 2% CTAB) 600 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) 600 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม isopropanol 0.6 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน

โดยการพลิกหลอดไปมา เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หมุนเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง คว่ำให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนดีเอ็นด้วย 1X TE buffer (10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA) 100 ไมโครลิตร เติม phenol:chloroform (1:1) 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส เติม chloroform 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส เติม 3M sodium acetate 0.1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน เติม absolute ethanol 2 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน ตั้งบนน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอน ปล่อยให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย 1X TE buffer 20 ไมโครลิตร ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer (44.5mM Tris base, 44.5mM boric acid, 1mM EDTA, pH 8.0) ด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย ethidium bromide solution (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า และตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และบันทึกภาพด้วยเครื่อง Gel Documentation (Syngene®) และเก็บดีเอ็นเอไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา PCR ในขั้นตอนต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณยีนของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาด้วยเทคนิค PCR

4.1 <u>การเพิ่มปริมาณยีน</u> 16S rRNA

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากงาเป็นโรค และ งาปกติมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 ซึ่งเฉพาะเจาะจงสำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาชนิดต่างๆ (Lee *et al*, 1993) ส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x PCR buffer 10 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 mM) 8 ไมโครลิตร deoxynucleotide triphosphate (200 mM) 8 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ R16F2 และ R16R2 (20 pmol/ml) อย่างละ 2 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase (2 u/ml) 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 68 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากพืชเป็นโรค (20 ng/ml) 1 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำที่ 94 องศาเซลเซียส 2 นาที 1 รอบ และ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 50 องศาเซลเซียส 2 นาที 72 องศาเซลเซียส 3 นาที 35 รอบ ตามด้วย 72 องศาเซลเซียส 10 นาที อีก 1 รอบ โดยใช้เครื่อง DNA thermal cycler นำดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis

ชุดไพรเมอร์ R16F2/R16R2

R16F2 : 5'-AGG ACT GCT GCT AAG ACT GG-3'

R16R2 : 5'-TGA GGG GCG GTG TGT AAC AAC CCC G- 3'

โดยใช้ดีเอ็นเอจากอ้อยที่เป็นโรคใบขาวเป็นปฏิกิริยาควบคุมบวก (positive control) และดีเอ็นเอจากงาปกติเป็นปฏิกิริยาควบคุมลบ (negative control)

4.2 <u>การเพิ่มปริมาณยีน *secY*</u>

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากงาเป็นโรค และงาปกติมาใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ AYsecYF1 / AYsecYR1 (Lee *et al*, 2006) ส่วนผสมและขั้นตอนสำหรับปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA

ชุดไพรเมอร์ AYsecYF1 / AYsecYR1

AYsecYF1 : 5' – CAG CCA TTT TAG CAG TTG GTG G - 3'

AYsecYR1 : 5' – CAG AAG CTT GAG TGC CTT TAC C - 3'

โดยใช้ดีเอ็นเอจากแพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอยเป็นปฏิกิริยาควบคุมบวก (positive control) และดีเอ็นเอจากงาปกติเป็นปฏิกิริยาควบคุมลบ (negative control)

5. การโคลนยีน

นำไอโซเลทที่พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 และ 1,300 คู่เบส จากการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และ *sec*Y ตามลำดับ เพื่อโคลนยีนและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเลือกมา 15 ไอโซเลท เพื่อเป็นตัวแทนจากแต่ละภาคและในทุกๆ จังหวัด ดังนี้ จากภาคเหนือตอนล่าง และภาคกลาง 7 ไอโซเลท ภาคตะวันตก 2 ไอโซเลท และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 6 ไอโซเลท

5.1 <u>การสกัดดีเอ็นเอจาก agarose gel</u>

แยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% agarose gel และตัดเจล บริเวณที่แถบดีเอ็นเอที่ต้องการ ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งหาน้ำหนักเจลที่ตัดได้ไม่ควรเกิน 0.4 กรัม จากนั้นใช้ชุดสำเร็จรูป GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas, Ontario, Canada) โดยเติม binding buffer 1 เท่าของน้ำหนักเจล บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที (กลับหลอดเป็นครั้งคราวเพื่อให้เจลละลายจนหมด) เติม isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล กลับหลอดขึ้นลงเบาๆ ย้ายของเหลวทั้งหมดลงคอลัมน์ ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งของเหลวด้านล่าง เติม binding buffer 100 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งของเหลวด้านล่าง เติม wash buffer 700 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งของเหลวด้านล่าง หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 1 นาที ย้ายคอลัมน์ลงในหลอด

ทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer 10 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 3 นาที และเติม elution buffer 10 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 3 นาทีอีกครั้ง ตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis

5.2 <u>การเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับพลาสมิดพาหะ pGEM®-T Easy Vector</u>

ทำการเชื่อมต่อดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก agarose gel กับพลาสมิดพาหะ pGEM®-T Easy Vector (Promega, WI, USA) โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยารวม 10 ไมโครลิตร ดังนี้ 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase 5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอที่สกัดจากเจล (20 ng/µl) 2 ไมโครลิตร น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 1 ไมโครลิตร pGEM®-T Vector (50ng/µl) 1 ไมโครลิตร T4 DNA Ligase (3 weiss unit/µl) 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

5.3 <u>การย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน</u>

ทำการย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) นำหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน (*E. coli* DH5α competent cell) 100 ไมโครลิตร มาละลายบนน้ำแข็ง นาน 5 นาที จากนั้น เติม ligation mix ลงไป ผสมเบาๆ จนเข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 30 นาที บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส 90 วินาที วางบนน้ำแข็งทันที 5 นาที เติมอาหารเหลว LB (Luria-Bertani) 700 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ 200 รอบต่อนาที 1 ชั่วโมง 30 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที 1 นาที เทอาหารทิ้ง และเติมอาหารเหลว LB 150 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนของเชื้อ ดูดสารแขวนลอยของเชื้อมา 50 ไมโครลิตร spread บนจานอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างละ 40 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง

5.4 <u>การคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสม</u>

คัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสม โดยวิธี Blue-white colony screening โดยใช้ไม้จิ้มฟันนึ่งฆ่าเชื้อ เขี่ยโคโลนีที่มีสีขาวและนำมาขีดเบาๆ บนอาหารแข็ง LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อใช้เป็น master plate และนำไม้จิ้มฟันที่เหลือเชื้อติดอยู่จุ่มลงในน้ำนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการตรวจสอบโคโลนี

ด้วยเทคนิค Bio-PCR โดยมีองค์ประกอบและสภาวะของปฏิกิริยาเหมือนการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายนั้นๆ ตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis

5.5 **<u>สกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม</u>**

ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ให้ผลบวกจากการคัดเลือกโคโลนีด้วยเทคนิค Bio-PCR จาก master plate นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ 200 รอบต่อนาที 13 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมโดยใช้ GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Ontario, Canada) โดยเติม resuspension solution (+RnaseA) 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อละลายตะกอนของเชื้อ เติม lysis solution 250 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นลงเบาๆ 6 ครั้ง เติม neutralization solution 350 ไมโครลิตร พลิกหลอดขึ้นลงเบาๆ 6 ครั้ง หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที 5 นาที ย้ายของเหลวด้านบนลงคอลัมน์ หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งของเหลวด้านล่าง เติม wash solution 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งของเหลวด้านล่าง หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที 1 นาที เติม wash solution 500 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที 1 นาที ทิ้งของเหลวด้านล่าง หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที 1 นาที ย้ายคอลัมน์ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม elution buffer 20 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที 2 นาที และเติม elution buffer20 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที 2 นาทีอีกครั้ง ตรวจสอบผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis และนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งวิเคราะห์ทั้งสองทิศทาง (T7 และ SP6 ของ pGEM®-T Easy) ต่อ 1 ตัวอย่าง

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จัดการข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์ (computer analysis) ดังนี้

1) ตัดชิ้นส่วนที่เป็นดีเอ็นเอพาหะออกจากดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยโปรแกรม Editseq ของโปรแกรม DNASTAR (Laser gene, WI, USA) โดยใช้โปรแกรม VecScreen (<u>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html</u>) ในการตรวจหาดีเอ็นเอพาหะ

2) เชื่อมต่อดีเอ็นเอจากทั้งสองทางด้วยโปรแกรม SeqMan ของโปรแกรม DNASTAR

3) ตรวจสอบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (<u>http://blast.ncbi.nlm.nih.gov /Blast.cgi</u>)

7. การจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมา

7.1 การจัดกลุ่ม

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html) สร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) จากค่าเฉลี่ยของระยะห่างทางพันธุกรรม (pairwise distance) ที่ใช้โมเดล Kimura 2-parameter (K80, K2P) ในการคำนวณด้วยโปรแกรม MEGA 4.1 (Tamura *et al*., 2007) สร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์โดยวิธี neighbor-joining วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ค่า bootstrap 1000 ซ้ำ และคำนวณหาค่าความคล้ายคลึง (similarity) ของสองลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบกัน โดยบอกค่าความคล้ายคลึงเป็นค่าความสัมพันธ์ของสองลำดับนิวคลีโอไทด์ (relative percentage proportion) ดังนี้

ความคล้ายคลึง (%) = (1- ค่าเฉลี่ยของระยะห่างทางพันธุกรรม) x 100

7.1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน ในแต่ละกลุ่ม 15 กลุ่ม (16SrI-16SrXV) เชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่ม-ฝอยของงาที่มีรายงานจากทั้งในและนอกประเทศ (ตารางที่ 2)

7.1.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY*

เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน ในแต่ละกลุ่ม 11 กลุ่ม เชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาที่มีรายงานในฐานข้อมูล (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงข้อมูลของเชื้อไฟโตพลาสมาที่นำมาใช้เป็นตัวแทนในการจัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาที่ศึกษา โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

Organisms	GenBank Accession No.	Country/state	Strain	Groups	Authors
Onion yellows phytoplasma	D12569	Japan	-	16SrI	Namba, S. *et al*., 2002
Peanut witches'-broom phytoplasma	L33765	-	-	16SrII	Gundersen, D. E. *et al*., 1994
Western X phytoplasma	L04682	-	-	16SrIII	Schneider, B. *et al*., 1994
Coconut lethal yellowing phytoplasma	U18747	-	Coconut lethal yellowing MLO	16SrIV	Harrison, N. A. *et al*., 1994
Candidatus Phytoplasma ulmi	AF189214	USA/New York	EY1	16SrV	Dally, E. L., 1999
Candidatus Phytoplasma trifolii	AY390261	Canada/Alberta	CP	16SrVI	Hiruki, C. and Wang, K., 2003
Candidatus Phytoplasma fraxini	AF189215	USA/New York	AshY1	16SrVII	Dally, E. L. *et al*., 1999
Loofah witches'-broom phytoplasma	AF086621	-	-	16SrVIII	Ho, K. -C. and Tsai, C. C., 2001
Pigeon pea witches'-broom phytoplasma	AF248957	-	PPWB	16SrIX	Dally, E. L. *et al*., 2000
Candidatus Phytoplasma mali	AF248958	-	APU	16SrX	Dally, E. L. *et al*., 2000

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Organisms	GenBank Accession No.	Country/state	Strain	Groups	Authors
Candidatus Phytoplasma oryzae	D12581	Japan	RYD-J	16SrXI	Namba, S. *et al*., 1992
Candidatus Phytoplasma solani	AF248959	-	STOL	16SrXII	Dally, E. L. *et al*., 2000
periwinkle virescence phytoplasma	AF248960	-	MPV	16SrXIII	Dally, E. L. *et al*., 2000
Candidatus Phytoplasma cynodontis	AJ550984	Italy	-	16SrXIV	Marcone, C., *et al*. 2004
Candidatus Phytoplasma brasiliense	AF147708	-	HibWB26	16SrXV	Montano, H. G., *et al*. 2001
Sesame phyllody phytoplasma	EU072504	Oman	SIF	16SrII	Khan, A. J., *et al*. 2007
Sesame phyllody phytoplasma	EU072505	Oman	SIL	16SrII	Khan, A. J., *et al*. 2007
Sesame phyllody phytoplasma	EF193357	Thailand	SEPN	16SrII	Martini, M. and Lee, I.-M., 2006
Sesame phyllody phytoplasma	GU004373	Thailand	SEPT	16SrII	Lee, I. -M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Sesame phyllody phytoplasma	AB558132	Myanmar/Yezin	SP-MYAN	16SrI	Jung, H., *et al*. 2010
Acholeplasma laidlawii	M23932	-		Out group	Weisburg, W. G., *et al*. 1989

ตารางที่ 3 แสดงข้อมูลของเชื้อไฟโตพลาสมาที่นำมาใช้เป็นตัวแทนในการจัดกลุ่มเชื้อไฟโตพลาสมาที่ศึกษา โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY*

Organisms	GenBank Accession No.	Country/state	Strain	Groups	Authors
Onion yellows phytoplasma	NC_005303	-	OY-M	SecY-I	Oshima, K. *et al.*, 2003
Peanut witches'-broom phytoplasma	GU004331	Taiwan		SecY-II	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Peach X-disease phytoplasma	GU004327	Canada	CX	SecY-III	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Coconut lethal yellows phytoplasma	GU004320	USA/ Florida	LYF	SecY-IV	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Candidatus Phytoplasma ulmi	GU004330	USA/ New York	EY1	16SrV	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Candidatus Phytoplasma trifolii	GU004315	Canada	CP	SecY-VI	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Candidatus Phytoplasma fraxini	GU004329	USA/ New York	AshY	SecY-VII	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Loofah witches'-broom phytoplasma	GU004319	Taiwan	LfWB	SecY-VIII	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Candidatus Phytoplasma mali	NC_011047	-	AT	SecY-X	Kube, M., *et al.*, 2007
Candidatus Phytoplasma australiense	NC_010544	-	-	SecY-XII	Kube, M., *et al.*, 2007

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Organisms	GenBank Accession No.	Country/state	Strain	Groups	Authors
Mexican periwinkle virescence phytoplasma	GU004336	Mexico	MPV	SecY-XIII	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Sesame phyllody phytoplasma	GU004322	Thailand	SEPT	SecY-II	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Sesame phyllody phytoplasma	GU004362	Thailand	SEPN	SecY-II	Lee, I.-M. and Bottner-Parker, K. D., 2009
Acholeplasma laidlawii PG-8A	NC_010163	-	PG-8A	Out group	Lazarev, V. N., *et al*., 2007

7.2 **<u>การจัดกลุ่มย่อย</u>**

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ โดยวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *in silico* RFLP

7.2.1 **ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน** 16S rRNA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน F2nR2 ของยีน 16S rRNA ซึ่งเป็นบริเวณที่เพิ่มปริมาณได้จากเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *in silico* RFLP ด้วยโปรแกรม *i*PhyClassifier (http://www.ba.ars.usda.gov/data/mppl/iPhyClassifier.html) โดยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 17 ชนิด (*Alu*I, *Bam*HI, *Bfa*I, *Bst*UI (*Tha*I), *Dra*I, *Eco*RI, *Hae*III, *Hha*I, *Hin*fI, *Hpa*I, *Hpa*II, *Kpn*I, *Sau3*AI (*Mbo*I), *Mse*I, *Rsa*I, *Ssp*I และ *Taq*I) ซึ่งผลที่ได้คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริง (virtual RFLP)โดยโปรแกรมจะเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้กับเชื้อที่เป็นตัวแทนกลุ่มย่อยในฐานข้อมูล GenBank หากมีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (similarity coefficient) > 0.97 จึงจัดอยู่ในกลุ่มย่อยเดียวกัน ตามเกณฑ์ที่มีรายงานโดย Wei *et al*. (2008) ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (Nei and Li, 1979; Lee *et al*., 1998) คำนวณได้จาก

สัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง $(F) = 2N_{xy}/(N_x+N_y)$

โดยที่ N_x คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของสายพันธุ์อ้างอิง

N_y คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดของสายพันธุ์ที่ศึกษา

N_{xy} คือ จำนวนแถบดีเอ็นเอทั้งหมดที่เหมือนกันของทั้งสองสายพันธุ์

7.2.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค *in silico* RFLP ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench 5 (CLC bio, Aarhus N, Denmark) โดยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด (*Alu*I, *Bfa*I, *Dde*I, *Hha*I, *Hinf*I, *Hpa*II, *Mse*I, *Rsa*I, และ *Tsp509*I) เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอกับตัวแทนกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม SecY-I ตามรายงานของ Lee *et al*. (2006)

ผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างงาเป็นโรค

จากการสำรวจสภาพแปลงปลูกงาใน 10 จังหวัด ได้แก่ ลพบุรี นครราชสีมา เพชรบูรณ์ สระแก้ว สุโขทัย นครสวรรค์ กาญจนบุรี เลย พิษณุโลก และบุรีรัมย์ ลักษณะอาการของโรคที่พบคือ แตกพุ่มฝอยบริเวณยอด ใบมีขนาดเล็กลงลักษณะคล้ายเกล็ด ไม่ติดดอก หรือหากติดดอก ดอกจะมีสีเขียวคล้ายใบ กลีบดอกหนา เกสรเปลี่ยนรูปร่าง เป็นหมัน และไม่ติดฝัก และยังพบอาการ อื่นๆ ด้วย เช่น อาการเหลือง ใบและลำต้นหงิกงอ แตกกิ่งย่อย เตี้ยแคระ ยอดแบน ฝักลีบเล็ก ฝักแตก และเมล็ดในฝักงอก และในแต่ละต้นพบ ทั้งอาการเดี่ยวๆ หรือพบหลายอาการร่วมกัน (ภาพที่ 2-7 และตารางที่ 4) ซึ่งลักษณะอาการที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของต้นงาที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย (เตือนจิตต์ และคณะ, 2539) ซึ่งอาการที่กล่าวมาล้วนแล้วแต่เป็นสาเหตุการลดลงของผลผลิตตามรายงานของ Vyas (1981) และลักษณะอาการของโรคที่พบในแต่ละลักษณะไม่มีความสอดคล้องกับชนิดของพันธุ์งา (ตารางที่ 4)

ภาพที่ 2 สภาพแปลงงาในจังหวัดลพบุรี (ก) แสดงอาการแตกพุ่มฝอยบริเวณยอด (ข) และอาการดอกเขียว (ค)

ภาพที่ 3 สภาพการระบาดของโรคแตกพุ่มฝอยในแปลงงาใน จังหวัดนครราชสีมา (ก) แสดงอาการดอกเขียว (ข) อาการลำต้นแบน ติดฝักน้อยและฝักลีบ (ค)

ภาพที่ 4 สภาพแปลงงาในจังหวัดเพชรบูรณ์ (ก) อาการแตกพุ่มฝอยบริเวณยอด (ข) และอาการดอกเขียว (ค)

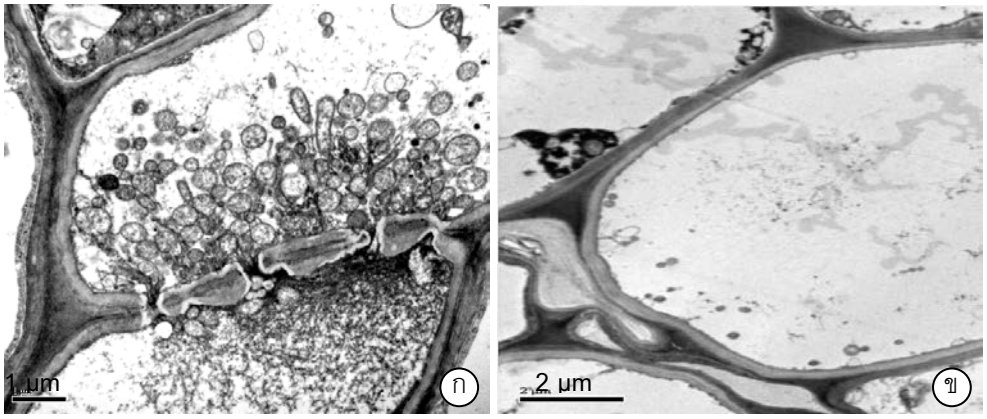
ภาพที่ 5 โรคแตกพุ่มฝอยในแปลงงาในจังหวัดสุโขทัย งาแสดงอาการแตกพุ่มฝอย(ก) อาการดอกเขียว (ข) และบางต้นเริ่มแสดงอาการดอกเขียว (ค)

ภาพที่ 6 สภาพแปลงงาในระยะติดฝักในจังหวัดนครสวรรค์ (ก) แปลงที่มีการระบาดรุนแรงในระยะเก็บเกี่ยว (ข) อาการดอกเขียวที่พบในแปลง (ค)

ภาพที่ 7 โรคแตกพุ่มฝอยในแปลงงาในจังหวัดกาญจนบุรี (ก) งาอาการแตกพุ่มฝอยร่วมกับดอกเขียว (ข) และบางต้นเริ่มแสดงอาการแตกพุ่มฝอยบริเวณยอดและมีอาการต้นแบนร่วมด้วย (ค)

2. ตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน

จากการตรวจเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน พบเชื้อไฟโต-พลาสมาบริเวณท่ออาหารของต้นงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอย ซึ่งมีรูปร่างและขนาดหลากหลายตั้งแต่กลม รี และค่อนข้างยาว ขนาดประมาณ 100-1,000 นาโนเมตร และไม่พบเชื้อไฟโตพลาสมาจากตัวอย่างงาปกติ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 ภาพตัดขวางของเซลล์ท่ออาหารของงาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบเชื้อไฟโตพลาสมาในงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอย (ก) และไม่พบเชื้อในงาปกติ (ข)

3. การเพิ่มปริมาณยีนเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาด้วยเทคนิค PCR

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาจากงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยทั้งหมด 55 ไอโซเลท ด้วยเทคนิค PCR และตรวจผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์ R16F2/R16R2 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,200 คู่เบส ใน 44 ไอโซเลท ส่วนคู่ไพรเมอร์ AYsecYF1/AYsecYR1 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,300 คู่เบส จำนวน 18 ไอโซ-เลท (ตารางที่ 4 และภาพที่ 9-26) และไม่พบแถบดีเอ็นเอจากการใช้คู่ไพรเมอร์ทั้ง สองในตัวอย่างงาปกติ ส่วนคู่ไพรเมอร์ AYsecYF1/AYsecYR1 พบแถบดีเอ็น เอเพียง 18 ไอโซเลทนั้น เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้ ออกแบบมาจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Aster yellows phytoplasma (AY) และ Onion yellows phytoplasma (OY) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI จึงเป็นไปได้ว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะกับเชื้อในกลุ่ม 16SrI เท่านั้น (Hodgetts and Dickinson, 2010)

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะอาการของโรคแตกพุ่มฝอยของงา และผลการเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA และ *secY* ด้วยเทคนิค PCR

จังหวัด/ไอโซเลท	**ชนิดงา (สีเมล็ด)**	**ลักษณะอาการ**	**ผลการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR**	
			16S rRNA	*secY*
ลพบุรี: LB				
SELB1	แดง	ยอดแบน	-	-
SELB2	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
SELB3	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
SELB4	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
SELB5	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
SELB7	แดง	ดอกเขียว	+	-
SELB8	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
นครราชสีมา: NM				
SENM1	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	+
SENM2	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
SENM3	ขาว	ยอดแบน	-	-
SENM4	ขาว	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
SENM5	ขาว	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
สระแก้ว: SK				
SESK1	ดำ	ยอดแบน	-	-
SESK2	ดำ	ยอดแบน	-	-
SESK3	ดำ	ยอดแบน	-	-
สุโขทัย: ST				
SEST1*	แดง	ดอกเขียว	+	+
SEST2	แดง	ดอกเขียว ใบเหลือง	+	+
SEST3	แดง	ดอกเขียว ฝักแตก	+	+
SEST4	แดง	ดอกเขียว	+	+
SEST5	แดง	ดอกเขียว	+	+
เพชรบูรณ์: PB				
SEPB1	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
SEPB2*	แดง	แตกพุ่มฝอย ใบเหลือง	+	-
SEPB3	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

จังหวัด/ไอโซเลท	ชนิดงา (สีเมล็ด)	ลักษณะอาการ	ผลการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR	
			16S rRNA	*secY*
เพชรบูรณ์: PB				
SEPB4	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	-
SEPB5	แดง	ดอกเขียว	+	-
นครสวรรค์: NW				
SENW1	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	+
SENW2	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ลำต้นหงิกงอ	+	+
SENW3	แดง	ดอกเขียว ใบเหลือง	+	-
SENW4	แดง	ดอกเขียว ลำต้นหงิกงอ	+	+
SENW5	แดง	ดอกเขียว ลำต้นหงิกงอ	+	+
SENW6	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	+
SENW7	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ลำต้นหงิกงอ	+	+
SENW9	แดง	ดอกเขียว	+	-
SENW10	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลืองหงิกงอ	+	-
SENW11	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
SENW12	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
กาญจนบุรี: KB				
SEKB1	ดำ	ยอดแบน	-	-
SEKB2	ดำ	ยอดแบน	-	-
SEKB3	ดำ	ยอดแบน	-	-
SEKB4	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ลำต้นเตี้ยแคระ	+	-
SEKB5	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	-
SEKB6	ดำ	ยอดแบน	-	-
เลย: LE				
SELE1	ขาว	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	+
SELE2	ดำ	ดอกเขียว ลำต้นเตี้ยแคระ	+	-
SELE3	ขาว	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ลำต้นเตี้ยแคระ	+	-
SELE4	ขาว	ยอดแบน	-	-
SELE5	ขาว	แตกพุ่มฝอย	+	-
SELE6	ขาว	แตกพุ่มฝอย	+	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

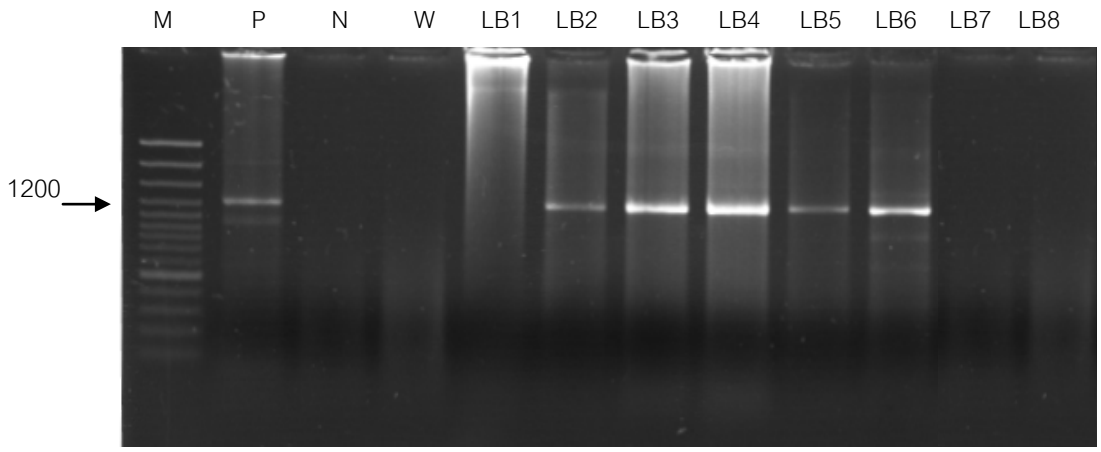
จังหวัด/ไอโซเลท	**ชนิดงา (สีเมล็ด)**	**ลักษณะอาการ**	**ผลการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR**	
			16S rRNA	***secY***
พิษณุโลก: PL				
SEPL2	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	+
SEPL3	แดง	แตกพุ่มฝอย	+	+
บุรีรัมย์: BR				
SEBR1	ดำ	ยอดแบน	-	-
SEBR2	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	+	-
SEBR3	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	+	+
SEBR4	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ฝักแตก เมล็ดในฝักงอก	+	+
SEBR5	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ฝักแตก เมล็ดในฝักงอก	+	+

หมายเหตุ + คือ สามารถเพิ่มปริมาณได้

- คือ ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้

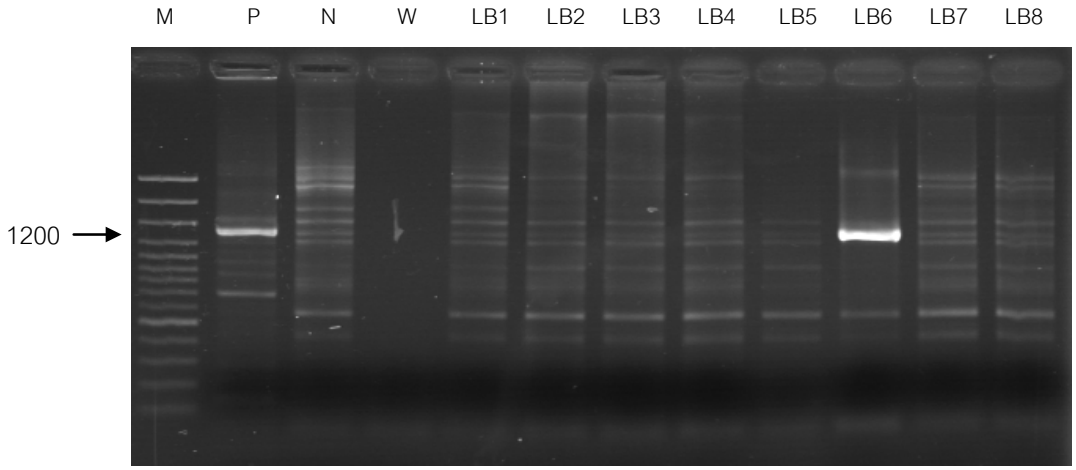
* คือ ไอโซเลทที่นำมาตรวจเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ตัวเข้ม คือ ตัวแทนไอโซเลทที่ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์



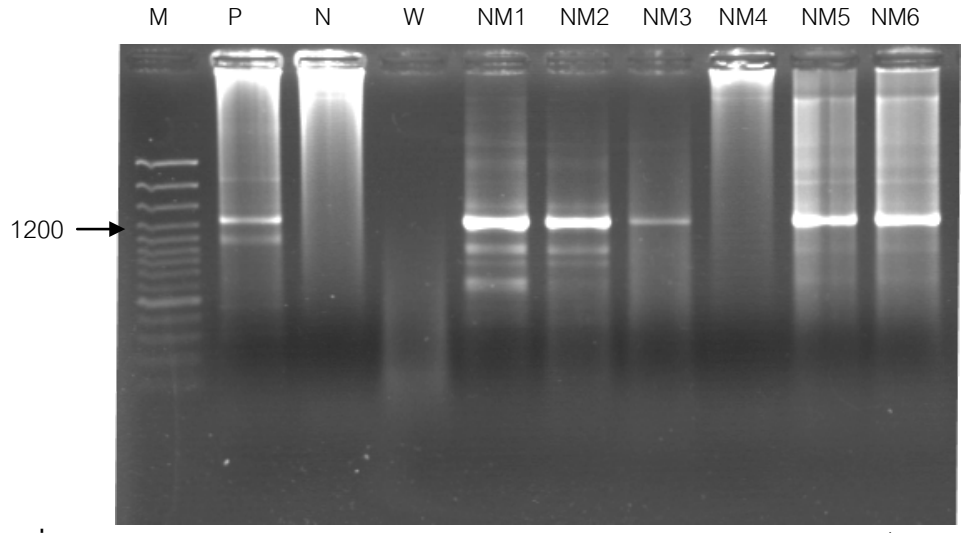
ภาพที่ 9 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

	แถบ M	DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ	P	Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)
	แถบ N	Negative control (งาปกติ)
แถบ	W	น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ	LB1-LB8	งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดลพบุรี



ภาพที่ 10 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ	M	DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
	แถบ P	Positive control (แพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอย)
	แถบ N	Negative control (งาปกติ)
แถบ	W	น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ	LB1-LB8	งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดลพบุรี



ภาพที่ 11 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

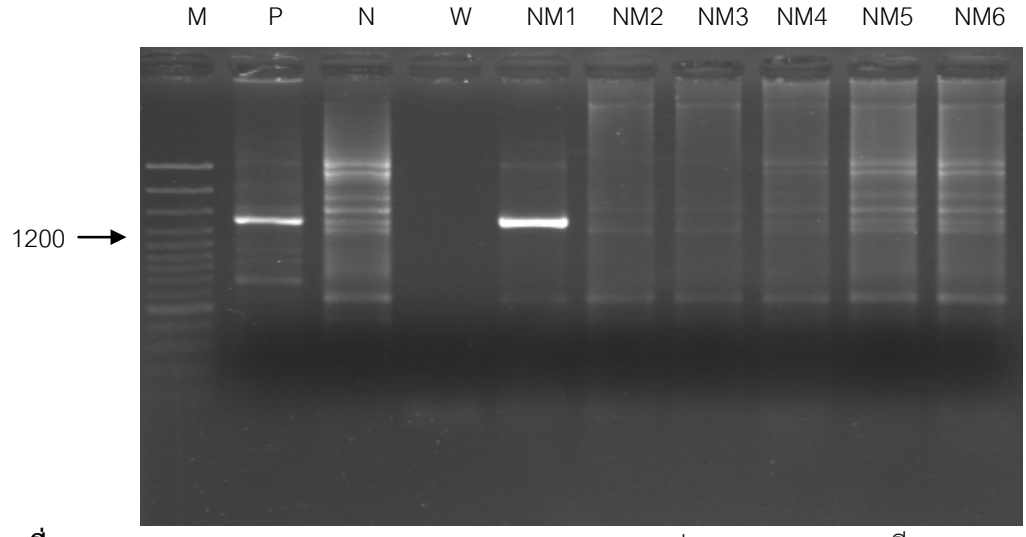
แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)

แถบ P Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)

แถบ N Negative control (งาปกติ)

แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

แถบ NM1-NM6 งา ที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดนครราชสีมา



ภาพที่ 12 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

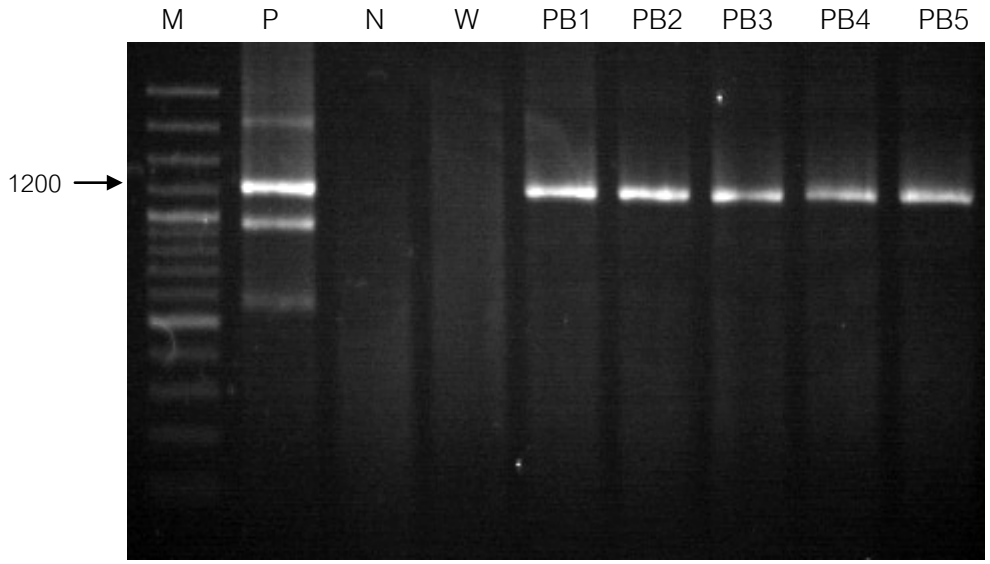
แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)

แถบ P Positive control (แพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอย)

แถบ N Negative control (งาปกติ)

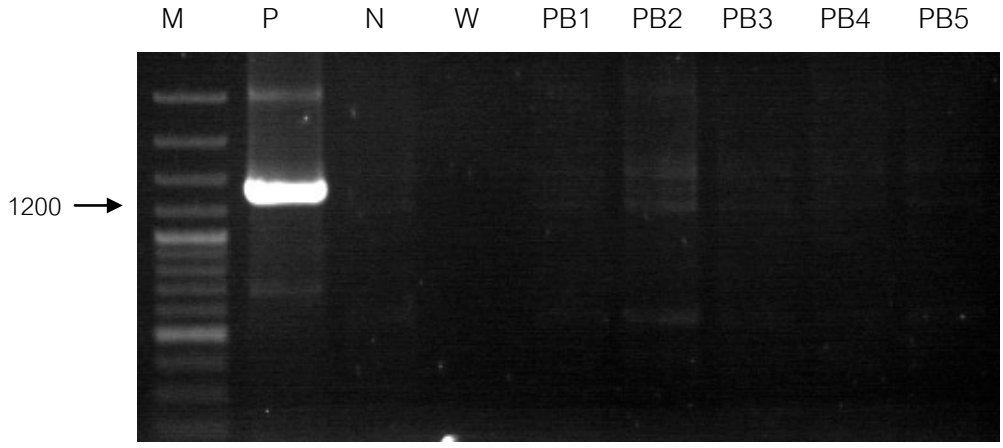
แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

แถบ NM1-NM6 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดนครราชสีมา



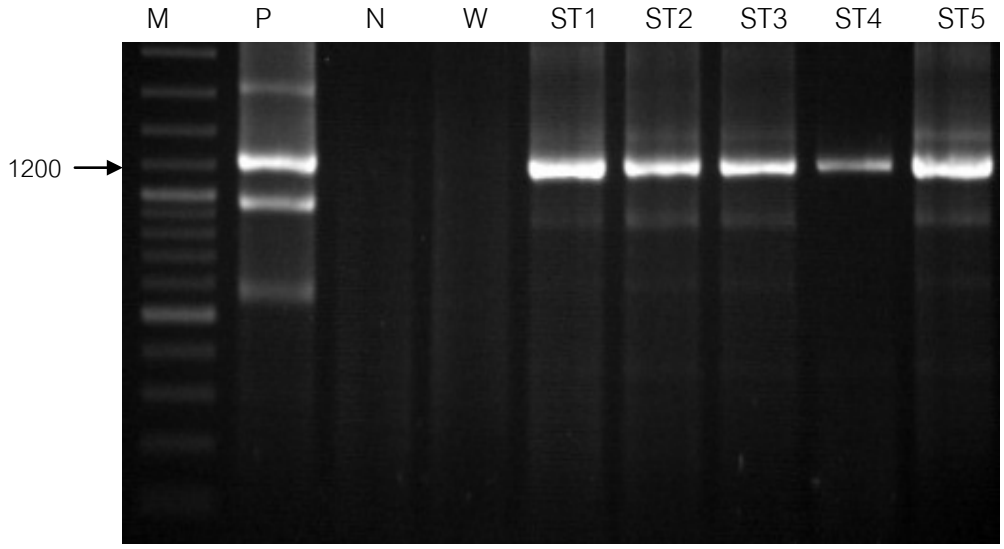
ภาพที่ 13 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M	DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P	Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)
แถบ N	Negative control (งาปกติ)
แถบ W	น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ PB1-PB5	งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดเพชรบูรณ์



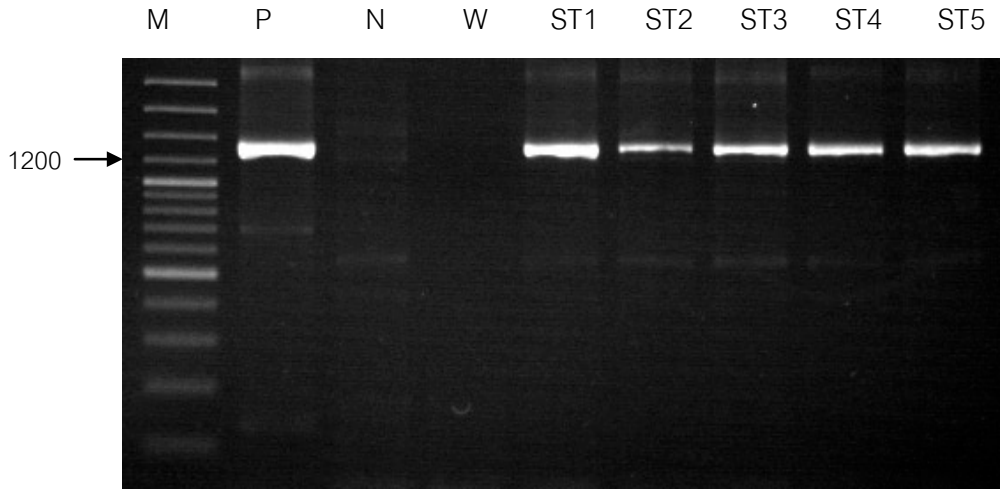
ภาพที่ 14 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M	DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P	Positive control (แพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอย)
แถบ N	Negative control (งาปกติ)
แถบ W	น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ PB1-PB5	งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดเพชรบูรณ์



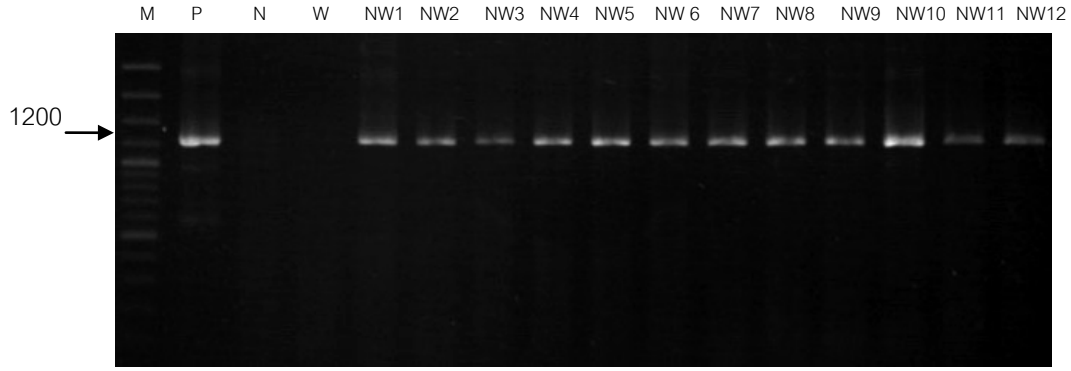
ภาพที่ 15 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)
แถบ N Negative control (งาปกติ) แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ ST1-ST5 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดสุโขทัย



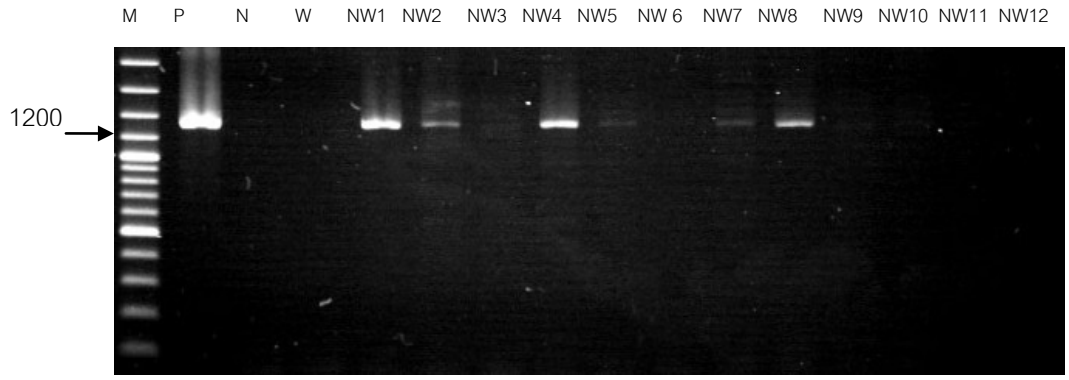
ภาพที่ 16 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (แพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอย)
แถบ N Negative control (งาปกติ)
แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ ST1-ST5 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดสุโขทัย



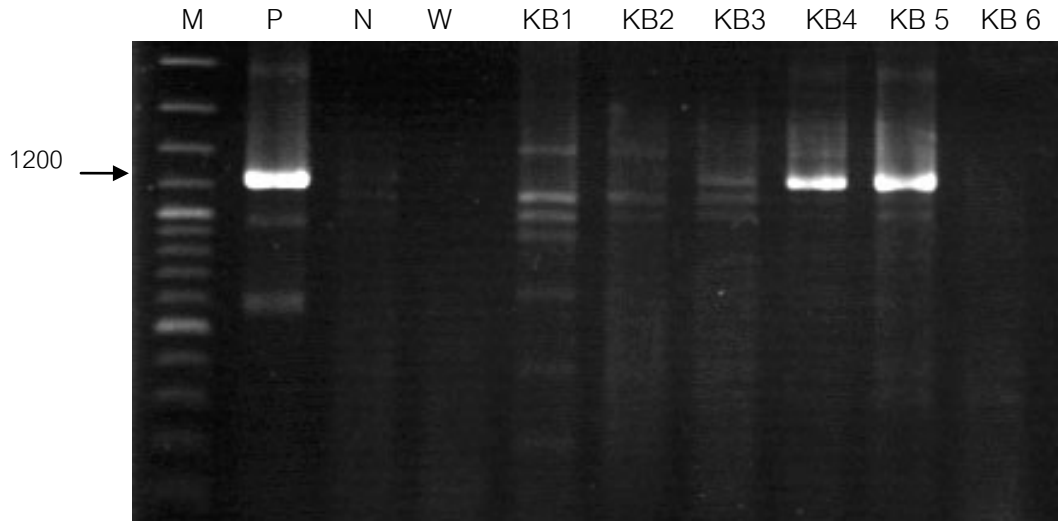
ภาพที่ 17 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)
แถบ N Negative control (งาปกติ) แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ NW1-NW12 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดนครสวรรค์



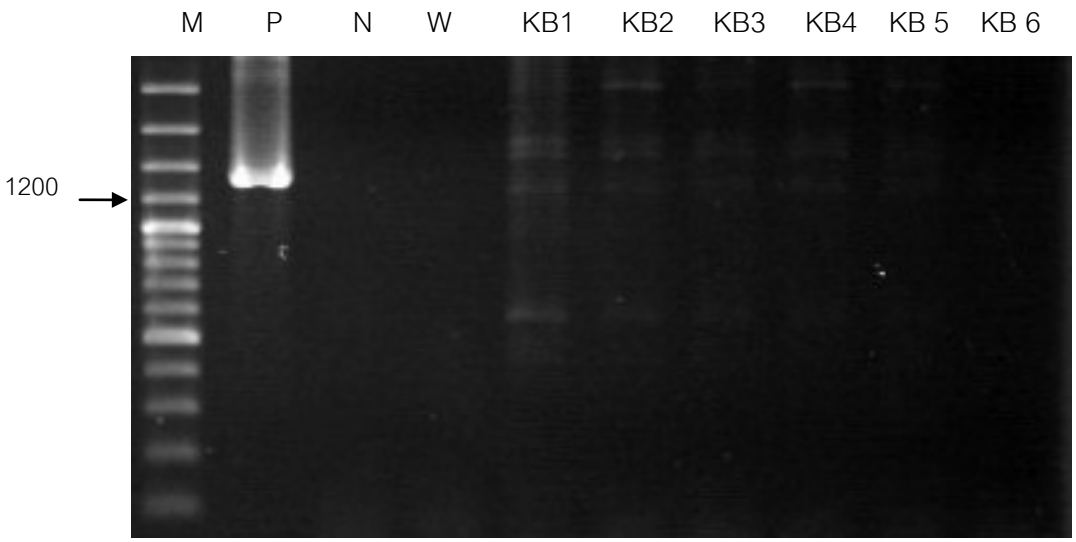
ภาพที่ 18 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (แพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอย)
แถบ N Negative control (งาปกติ)
แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ NW1-NW12 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดนครสวรรค์



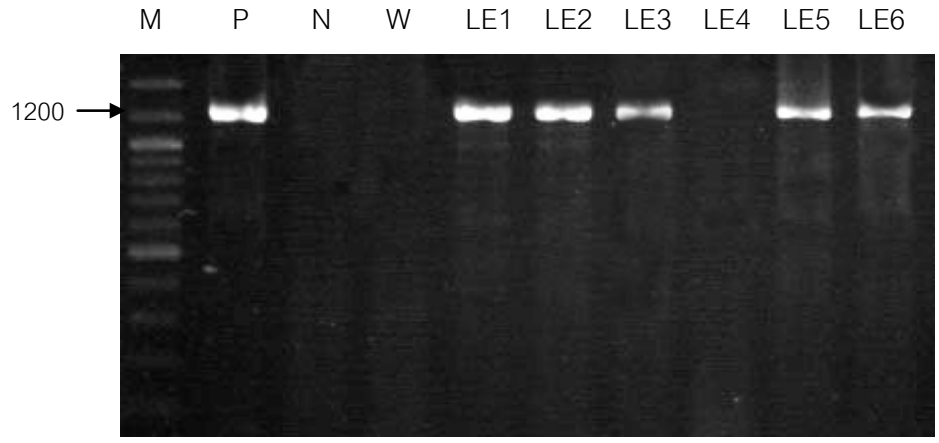
ภาพที่ 19 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)
แถบ N Negative control (งาปกติ) แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ KB1-KB6 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดกาญจนบุรี



ภาพที่ 20 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (แพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอย)
แถบ N Negative control (งาปกติ)
แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ KB1-KB6 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดกาญจนบุรี



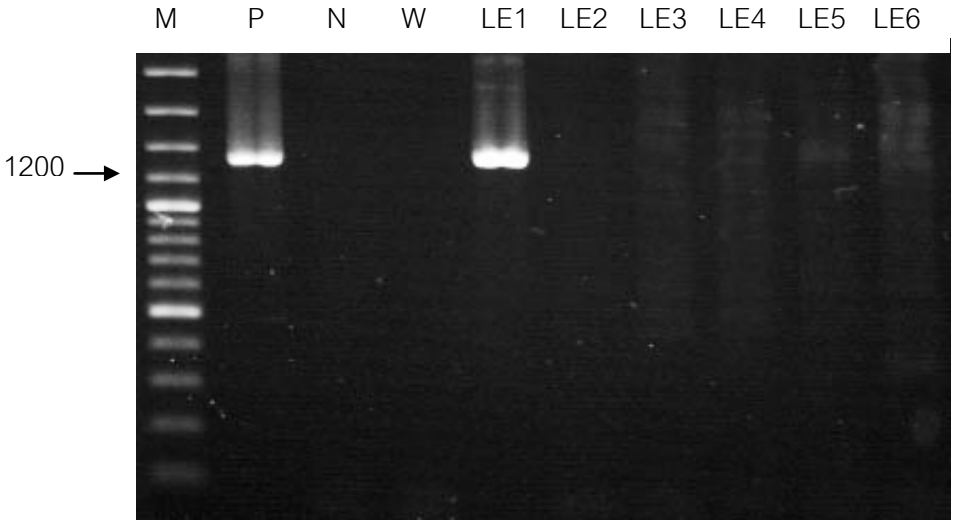
ภาพที่ 21 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)

แถบ P Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)

แถบ N Negative control (งาปกติ) แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

แถบ LE1-LE6 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดเลย



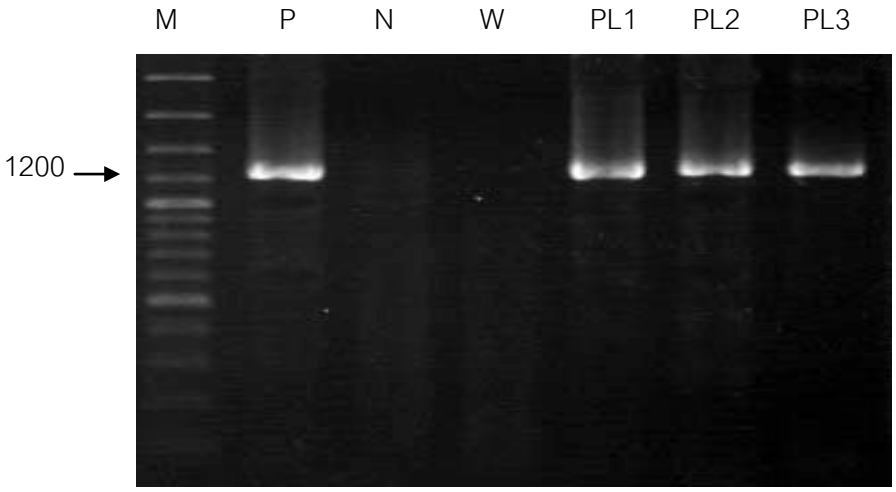
ภาพที่ 22 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)

แถบ P Positive control (แพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอย)

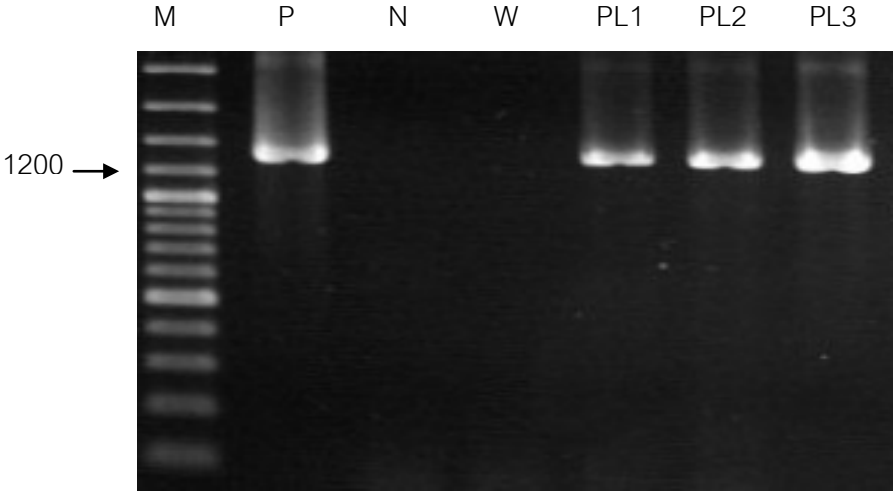
แถบ N Negative control (งาปกติ) แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ

แถบ LE1-LE6 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดเลย



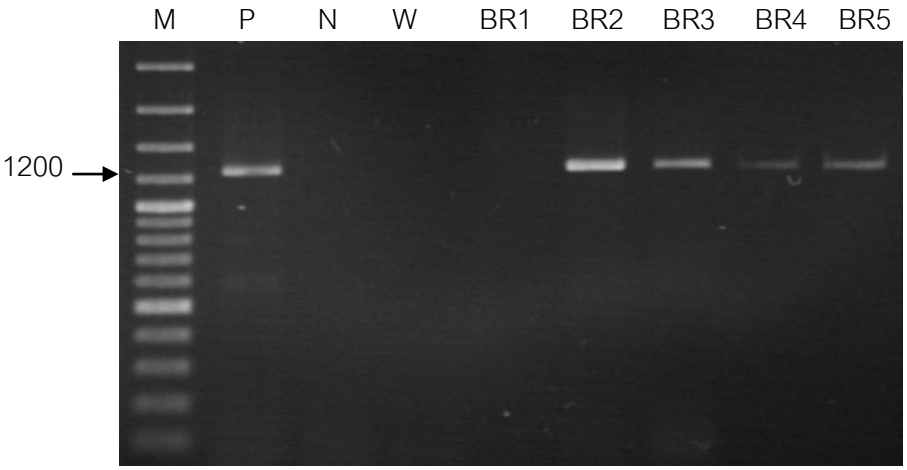
ภาพที่ 23 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)
แถบ N Negative control (งาปกติ) แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ PL1-PL3 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดพิษณุโลก



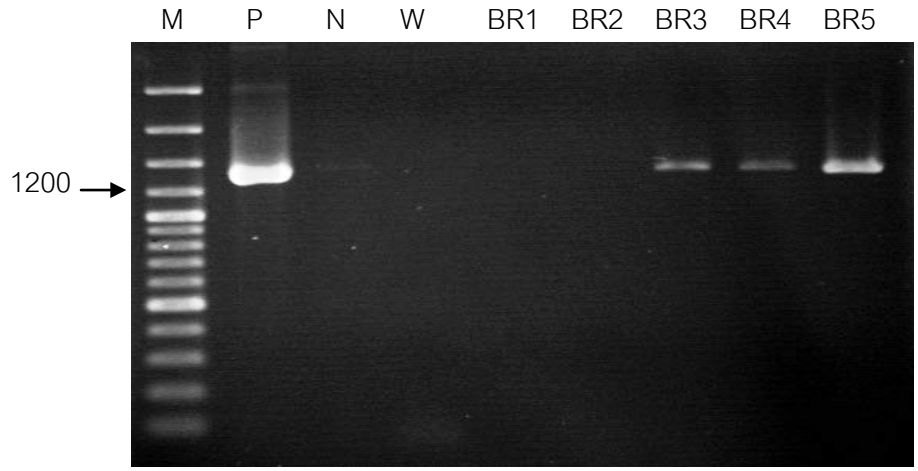
ภาพที่ 24 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (แพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอย)
แถบ N Negative control (งาปกติ) แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ PL1-PL3 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดพิษณุโลก



ภาพที่ 25 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.2 kb ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA lader plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (อ้อยที่เป็นโรคใบขาว)
แถบ N Negative control (งาปกติ) แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ BR1-BR5 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดบุรีรัมย์



ภาพที่ 26 gel electrophoresis แสดงขนาด PCR product ประมาณ 1.3 kb ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

แถบ M DNA มาตรฐาน (100 bp DNA lader plus, Fermentus, USA)
แถบ P Positive control (แพงพวยที่เป็นโรคแตกพุ่มฝอย)
แถบ N Negative control (งาปกติ) แถบ W น้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ
แถบ BR1-BR5 งาที่แสดงอาการแตกพุ่มฝอยจากจังหวัดบุรีรัมย์

4. การโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 15 ไอโซเลท (ตารางที่ 4) พบว่ามีขนาด 1,246-1,248 คู่เบส โดยไอโซเลทที่มีขนาด 1,246 คู่เบส พบ 7 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SENM1, SEST1, SEST2, SENW1, SELE1, SEPL3 และ SEBR5 ไอโซเลทที่มีขนาด 1,247 คู่เบส พบ 1 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท SEBR4 และไอโซเลทที่มีขนาด 1,248 คู่เบส พบ 7 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SELB5, SENM5, SEPB1, SEPB2, SEKB4, SEKB5 และ SELE2 (ภาคผนวกที่ 1) ซึ่งเมื่อตรวจสอบในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีรายงานถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16 S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาจากการเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์คู่เดียวกันนี้ มีขนาดตั้งแต่ 1 ,243-1,248 คู่เบส ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลท คือ SENM1, SEST1, SEST2, SENW1, SELE1, SEPL3, SEBR4 และ SEBR5 พบว่า ในทุกไอโซเลท มีขนาด 1,358 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากันกับที่ Lee *et al*. (2006) ได้ใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันนี้ในการเพิ่มปริมาณยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม Aster yellows

5. การจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมา

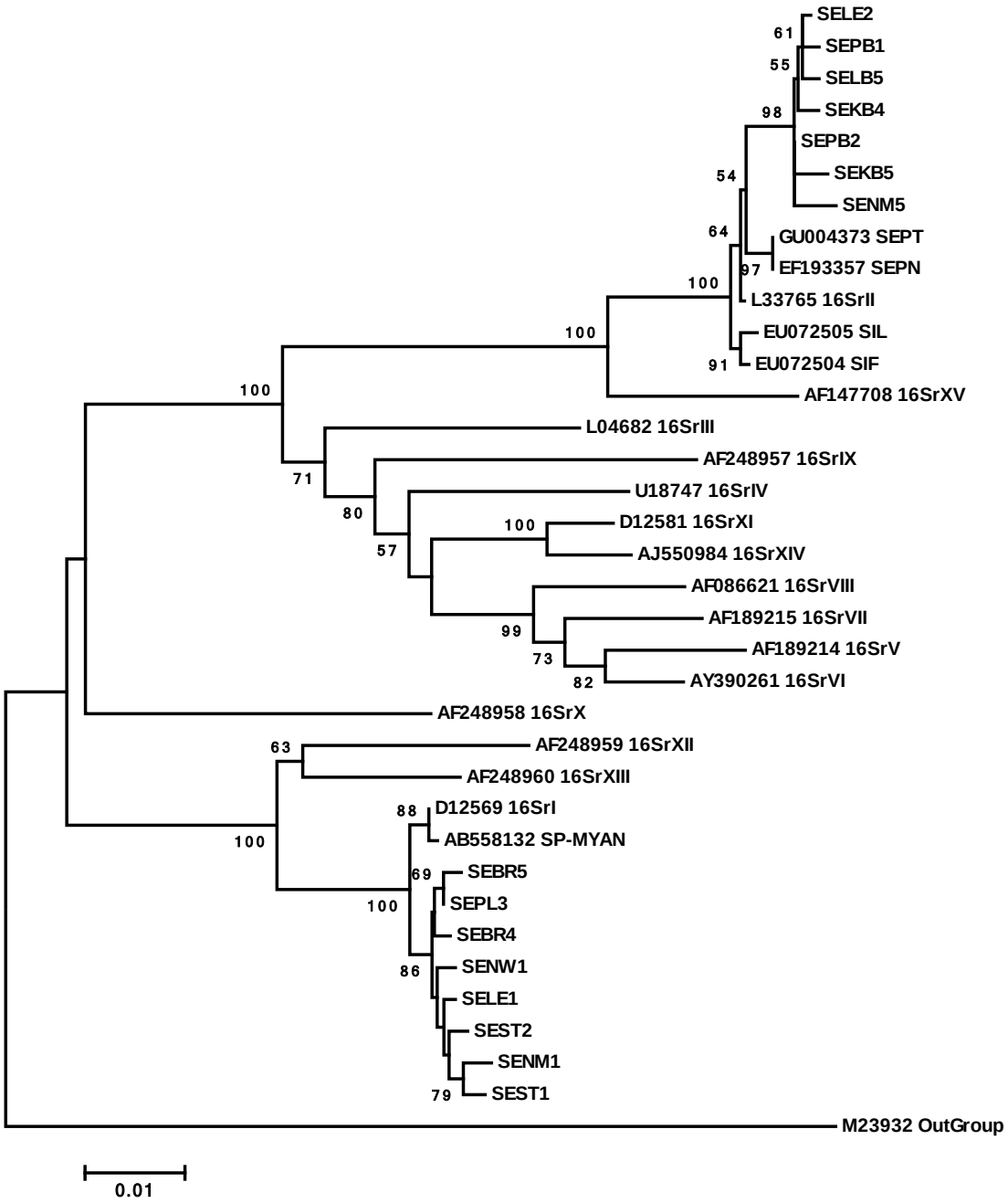
5.1 <u>การจัดกลุ่ม</u>

5.1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

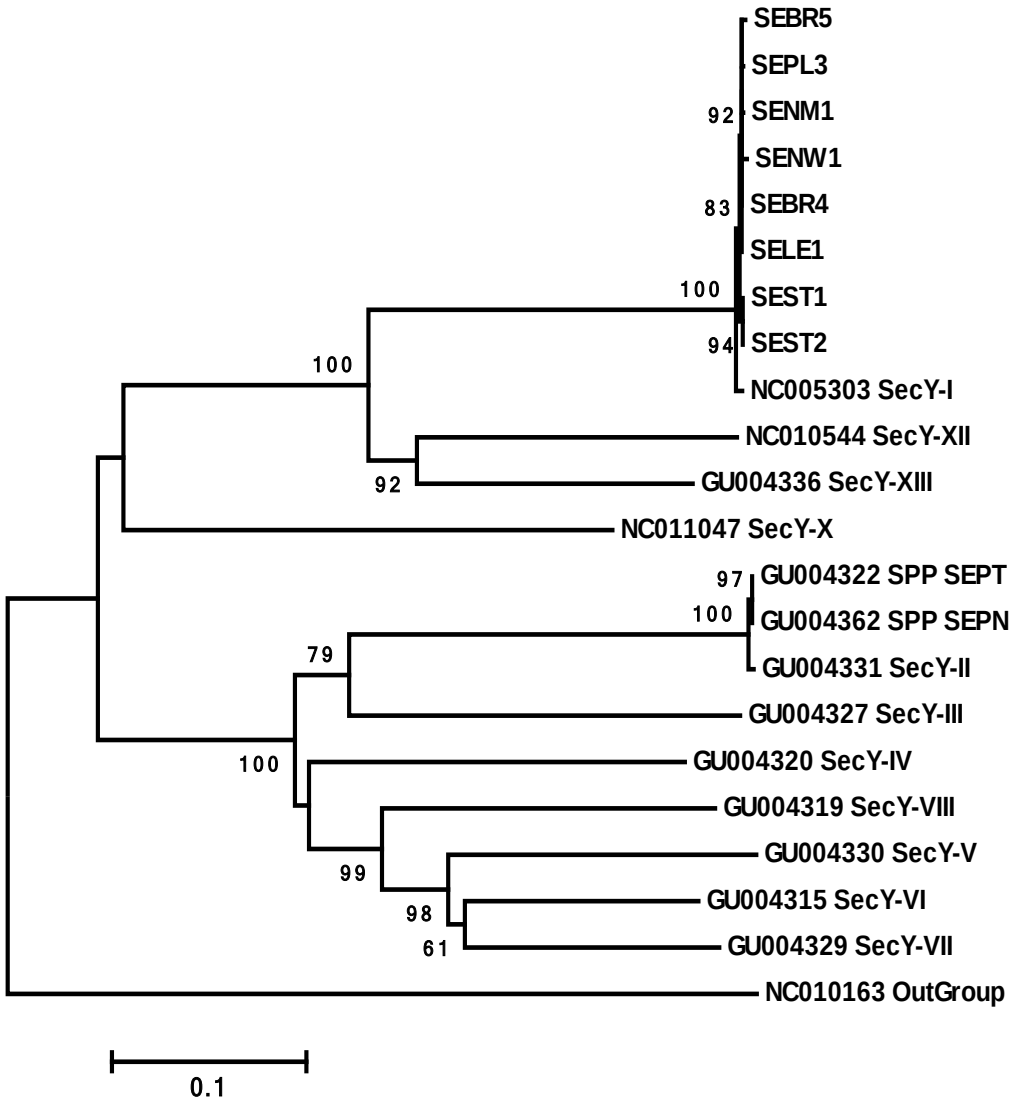
ผลการจัดกลุ่มเชื้อ 15 ไอโซเลท จาก 9 จังหวัด (เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน 16 S rRNA จากตัวอย่างงาที่แสดงอาการยอดแบนในจังหวัดสระแก้ว) ที่พบแถบดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA (ตารางที่ 4) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ในช่วง 1,246-1,248 คู่เบส จากการคำนวณค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางผนวกที่ 3. 1) ถ้ามีค่ามากกว่า 97.5 เปอร์เซ็นต์ จะจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน (IRPCM, 2004) พบว่า จัดเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 16SrI (Aster yellows group) ได้แก่ ไอโซเลท SENM1, SEST1, SEST2, SENW1, SELE1, SEPL3, SEBR4 และ SEBR5 โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 9 8.9-99.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจัดอยู่กลุ่มเดียวกับเชื้อสายพันธุ์ SP-MYAN ที่มีรายงานในประเทศพม่า ส่วนกลุ่ม 16SrII (Peanut witches'-broom group) ได้แก่ ไอโซเลท SELB5, SENM5, SEPB1, SEPB2, SEKB4, SEKB5 และ SELE2 โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 99.0-99.4 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับผลการศึกษาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาสายพันธุ์ที่เคยพบในประเทศไทย (SEPN และ SEPT) และโอมาน (SIF และ SIL) ดังแสดงในแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA (ภาพที่ 27)

5.1.2 **ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน** *secY*

ผลการจัดกลุ่มเชื้อ 8 ไอโซเลท ที่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 1,358 คู่เบส ได้แก่ ไอโซเลท SENM1, SEST1, SEST2, SENW1, SELE1, SEPL3, SEBR4 และ SEBR5 ของยีน *secY* (ภาคผนวกที่ 2) ซึ่งทั้งหมดเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI ซึ่งผลการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ที่ได้มีขนาด 1,358 นิวคลีโอไทด์ จากการคำนวณค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำมาสร้างแผนภาพแสดงความสัมพันธ์กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวแทน 11 กลุ่ม พบว่า ทุกไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม SecY-I (ตารางผนวกที่ 3.2 และ ภาพที่ 28) ซึ่งมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ อยู่ที่ 98.9-99.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสายพันธุ์เชื้อไฟโตพลาสมาของประเทศไทย (SEPN และ SEPT) ที่รายงานโดย Lee *et al.* (2010) พบว่าจัดอยู่ในกลุ่ม SecY-II โดยมีค่าความคล้ายคลึงของลำดับ นิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 99.6 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณยีน *secY* มีความจำเพาะกับเชื้อกลุ่ม 16SrI (Lee *et al.*, 2006) จึงทำให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน SecY-I ได้เท่านั้น แล ะ ไม่สามารถเพิ่มในเชื้อที่จำแนกในกลุ่ม 16SrII ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้



ภาพที่ 27 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโต-พลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย เปรียบเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมา ที่เป็นตัวแทน 15 กลุ่ม ที่มีรายงานในฐานข้อมูล และเชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม โดยวิธี neighbor-joining, ตัวเลขแสดงค่า bootstrap $\geq$ 50 เปอร์เซ็นต์



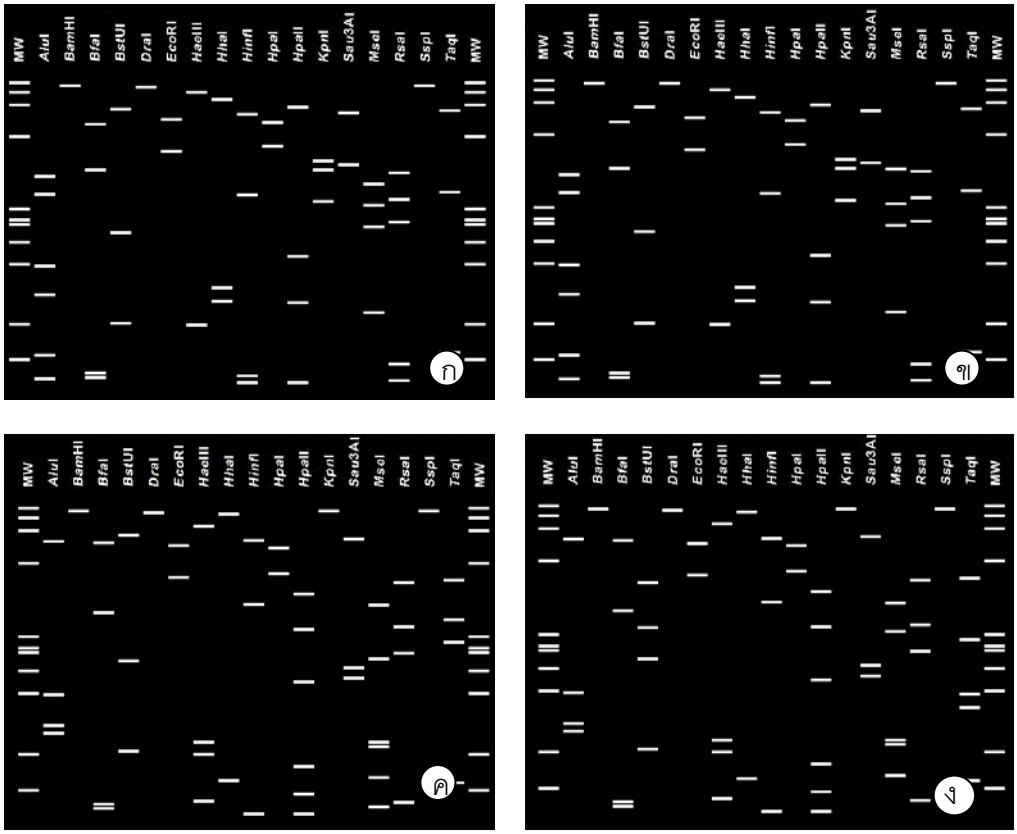
ภาพที่ 28 แผนภาพแสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย เปรียบเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน ที่มีรายงานในฐานข้อมูล และเชื้อเปรียบเทียบนอกกลุ่ม โดยวิธี neighbor-joining, ตัวเลขแสดงค่า bootstrap $\geq$ 50 เปอร์เซ็นต์

5.2 การจัดกลุ่มย่อย

โดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีนทั้งสาม ด้วยเทคนิค *in silico* RFLP ดังนี้

5.2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ผลการวิเคราะห์รูปแบบการตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน F2nR2 ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 17 ชนิด (ภาพที่ 29) โดยโปรแกรม *i*PhyClassifier ไอโซเลทที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI จำนวน 8 ไอโซเลท คือ SENM1, SEST1, SEST2, SENW1, SELE1, SEPL3, SEBR4 และ SEBR5 พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrI-B ('*Candidatus* Phytoplasma asteris'-related strain) 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 ('*Candidatus* Phytoplasma australasiae'-related strain) ที่ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 1.00 ยกเว้น SELB5, SEPB1 และ SEKB4 มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง ระหว่าง 0.92-0.97 ตามรายงานของ Wei *et al*. (2008) พบว่า ไอโซเลทที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง $\leq$ 0.97 นั้น อาจเป็นตัวแทนเชื้อในกลุ่มย่อยใหม่ ซึ่งต้องยืนยันโดยตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 17 ชนิดทีละชนิด ความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพียง 1 หรือ 2 ตำแหน่งที่แตกต่างไปจากกลุ่มย่อยเดิมก็สามารถจัดเป็นกลุ่มย่อยใหม่ได้ จากการทดสอบพบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไอโซเลท SEST1 เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะดังนี้ *Alu*I, *Bfa*I, *Dra*I, *Hae*III, *Hpa*II, *Kpn*I และ *Mse*I เมื่อเทียบกับกลุ่มย่อยของ 16SrI 10 กลุ่มย่อย (-A, -B, -C, -D, -E, -F, -K, -O, -P และ -Q) (ภาพที่ 30) ซึ่งอาจจัดเป็นกลุ่มย่อยใหม่ได้ ในขณะที่พบความแตกต่างของลายพิมพ์ดีเอ็นเอในไอโซเลท SELB5, SEPB1 และ SEKB4 เมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะดังนี้ *Bfa*I, *Bst*UI, *Dra*I, *Hae*III, *Hha*I, *Hinf*I, *Mse*I และ *Taq*I เมื่อเทียบกับกลุ่มย่อยของ 16SrII 12 กลุ่มย่อย (-A, -B, -C, -D, -F, -G, -H, -I, -J -K, -L และ -S) (ภาพที่ 31) ซึ่งอาจจัดเป็นกลุ่มย่อยใหม่เช่นกัน โดยจากรายงานของ Khan *et al*. (2002) ได้จัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาจากประเทศไทย 2 สายพันธุ์ คือ SEPN และ SEPT โดยวิเคราะห์และเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA พบว่าจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrII-A เพียงกลุ่มย่อยเดียวเท่านั้น ส่วนการศึกษาในครั้งนี้ได้พบว่า เชื้อที่เป็นสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาของไทยจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrI-B และ 16SrII-A และยังมีไอโซเลทที่อาจเป็นกลุ่มย่อยใหม่ของกลุ่ม 16 SrI คือ SEST1และกลุ่มย่อยใหม่ของเชื้อกลุ่ม 16SrII ได้แก่ SELB5, SEPB1 และ SEKB4



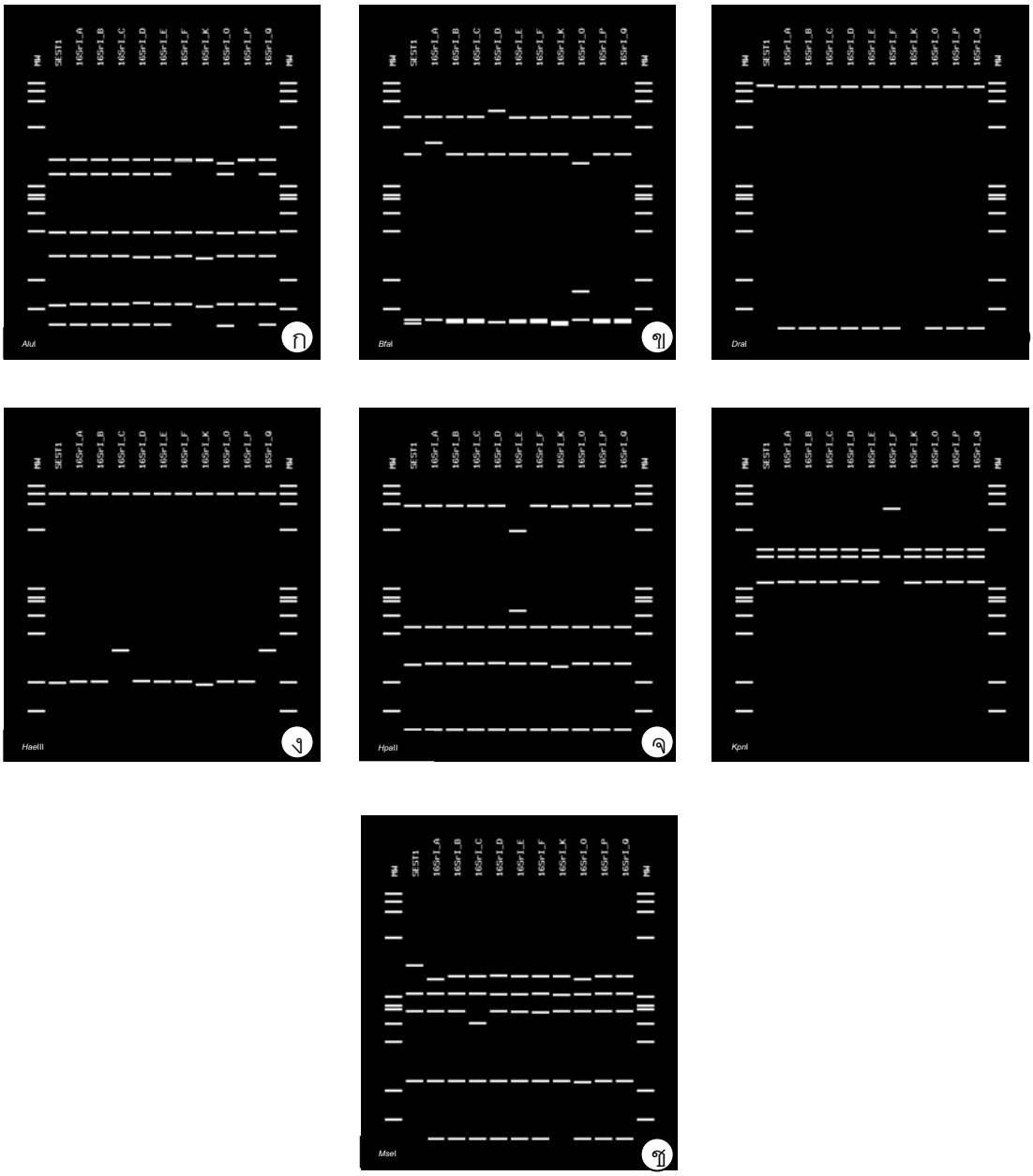
ภาพที่ 29 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริงที่ได้จากการตัดแบบ *in silico* ด้วยโปรแกรม *i*PhyClassifier บริเวณส่วน F2nR2 ของยีน 16S rRNA ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 17 ชนิด MW (ดีเอ็นเอมาตรฐาน) คือ ØX174 ที่ตัดด้วย *Hae*III

ก) เชื้อในกลุ่ม 16SrI-B ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง > 0.97 เมื่อเทียบกับเชื้อตัวแทน

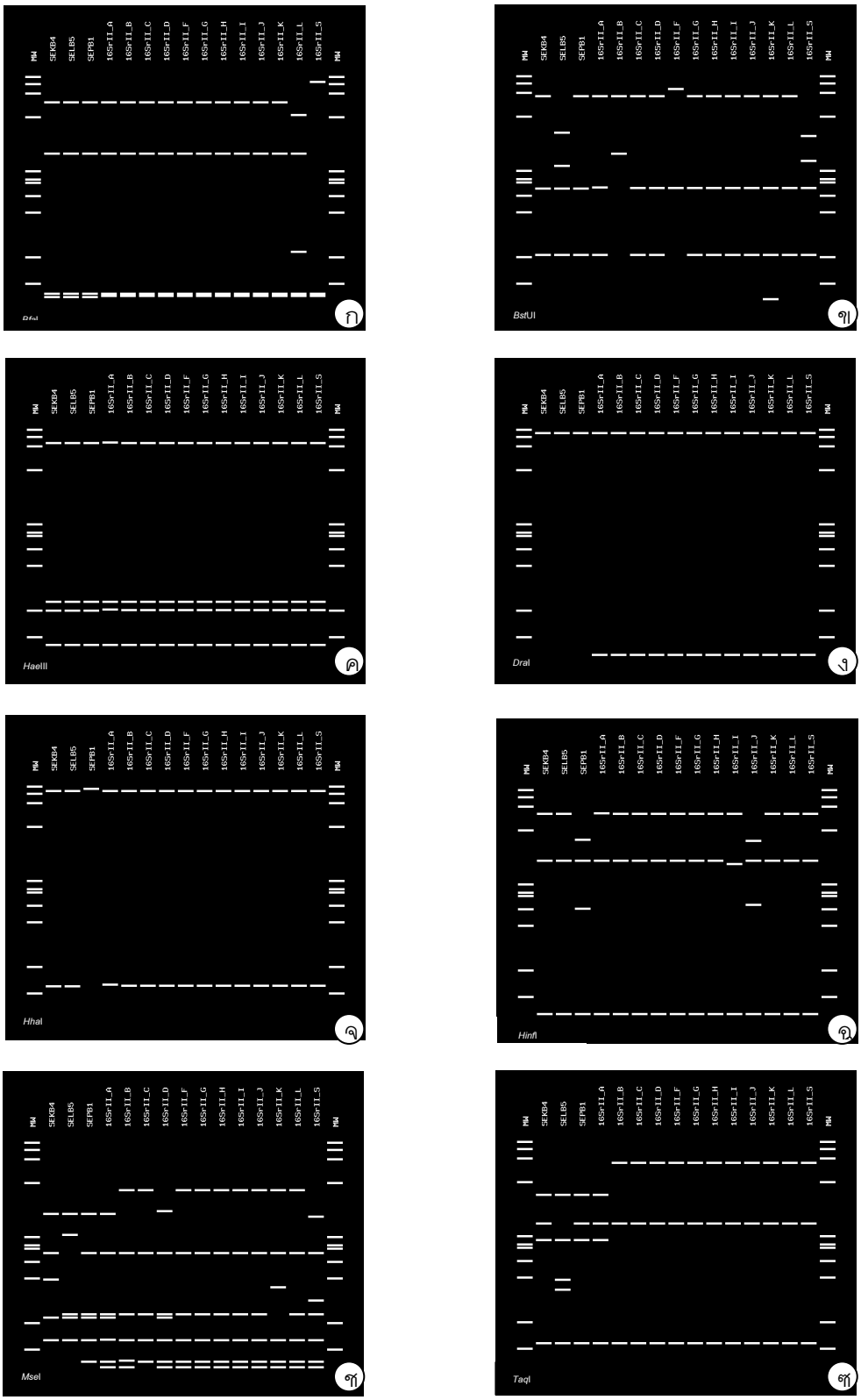
ข) เชื้อในกลุ่ม 16SrI-B ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง $\leq$ 0.97 เมื่อเทียบกับเชื้อตัวแทน

ค) เชื้อในกลุ่ม 16SrII-A ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง >0.97 เมื่อเทียบกับเชื้อตัวแทน

ง) เชื้อในกลุ่ม 16SrII-A ที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง $\leq$ 0.97 เมื่อเทียบกับเชื้อตัวแทน



ภาพที่ 30 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริงของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาไอโซเลท SEST1 ที่เกิดความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่ม 16SrI ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I (ก), *Bfa*I (ข), *Dra*I (ค), *Hae*III (ง), *Hpa*II (จ), *Kpn*I(ฉ), *Mse*I(ช) MW (ดีเอ็นเอมาตรฐาน) คือ ØX174 ที่ตัดด้วย *Hae*III



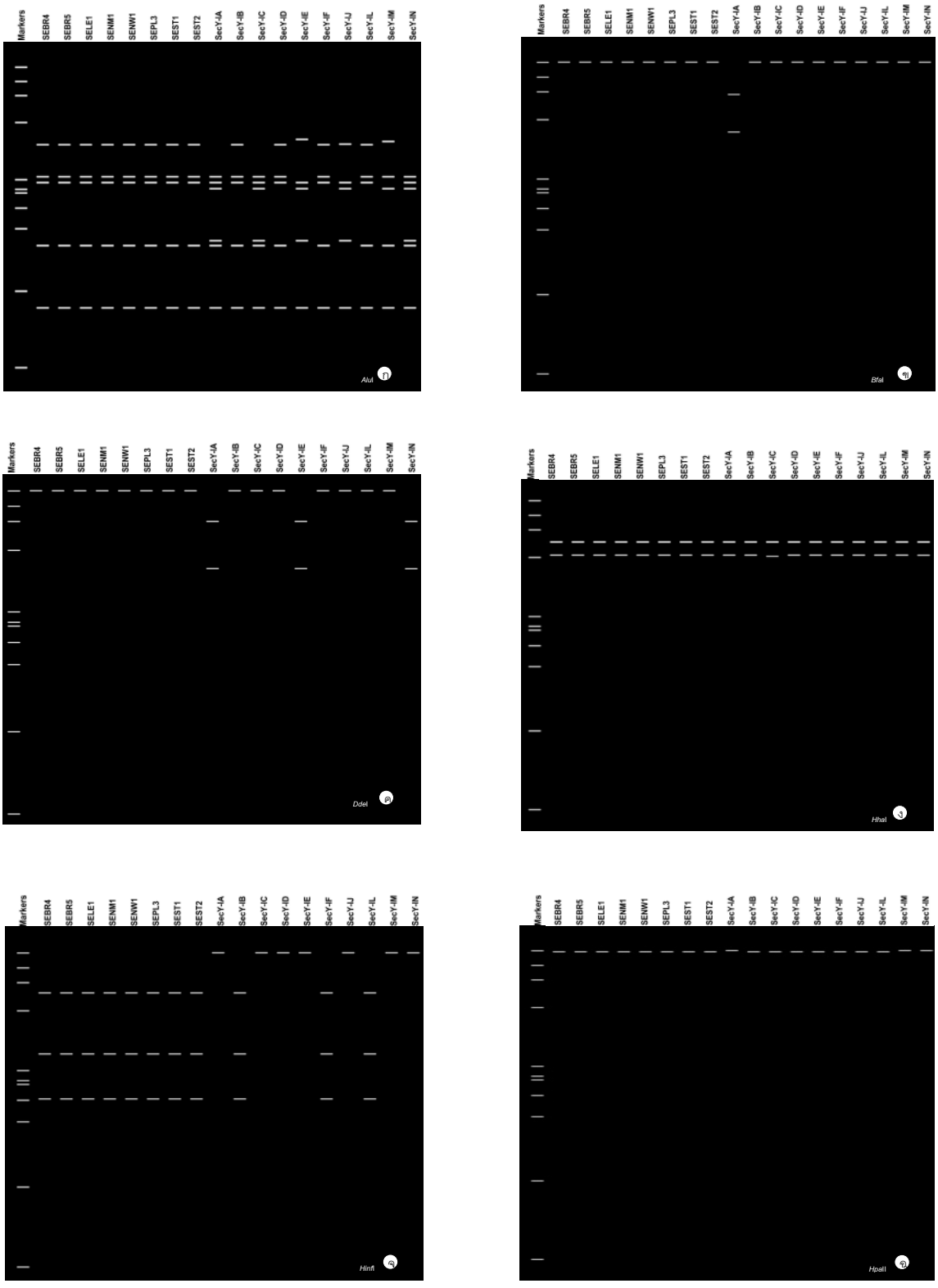
ภาพที่ 31 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริงของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาไอโซเลท SELB5, SEPB1 และ SEKB4 ที่เกิดความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่ม 16SrII เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *Rfa*I (ก), *Bst*UI (ข), *Hae*III (ค), *Dra*I (ง),*Hha*I (จ), *Hinf*I(ฉ), *Mse*I(ช), *Taq*I (ซ) MW (ดีเอ็นเอมาตรฐาน) คือ ØX174 ที่ตัดด้วย *Hae*III

5.2.2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY*

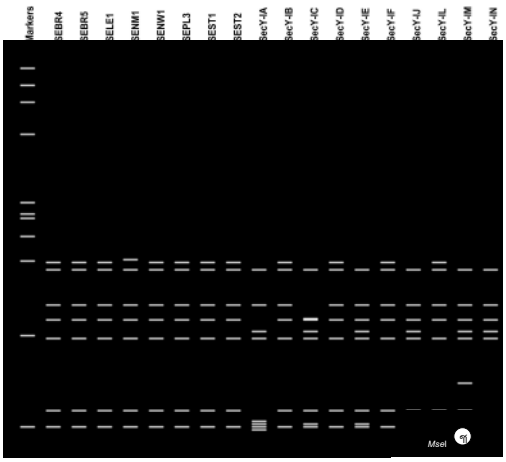
ผลการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมา ได้แก่ ไอโซเลท SENM1, SEST1, SEST2, SENW1, SELE1, SEPL3, SEBR4 และ SEBR5 ซึ่งทุกไอโซเลท จัดอยู่ในกลุ่ม SecY-I ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด เปรียบเทียบกับกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม SecY-I ซึ่งมี 10 กลุ่มย่อยในฐานข้อมูล GenBank ตามรายงานของ Lee *et al*. (2006, 2010) ดังนี้ (-A, -B, -C, -D, -E, -F, -J, -L, -M และ -N) เมื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา กับเชื้อที่เป็นตัวแทนกลุ่มย่อยในกลุ่ม SecY-I พบว่า ไอโซเลทที่มีลายพิมพ์ดีเอ็นเอเหมือนกลุ่มย่อย SecY-IB ได้แก่ ไอโซเลท SEBR4, SEBR5, SELE1 และ SEPL3 (ภาพที่ 32 และ ตารางที่ 5) ส่วนในไอโซเลท SENM1, SENW1, SEST1 และ SEST2 พบลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากตัวแทนกลุ่มย่อยที่นำมาศึกษาเมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ *Tsp509*I และโอโซเลท SENM1 พบแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเชื้อที่นำมาศึกษาทั้งหมดเมื่อตัดด้วยเอ็นไซม์ *Mse*I ซึ่งผลการแบ่งกลุ่มย่อยด้วยยีน *secY* ของเชื้อไอโซเลท SEST1 อาจจัดอยู่ในกลุ่มย่อยใหม่ เนื่องจากมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากตัวแทนของเชื้อกลุ่มย่อยที่เคยรายงานไว้ และผลการจัดกลุ่มย่อยด้วยยีน 16S rRNA ของเชื้อไอโซเลทนี้ให้ผลสอดคล้องกันคือ สามารถจัดอยู่ในเชื้อกลุ่ม 16SrI ที่เป็นกลุ่มย่อยใหม่เช่นกัน จึงเป็นไปได้ว่า เชื้อไอโซเลท SEST1 ที่พบในจังหวัดสุโขทัย มีความแตกต่างจากเชื้อในกลุ่ม 16SrI ที่พบในที่อื่นๆ และอาจเป็นเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่มย่อยใหม่

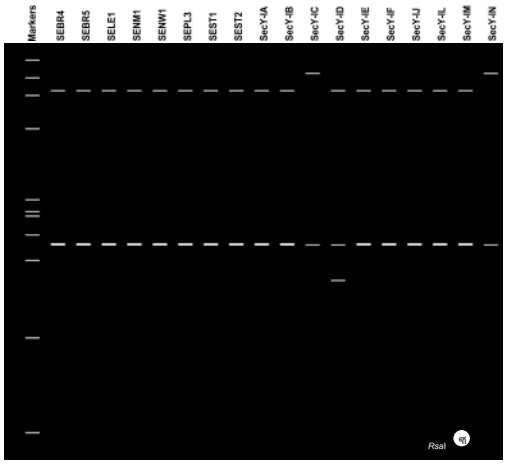
6. การจัดกลุ่มและกลุ่มย่อย

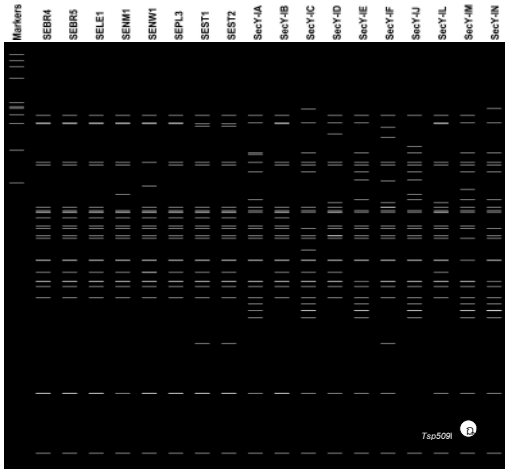
ผลการจัดกลุ่มและกลุ่มย่อยโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *secY* โดยการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย กับเชื้อที่เป็นตัวแทนกลุ่มแสดงผลในรูปของแผนภาพแสดงความสัมพันธ์ และการจัดกลุ่มย่อยโดยการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงและเปรียบเทียบรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้การตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งแสดงผลในรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริง ผลการทดลองที่ได้จากทั้งสามยีน แสดงผลในตารางที่ 6 และภาพที่ 33 พบว่าผลการจัดจำแนกที่ได้ไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดของงา ลักษณะอาการของโรคและพื้นที่ปลูกงา



ภาพที่ 32 ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริงที่ได้จากการตัดยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมา 8 ไอโซเลท เทียบกับตัวแทนกลุ่มย่อยของกลุ่ม SecY-I ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 9 ชนิด *Alu*I (ก), *Bfa*I (ข), *Dde*I (ค), *Hha*I (ง),*Hinf*I (จ), *Hpa*I(ฉ), *Mse*I(ช), *Rsa*I (ซ), *Tsp509*I (ฌ) Markers (ดีเอ็นเอมาตรฐาน) คือ ØX174 ที่ตัดด้วย *Hae*III


Markers
SEBR4
SEBR5
SELE1
SENM1
SENW1
SEPL3
SEST1
SEST2
SecY-IA
SecY-IB
SecY-IC
SecY-ID
SecY-IE
SecY-IF
SecY-IJ
SecY-IL
SecY-IM
SecY-IN
MseI


Markers
SEBR4
SEBR5
SELE1
SENM1
SENW1
SEPL3
SEST1
SEST2
SecY-IA
SecY-IB
SecY-IC
SecY-ID
SecY-IE
SecY-IF
SecY-IJ
SecY-IL
SecY-IM
SecY-IN
RsaI


Markers
SEBR4
SEBR5
SELE1
SENM1
SENW1
SEPL3
SEST1
SEST2
SecY-IA
SecY-IB
SecY-IC
SecY-ID
SecY-IE
SecY-IF
SecY-IJ
SecY-IL
SecY-IM
SecY-IN
Tsp509I

ภาพที่ 32 (ต่อ)

ตารางที่ 5 ผลของรูปแบบการตัดยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค *in silico* RFLP

ชื่อโรค, ไอโซเลท/สายพันธุ์	GenBank Accession	กลุ่มย่อย		รูปแบบของ RFLP								
		16SrI	SecY-I	*Alu*I	*Bfa*I	*Dde*I	*Hha*I	*Hin*fI	*Hpa*II	*Mse*I	*Rsa*I	*Tsp509*I
Sesame phyllody, SEBR4	This study	B	B	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sesame phyllody, SEBR5	This study	B	B	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sesame phyllody, SELE1	This study	B	B	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sesame phyllody, SENM1	This study	B	-	1	1	1	1	1	1	2	1	2
Sesame phyllody, SENW1	This study	B	-	1	1	1	1	1	1	1	1	3
Sesame phyllody, SEPL3	This study	B	B	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Sesame phyllody, SEST1	This study	B*	-	1	1	1	1	1	1	1	1	4
Sesame phyllody, SEST2	This study	B	-	1	1	1	1	1	1	1	1	4
Plantago virescence, PVM	AY803185	A	A	2	2	2	1	2	1	3	1	5
Maryland aster yellows, AY1	AY803177	B	B	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Clover phyllody, CPh	AY803179	C	C	2	1	1	1	2	1	4	1	8
Paulownia witches'-broom, PaWB	AY803184	D	D	1	1	1	1	2	1	1	3	7
Blueberry stunt, BBS3	AY803169	E	E	3	1	2	1	2	1	5	1	8
Ipomoea obscura witches'- broom,	AY803182	N	F	1	1	1	1	1	1	1	1	9
Strawberry multiplier, STRAWB2	AY803180	K	J	4	1	1	1	2	1	6	1	10

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ชื่อโรค, ไอโซเลท/สายพันธุ์	GenBank Accession	**กลุ่มย่อย**		**รูปแบบของ** RFLP								
		16SrI	SecY-I	*Alu*I	*Bfa*I	*Dde*I	*Hha*I	*Hinf*I	*Hpa*II	*Mse*I	*Rsa*I	*Tsp509*I
Maize bushy stunt, MBS	AY80317	B	L	1	1	1	1	1	1	1	1	11
Gray dogwood stunt, GD1	AY80317	A	M	5	1	1	1	2	1	7	1	12
Leafhopper borne, CVB	AY80317	F	N	2	1	2	1	2	1	8	2	13

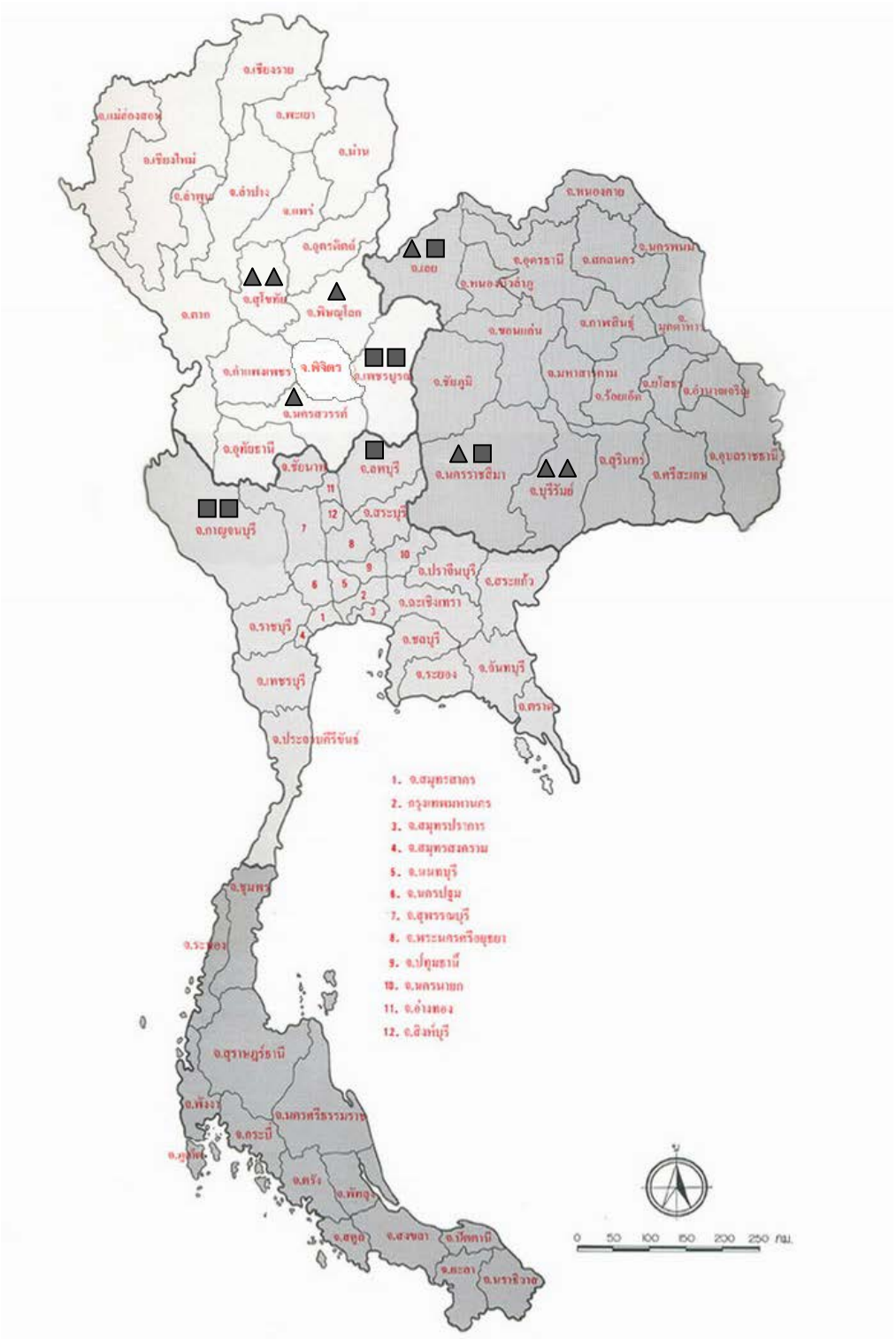
หมายเหตุ * คือ ไอโซเลทที่จัดอยู่ในกลุ่มย่อยใหม่ในกลุ่ม 16SrI โดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA

ตัวเข้ม คือ ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่แตกต่างจากเชื้อที่ทำการศึกษา

ตารางที่ 6 แสดงชนิดของงา ลักษณะอาการ และผลการจัดกลุ่มและกลุ่มย่อยเชื้อทั้ง 15 ไอโซเลท โดยใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และ *secY*

จังหวัด/ไอโซเลท	ชนิดงา (สีเมล็ด)	ลักษณะอาการ	กลุ่มและกลุ่มย่อย	
			16Sr	*secY*
ลพบุรี: LB				
SELB5	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	IIA*	-
นครราชสีมา: NM				
SENM1	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	IB	I
SENM5	ขาว	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	IIA	-
สุโขทัย: ST				
SEST1	แดง	ดอกเขียว	IB*	I
SEST2	แดง	ดอกเขียว ใบเหลือง	IB	I
เพชรบูรณ์: PB				
SEPB1	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	IIA*	-
SEPB2	แดง	แตกพุ่มฝอย ใบเหลือง	IIA	-
นครสวรรค์: NW				
SENW1	แดง	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ใบเหลือง	IB	I
กาญจนบุรี: KB				
SEKB4	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ลำต้นเตี้ยแคระ	IIA*	-
SEKB5	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	IIA	-
เลย: LE				
SELE1	ขาว	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว	IB	IB
SELE2	ดำ	ดอกเขียว ลำต้นเตี้ยแคระ	IIA	-
พิษณุโลก: PL				
SEPL3	แดง	แตกพุ่มฝอย	IB	IB
บุรีรัมย์: BR				
SEBR4	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ฝักแตกเมล็ดในฝักงอก	IB	IB
SEBR5	ดำ	แตกพุ่มฝอย ดอกเขียว ฝักแตกเมล็ดในฝักงอก	IB	IB

หมายเหตุ * คือ ไอโซเลทที่จัดอยู่ในกลุ่มย่อยใหม่ในกลุ่ม 16SrII โดยการวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ



ภาพที่ 33 แสดงผลการจัดกลุ่มของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาใน 9 จังหวัดของประเทศไทย พบ 2 กลุ่มคือ 16SrI (▲) และ 16SrII (■)

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการสำรวจแหล่งปลูกงาที่สำคัญของประเทศไทย ในช่วงปี พ.ศ. 2551-2553 และเก็บตัวอย่างงาที่แสดงอาการของโรคแตกพุ่มฝอยใน 10 จังหวัด ได้แก่ จังหวัด ลพบุรี นครราชสีมา สระแก้ว สุโขทัย เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ กาญจนบุรี เลย พิษณุโลก และ บุรีรัมย์ พบว่า งาที่ถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย จะแสดงอาการหลายอาการร่วมกันในต้นเดียว ได้แก่ อาการแตกพุ่มฝอยร่วมกับอาการดอกมีสีเขียวคล้ายใบเป็นหลัก และพบอาการ อื่นๆ ร่วมด้วย เช่น อาการเหลืองและหงิกงอของใบและลำต้น แตกกิ่งย่อย เตี้ยแคระ ฝักลีบเล็ก ฝักแตก และเมล็ดในฝักงอก และเมื่อนำมาตรวจเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่านพบเชื้อไฟโตพลาสมาบริเวณท่ออาหารของต้นงาที่แสดงอาการของโรค

การจัดจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทย โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16 S rRNA ในการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึง (similarity) และแสดงความสัมพันธ์ในรูป Phylogenetic tree พบเชื้อสาเหตุจัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI (Aster yellows group) และ 16 SrII (Peanut witches'-broom group) และการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง (similarity coefficient) ของลายพิมพ์ดีเอ็นเอเสมือนจริง จากเทคนิค *in silico* RFLP เพื่อจัดกลุ่มย่อยพบเชื้อจัดอยู่ในกลุ่มย่อย 16SrI-B ('*Candidatus* Phytoplasma asteris'-related strain) และ 16SrII-A ('*Candidatus* Phytoplasma australasiae'-related strain) การจัดจำแนกโดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ในการเปรียบเทียบค่าความคล้ายคลึงของเชื้อสาเหตุที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrI พบว่าเชื้อสาเหตุจัดอยู่ในกลุ่ม SecY-I และจัดอยู่ในกลุ่มย่อย SecY-IB ได้แก่ ไอโซเลท SEBR4, SEBR5, SELE1 และ SEPL3

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ไพรเมอร์ AYsecYF1/AYsecYR1 (Lee *et al*., 2006) ไม่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของที่จัดอยู่ในกลุ่ม 16SrII ได้ แต่จากรายงานของ Lee *et al*. (2010) ได้ออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่สามารถเพิ่มปริมาณยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาใน 12 กลุ่ม รวมถึงกลุ่ม 16SrII ที่มีเชื้อสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาสายพันธุ์จากประเทศไทยรวมอยู่ด้วย ดังนั้น อาจมีการศึกษาเชื้อสาเหตุในไอโซเลทที่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Lee *et al*. (2010) ต่อไป

นอกจากนี้ เชื้อไอโซเลท SEST1 จาก จ. สุโขทัย พบว่าการจัดกลุ่มย่อยด้วยยีน 16 S rRNA และยีน *secY* ให้ผลการจัดกลุ่มที่แตกต่างจากกลุ่มย่อยเดิมที่ได้รายงานมาก่อนหน้า จึงควรนำมาศึกษาเพิ่มในด้านต่างๆ เนื่องจากอาจเป็นเชื้อสายพันธุ์ใหม่

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เตือนจิตต์ สัตยาวิรุทธ์ วรจิต ผาภูมิ และเกรียงไกร จำเริญมา. 2539. ความสัมพันธ์ของเพลี้ยจักจั่นกับการเกิดโรคยอดฝอยและผลที่มีต่อผลผลิตของงาพันธุ์แนะนำบางพันธุ์, น.31-48. *ใน* การสัมนาเชิงปฏิบัติการงานวิจัยงา ครั้งที่ 7. โรงแรมลายทอง, อุบลราชธานี.

สุภาพร กลิ่นคง. 2533. การถ่ายทอดเชื้อมายโคพลาสมาโรคแตกพุ่มฝอยของงาและปอเทืองโดยการใช้ฝอยทอง (*Cuscuta* sp.) *ใน* เทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, รายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 9 . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. นครปฐม.

สุภาพร กลิ่นคง พิสสวรรณ เจียมสมบัติ สุพัฒน์ อรรถธรรม และรุ่งโรจน์ อุทัศน์. 2540. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพืชบางชนิดในประเทศไทย, น. 418-425. *ใน* การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 สาขาพืช ส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตรอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2547. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2538-2547. น. 32.

Brar, G.S. and K. L. Ahuja. 1979. Sesame : its culture, genetics, breeding and biochemistry. *In* Malik, C.P. (ed) Annu. Rev. Plant Sci. Kalayani Publishers, New Delhi. pp. 245-313.

Choopanya, D. 1973. Mycoplasma-like bodies associated with sesame phyllody in Thailand. Phytopathology. 63 : 1536.

Hodgetts, J. and M. Dickinson. 2010. Phytoplasma Phylogeny and Detection Based on Genes other than 16S rRNA, pp. 93-113. *In* P. G. Wein Traub 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. Phytopath. 92 : 1038-1047.

Kolte, S. J. 1985. Mycoplasma disease : the phyllody. *In* Diseases of Annual Edible Oilseed Crops, vol. 2, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp.104-109.

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.

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. Bacterial. 48 : 1153-1169.

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 mycoplasmalike organism. Phytopath. 83 : 834-842.

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. Molecular and Cellular Probes : 20 87-91.

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

Nakashima, K., T. Hayashi, W. Chaleeprom, P. Wongkeaw and P. Sirithorn. 1995. Detection of DNA of phytoplasmas associated with phyllody disease of sesame in Thailand. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61 : 519-528.

Namba, S., S. Kato, S. Iwanami, H. Oyaizu, H. Shiozawa and T. Tsuchizaki. 1993. Detection and differentiation of plant-pathogenic mycoplasmalike organisms using polymerase chain reaction. Phytopath. 83: 786-791.

Nei, M. and W.-H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 76: 5269–5273.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. 1,954 p.

Serkaya, G. 2000. Transmission of spiroplasma citri and sesame phyllody to test plants by grafting, dodder and insect vectors. Vol. 82. www.agr.unipi.it/pp/journals/abst0300.htm-114k.

Spurr, A. R. 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. J. Ultra. Res. 26: 31-43.

Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24: 1596-1599.

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.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

จังหวัดลพบุรี

ยีน 16S rRNA

SELB5 : 1248 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTA
ATAGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGA
CGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AATGACGAAGTACTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATT
TGTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAA
GGGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGT
GTAATGTCAACGCTTAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCT
CGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTT
GCAAAATGATAGTAATATCGCGGAGGTTACCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGT
TATGGTGGGGACTTTATCGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATC
AGCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAAC
GCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCCCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACGGGGTTTGTAC
ACACCGCCCGTCA

SELB6 : 1,248 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTA
ATAGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGA
CGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AATGACGAAGTACTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATT
TGTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAA
GGGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGT
GTAATGTCAACGCTTAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCT
CGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTT
GCAAAATGATAGTAATATCGCGGAGGTTACCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGT
TATGGTGGGGACTTTATCGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATC
AGCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAAC
GCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCCCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACGGGGTTTGTAC
ACACCGCCCGTCA

จังหวัดนครราชสีมา

ยีน16S rRNA

SENM1 : 1,246 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAA
TAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGAC
TATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATT
CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGAGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTA
AGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGG
AATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGC
TGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTA
CTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG
GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTTTTGACATGCTTCTGCA
AAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCACGTAATG
GTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATC
ATGCCCCTTATGACCTGGGCTACGAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCA
AGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCGGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGA
AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTGACGGGGTTTGTACAC
ACCGCCCGTCA

SENM5 : 1,248 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTA
ATAGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCGCTATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGA
CGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTA
AATGACGAAGTACCTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATT
TGTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAA
GGGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGT
GTAATGTCAACGCTTAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCT
CGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACATATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTT
GCAAAATGATAGTAATATCGTGGAGGTTACCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGT
TATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATC
AGCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATGCAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAAC
GCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCCCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTAC
ACACCGCCCGTCA

จังหวัดเพชรบูรณ์

ยีน 16S rRNA

SEPB1 : 1,248 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTA
ATAGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCACCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGA
CGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAGACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AATGACGAAGTACTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATT
TGTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAA
GGGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGT
GTAATGTCAACGCTTAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCT
CGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTT
GCAAAATGATAGTAATATCGTGGAGGTTACCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGT
TATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATC
AGCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAAC
GCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCCCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACGGGGTTTGTAC
ACACCGCCCGTCA

SEPB2 : 1,248 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTA
ATAGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGA
CGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AATGACGAAGTACTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATT
TGTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAA
GGGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGT
GTAATGTCAACGCTTAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCT
CGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTT
GCAAAATGATAGTAATATCGTGGAGGTTACCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGT
TATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATC
AGCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAAC
GCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCCCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTAC
ACACCGCCCGTCA

จังหวัดสุโขทัย

ยีน 16S rRNA

SEST1 : 1,246 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTTGTTTCTAAAAGACCTAGCAA
TAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGAC
TATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATT
CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTA
AGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGG
AATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGC
TGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTA
CTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG
GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAGAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCA
AAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAAT
GGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATC
ATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCA
AGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCGGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGA
AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTGACGGGGTTTGTACAC
ACCGCCCGTCA

SEST2 : 1,246 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAA
TAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGAC
TATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATT
CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTA
AGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGG
AATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGC
TGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTA
CTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG
GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCA
AAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGACGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAAT
GGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGGCGACGTCAAATCATC
ATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCA
AGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGA
AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTGACGGGGTTTGTACAC
ACCGCCCGTCA

จังหวัดนครสวรรค์

ยีน 16S rRNA

SENW1 : 1,246 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTTTTTTTAAAAGACCTAGCAA
TAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGAC
TATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGACCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATT
CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTA
AGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGG
AATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTAC
TGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTA
CTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG
GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCA
AAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAAT
GGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATC
ATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCA
AGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGA
AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCACGGGGTTTGTACAC
ACCGCCCGTCA

SENW8 : 1,247 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTA
ATAGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGA
CGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ATGACGAAGTACTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATTT
GTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAAG
GGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGTG
TAATGTCAACGCTTAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGT
GGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTC
GCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAG
TACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAG
CGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTTG
CAAAATGATAGTAATATCGTGGAGGTTACCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGTT
ATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATCA
GCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAACG
CAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCCCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATG
AAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTGACGGGGTTTGTACA
CACCGCCCGTCA

จังหวัดกาญจนบุรี

ยีน 16S rRNA

SEKB4 : 1,248 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTA
ATAGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGA
CGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AATGACGAAGTACTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATT
TGTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAA
GGGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGT
GTAATGTCAACGCTTAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCT
TGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTT
GCAAAATGATAGTAATATCGTGGAGGTTACCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTAGGCTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGT
TATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATC
AGCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAAC
GCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCCCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCGCGGGGTTTGTAC
ACACCGCCCGTCA

SEKB5 : 1,248 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTA
ATAGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGA
CGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AATGACGAAGTACTTCGGTATGTATAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATT
TGTTTGCCGGTACTTGATGTATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAA
GGGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGT
GTAATGTCAACGCTTAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGGGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCT
CGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTT
GCAAAATGATAGTAATATCGTGGAGGTTACCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGT
TATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAGT
CAGCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAA
CGCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCCCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCA
TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTA
CACACCGCCCGTCA

จังหวัดเลย

ยีน 16S rRNA

SELE1 : 1,246 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTTTTTTTAAAAGACCTAGCAA
TAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGAC
TATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATT
CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTA
AGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGG
AATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGC
TGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTA
CTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG
GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCA
AAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAAT
GGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATC
ATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCA
AGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCGACTCGACTTCATGA
AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTGACGGGGTTTGTACAC
ACCGCCCGTCA

SELE2 : 1,248 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGATAAAAGGCATCTTGTATCTTTTAAAAGACCTAGTTA
ATAGGTATGCTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGA
CGATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTG
AATGACGAAGTACTTCGGTATGTAAAGTTCTTTTATCGAGGAAGAAAAGCAAATGGCGAACCATT
TGTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAA
GGGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGT
GTAATGTCAACGCTTAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCT
CGCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAA
GTACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAA
GCGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTT
GCAAAATGATAGTAATATCGTGGAGGTTACCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGT
TATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAATGATAAATTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATC
AGCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAAC
GCAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCCCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTTACGGGGTTTGTAC
ACACCGCCCGTCA

จังหวัดพิษณุโลก

ยีน 16S rRNA

SEPL1 : 1,247 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAAGAAATAAGGCATCTTATTTCTTTTAAAAGACCTAGTAA
TAGGTATACTTTAGGAGGGGCTTGCGCCATATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGAC
GATGATGTGTAGCTGGACTGAGAGGTTGAACAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ACGACGAAGTACTTTGGTATGTAAAGTTCTTTTATCAAGGAAGAAAAGCAAGTGGCGAACCATTT
GTTTGCCGGTACTTGATGAATAAGCCCCGGCTAATTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACATAAG
GGGCAAGTGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTCTAGTAAGTCAGTGGTG
TAATGGCAACGCTCAACGTTGTCCGGCTATTGAAACTGCTAAACTTGAGTTAGATAGAGGCGAGT
GGAATTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGAGGCGTAGGCGGCTC
GCTGGGTCTTAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTA
GTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTCGGGTTAAACCGGTACTGAAGTTAACACATTAAG
TACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAG
CGGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGATACCCGAAAAACCTTACCAGGTCTTGACATGTTTTTG
CGAAACGGTAGTAATATCGTAGAGGTTATCAGAAACACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
TGTCGTGAGATGTTAGGTTAAGTCCTAAAACGAGCGAAACCCTTATCGTTAGTTGCCAGCACGTT
ATGGTGGGGACTTTAACGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGAGGATCACGTCAAATCA
GCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAACG
TAAGTTCTTGGCCAATCCCCAAAAACAGTCTCAGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATG
AAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACA
CACCGCCCGTCA

SEPL3 : 1,246 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAA
TAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGAC
TATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATT
CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTA
AGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGG
AATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGC
TGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTA
CTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG
GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCA
AAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAAT
GGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCAT
CATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGC
AAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATG
AAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACA
CACCGCCCGTCA

จังหวัดบุรีรัมย์

ยีน 16S rRNA

SEBR4 : 1,247 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAAGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAA
TAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGAC
TATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATT
CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGG
GGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCT
AAGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTG
GAATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTG
CTGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG
TCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGT
ACTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGAAATTGACGGGACTCCGCACAAGC
GGTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGC
AAAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAA
TGGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCA
TCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCG
CAAGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCAT
GAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCGCGGGGTTTGTAC
ACACCGCCCGTCA

SEBR4 : 1,246 bp

ACGACTGCTGCTAAGACTGGATAGGAGACAAGAGGGCATCTTCTTGTTTTTAAAAGACCTAGCAA
TAGGTATGCTTAGGGAGGAGCTTGCGTCACATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGAC
TATGATGTGTAGCCGGGCTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGAGGAAACTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGA
ACGATGAAGTATTTCGGTACGTAAAGTTCTTTTATTAGGGAAGAATAAATGATGGAAAAATCATT
CTGACGGTACCTAATGAATAAGCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGCAATACGTAGGGG
GCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGTTAAATAAGTTTATGGTCTA
AGTGCAATGCTCAACATTGTGATGCTATAAAAACTGTTTAGCTAGAGTAAGATAGAGGCAAGTGG
AATTCCATGTGTAGTGGTAAAATGCGTAAATATATGGAGGAACACCAGTAGCGAAGGCGGCTTGC
TGGGTCTTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAACGTTGGGTAAAACCAGTGTTGAAGTTAACACATTAAGTA
CTCCGCCTGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACTCCGCACAAGCG
GTGGATCATGTTGTTTAATTCGAAGGTACCCGAAAAACCTCACCAGGTCTTGACATGCTTCTGCA
AAGCTGTAGAAACACAGTGGAGGTTATCAGTTGCACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTACCAGCACGTAAT
GGTGGGGACTTTAGCAAGACTGCCAGTGATAAATTGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATC
ATGCCCCTTATGACCTGGGCTACAAACGTGATACAATGGCTGTTACAAAGGGTAGCTGAAGCGCA
AGTTTTTGGCGAATCTCAAAAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGA
AGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGGTTTGTACAC
ACCGCCCGTCA

ภาคผนวกที่ 2

ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงา

จังหวัดลพบุรี

ยีน *secY*

SELB6 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGCAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTTTTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATACTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTTTTGTGCAATTTCTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAAACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTG
CATGTATTGCTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACCATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCAAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

จังหวัดนครราชสีมา

ยีน *secY*

SENM1 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATACTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTGTAGTGCAATTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAAACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTG
CATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACTATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTTATTAAGCCAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

จังหวัดสุโขทัย

ยีน *secY*

SEST1 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATGCTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTGTAGTGCAATTTTTGCAAAAAATTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAAACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTA
CATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACTATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCCAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

SEST2 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATGCTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTGTAGTGCAATTTTTGCAAAAAATTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAAACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTA
CATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACTATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCAAACAAGAC
AACATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

จังหวัดนครสวรรค์

ยีน *secY*

SENW1 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATACTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTGTAGTGCAATTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAAACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTG
CATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAATTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCCTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAAATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACTATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCCAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

SENW8 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTCGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATACTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTTTAGTGCAATTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAGACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTG
CATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACCATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCAAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

จังหวัดเลย

ยีน *secY*

SELE1 : 1,358 bp

AGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAGT
TTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGTT
TAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGGG
GTTTTTTCCATAAATACTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCAT
TGTAGTGCAATTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATGG
GCAAACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTTT
GCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGTT
AGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAAG
GTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATTT
GTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTGC
ATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTAA
AAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAAT
AGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAGG
AGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAAA
ACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTCT
GCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACTATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCCAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

จังหวัดพิษณุโลก

ยีน *secY*

SEPL1 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATACTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTGTAGTGCAATTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAAACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTG
CATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACTATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCCAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

SEPL3 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATACTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTGTAGTGCAATTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAAACGCAAACTTAATCTTTTAATACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTG
CATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACTATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCCAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

จังหวัดบุรีรัมย์

ยีน *secY*

SEBR4 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATACTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTGTAGTGCAATTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAAACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTG
CATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCTTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGAACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACTATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCCAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

SEBR5 : 1,358 bp

CAGCCATTTTAGCAGTTGGTGGAAATATAGAGGTAATTTAAAGATGAAACGTCAATTAAAATTAG
TTTTAGGCAATCGTAAATTAATGTTTCAAATCTTTTTTACCTTATTTATTATTTCTATTGTTTGT
TTAGGAACTTCTTGGCCTCTTCCTTTTATTAATACTAAATCCCTTGATTTGTCCAAACTTTTTGG
GGTTTTTTCCATAAATACTGGTACTCTTTTTGGATTGGGAATCACTCCTTACATCACTGCTTCCA
TTGTAGTGCAATTTTTGCAAAAACTTCTTCCTATTTGTCGCGAATGGAAAGACCAAGGACAAATG
GGCAAACGCAAACTTAATCTTTTAACACGTAGTCTTGCCTTATTGTTTGCTTTTGGGCAATCTTT
TGCTTTTTTGAACAGTTATTCAAAACTTTTTGTCACATCAATAAGTACAAGCCAACTGTTTTTGT
TAGCTTTAATTGCTACTGCAGGAGTTGCTATTTTAATTTGGTTTGCTGACCTTATCAATTCCAAA
GGTATTGGAAACGGGACTTCTATTTTAATTGTTGTTTCGATGAGCCACAGCCTAATTAATCTATT
TGTAAATCTGAACGAATCATATTTATCTCAAAACAATTTTTTAACTTTGAAAACTTTTAATTTTG
CATGTATTGTTCTTTTACTTCTCTTATTTTTAATTTTTACTGTAGTTGTGCAAATAACATCGTTA
AAAATACCTATCAATTATGCGCGCAATCAAGTGCAAGGGAAAAGCTACATTCCATTAAAAATTAA
TAGTGCAGGAGTTATGCCAGTTATTTTGGCATCTGCTTTATTGCAACCTTTCCAGATGTTAGCAG
GAGTTATTGGGAATACAAAATTTACAGAATTAGTAGATTTTTTTGCCAAAACTAACTTTCCTGAA
AACCAAATTAACTTTTTTGCCATAGGCTTTTTAGTCTTGTTAGTAATTGTTTTTTCTTTCTTTTC
TGCTTTTATGAATGTCAATCCTGAAGATATTTCAGAACATTTATCCAAACAAGATGCCTATATTG
CAGGTTTAAGACCAGGTGGACAAACTACTCGTTATTTAGCTAATACCTTATTTAAAATCACTGTT
TTAGGAACTGTTTTTATTGCTGCTCTTGTTGTAACACCTATTCTTATGGAACATTTTTTAGGTTT
GAAAGATATGAAATTAGGAGGAACCAGTTTGCTTATTATTGTTAGTGTAGCCCTTGAAACTATCC
AACGCATCAAAGCTACTGCCAACAAAAAAGAATATCAAAAATTATTTTAATTAAGCCAACAAGAC
AATATGATACTAATATTATTAGGACCGCCCGGAATTGGTAAAGGCACTCAAGCTTCTG

ภาคผนวกที่ 3

ตารางผนวกที่ 3.1 แสดงค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16 S rRNA ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในแต่ละไอโซเลท เมื่อเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน

		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
1.	16SrI												
2.	SP-MYAN	99.9											
3.	SEBR5	99.3	99.4										
4.	SEPL3	99.5	99.6	99.8									
5.	SEBR4	99.4	99.3	99.6	99.8								
6.	SENM1	98.9	99.0	99.3	99.4	99.3							
7.	SEST1	99.1	99.2	99.4	99.6	99.4	99.5						
8.	SEST2	99.3	99.2	99.4	99.6	99.6	99.3	99.5					
9.	SELE1	99.3	99.2	99.4	99.6	99.6	99.3	99.5	99.7				
10.	SENW1	99.3	99.2	99.4	99.6	99.6	99.2	99.3	99.5	99.7			
11.	16SrXII	96.3	96.2	95.6	95.7	95.7	95.3	95.3	95.5	95.6	95.6		
12.	16SrXIII	96.7	96.6	96.1	96.3	96.2	95.8	95.8	96.0	96.1	96.1	96.2	
13.	SEKB5	89.0	88.9	89.2	89.4	89.3	88.9	88.9	89.1	89.3	89.3	88.1	88.6
14.	SEPB2	89.4	89.3	89.6	89.8	89.7	89.3	89.3	89.5	89.7	89.7	88.5	89.0
15.	SENM5	88.9	88.8	89.1	89.3	89.2	88.8	88.8	89.0	89.2	89.2	88.0	88.5
16.	SELE2	89.2	89.1	89.4	89.6	89.6	89.4	89.4	89.6	89.8	89.7	88.3	88.8
17.	SEPB1	89.1	89.0	89.3	89.5	89.5	89.2	89.2	89.4	89.6	89.6	88.2	88.7
18.	SELB5	89.2	89.1	89.4	89.6	89.6	89.3	89.3	89.5	89.7	89.7	88.3	89.0
19.	SEKB4	89.3	89.2	89.5	89.7	89.8	89.3	89.3	89.5	89.7	89.7	88.4	88.9
20.	16SrII	89.6	89.5	89.1	89.3	89.2	88.8	88.8	89.0	89.2	89.2	88.7	89.3
21.	SEPT	89.2	89.1	88.7	88.9	88.8	88.4	88.4	88.6	88.8	88.8	88.3	88.9
22.	SEPN	89.2	89.1	88.7	88.9	88.8	88.4	88.4	88.6	88.8	88.8	88.3	88.9
23.	SIL	89.5	89.4	89.0	89.2	89.1	88.7	88.7	88.9	89.1	89.1	88.7	89.2
24.	SIF	89.7	89.6	89.2	89.4	89.3	88.9	88.9	89.1	89.3	89.3	88.8	89.3
25.	16SrXV	89.5	89.4	88.8	89.0	88.9	88.5	88.5	88.7	88.9	88.9	89.0	89.1
26.	16SrV	90.7	90.6	90.2	90.3	90.3	89.9	89.9	90.1	90.1	90.1	88.7	89.7
27.	16SrVI	90.8	90.8	90.3	90.5	90.4	90.0	90.0	90.2	90.2	90.2	89.2	90.5
28.	16SrVII	90.6	90.5	90.1	90.3	90.2	89.6	89.8	90.0	90.1	90.1	89.6	90.0
29.	16SrVIII	91.0	90.9	90.4	90.6	90.5	89.9	90.1	90.3	90.3	90.3	89.5	89.9
30.	16SrIV	90.8	90.8	90.4	90.6	90.5	90.1	90.1	90.3	90.4	90.6	89.6	91.0
31.	16SrIX	88.9	88.8	88.4	88.6	88.5	88.1	88.1	88.3	88.4	88.4	88.7	89.5
32.	16SrXI	90.5	90.4	90.0	90.2	90.1	89.7	89.7	89.9	90.0	90.0	89.3	90.4
33.	16SrXIV	90.5	90.4	90.0	90.2	90.1	89.7	89.7	89.9	90.0	90.0	89.1	90.8
34.	16SrIII	90.7	90.6	90.2	90.4	90.3	89.9	89.9	90.1	90.3	90.3	89.2	90.5
35.	16SrX	92.5	92.4	91.7	91.9	91.8	91.3	91.5	91.6	91.7	91.7	91.9	92.6
36.	Out Group	87.4	87.3	87.0	87.2	87.1	86.5	86.7	86.9	87.0	87.0	86.9	87.0

ตารางผนวกที่ 3.1 (ต่อ)

		13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.
1.	16SrI												
2.	SP-MYAN												
3.	SEBR5												
4.	SEPL3												
5.	SEBR4												
6.	SENM1												
7.	SEST1												
8.	SEST2												
9.	SELE1												
10.	SENW1												
11.	16SrXII												
12.	16SrXIII												
13.	SEKB5												
14.	SEPB2	99.7											
15.	SENM5	99.3	99.6										
16.	SELE2	99.5	99.8	99.4									
17.	SEPB1	99.4	99.8	99.3	99.8								
18.	SELB5	99.4	99.8	99.3	99.8	99.7							
19.	SEKB4	99.4	99.8	99.3	99.7	99.6	99.6						
20.	16SrII	99.1	99.4	99.0	99.3	99.2	99.2	99.2					
21.	SEPT	98.9	99.3	98.8	99.1	99.0	99.0	99.0	99.7				
22.	SEPN	98.9	99.3	98.8	99.1	99.0	99.0	99.0	99.7	100.0			
23.	SIL	98.8	99.1	98.7	98.9	98.8	98.8	98.8	99.7	99.3	99.3		
24.	SIF	98.8	99.2	98.8	99.0	98.9	98.9	98.9	99.8	99.4	99.4	99.8	
25.	16SrXV	95.8	96.2	95.7	96.0	95.9	95.9	95.9	96.8	96.4	96.4	96.8	96.9
26.	16SrV	89.6	90.0	89.5	89.8	89.7	89.8	89.9	90.1	89.9	89.9	90.0	90.0
27.	16SrVI	90.4	90.7	90.2	90.5	90.4	90.4	90.6	90.9	90.7	90.7	90.7	90.8
28.	16SrVII	90.3	90.7	90.2	90.5	90.4	90.4	90.6	91.0	90.8	90.8	90.8	90.9
29.	16SrVIII	90.5	90.8	90.3	90.6	90.5	90.6	90.7	91.1	90.9	90.9	90.9	91.0
30.	16SrIV	91.1	91.5	91.0	91.3	91.2	91.3	91.4	91.8	91.8	91.8	91.6	91.7
31.	16SrIX	90.4	90.7	90.3	90.5	90.5	90.6	90.6	91.2	90.8	90.8	91.0	91.1
32.	16SrXI	91.4	91.8	91.3	91.6	91.5	91.5	91.7	92.0	91.8	91.8	91.8	91.9
33.	16SrXIV	91.0	91.4	90.9	91.2	91.1	91.2	91.3	91.7	91.5	91.5	91.5	91.6
34.	16SrIII	91.6	92.0	91.7	91.8	91.7	91.7	91.9	92.2	92.1	92.1	92.2	92.3
35.	16SrX	89.1	89.5	89.0	89.3	89.2	89.3	89.4	89.5	89.3	89.3	89.3	89.4
36.	Out Group	83.6	84.0	83.4	83.8	83.7	83.8	83.9	84.3	83.9	83.9	84.1	84.2

ตารางผนวกที่ 3.1 (ต่อ)

		25.	26.	27.	28.	29.	30.	31.	32.	33.	34.	35.
1.	16SrI											
2.	SP-MYAN											
3.	SEBR5											
4.	SEPL3											
5.	SEBR4											
6.	SENM1											
7.	SEST1											
8.	SEST2											
9.	SELE1											
10.	SENW1											
11	16SrXII											
12.	16SrXIII											
13.	SEKB5											
14.	SEPB2											
15.	SENM5											
16.	SELE2											
17.	SEPB1											
18	SELB5											
19.	SEKB4											
20.	16SrII											
21.	SEPT											
22.	SEPN											
23.	SIL											
24.	SIF											
25.	16SrXV											
26.	16SrV	90.4										
27.	16SrVI	90.6	97.8									
28.	16SrVII	90.8	96.5	97.7								
29.	16SrVIII	90.9	96.6	97.1	96.6							
30.	16SrIV	91.0	95.7	95.9	94.8	95.2						
31.	16SrIX	90.6	93.9	94.2	93.8	93.8	94.0					
32.	16SrXI	90.9	95.2	95.8	95.4	95.3	95.3	94.5				
33.	16SrXIV	90.6	95.4	96	95.4	95.5	95.4	94.7	98.5			
34.	16SrIII	92.0	93.9	94.3	93.4	94	94.1	93.9	94.3	94.3		
35.	16SrX	89.7	91.6	91.5	91.5	92.1	91.9	91.0	92.5	92.5	91.3	
36.	Out Group	83.0	85.0	85.5	85.3	85.2	85.8	85.4	86.2	86.7	85.5	87.6

ตารางผนวกที่ 3.2 แสดงค่าความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *secY* ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในแต่ละไอโซเลท เมื่อเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน

		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8	9.	10.	11.
1.	SPP_SEPT											
2.	SPP_SEPN	100.0										
3.	SecY-II	99.6	99.6									
4.	SecY-III	59.2	59.2	59.1								
5.	SecY-VI	56.0	56.0	55.9	52.1							
6.	SecY-VII	56.8	56.8	56.6	52.9	74.9						
7.	SecY-V	55.2	55.2	55.1	52.1	72.1	69.4					
8.	SecY-VIII	57.4	57.4	57.4	49.2	66.5	67.4	62.7				
9.	SecY-IV	58.8	58.8	58.5	57.0	61.0	58	58.6	59.6			
10.	SEBR4	32.0	32.0	32.0	34.4	35.9	34.5	32.6	34.7	35.7		
11.	SELE1	32.0	32.0	32.0	34.4	35.9	34.5	32.6	34.7	35.7	100.0	
12.	SENM1	31.8	31.8	31.8	34.2	35.7	34.5	32.4	34.7	35.5	99.9	99.9
13.	SEBR5	31.5	31.5	31.5	34.0	35.7	34.3	32.4	34.5	35.5	99.8	99.8
14.	SEPL3	31.8	31.8	31.8	34.2	35.7	34.3	32.4	34.7	35.5	99.9	99.9
15.	SENW1	31.8	31.8	31.8	33.8	36.1	35.2	32.8	34.9	35.5	99.7	99.7
16.	SEST1	32.4	32.4	32.4	34.7	36.1	34.7	32.8	34.9	35.7	99.7	99.7
17.	SEST2	32.4	32.4	32.4	34.7	36.1	34.7	32.8	34.9	35.7	99.7	99.7
18.	SecY-I	31.3	31.3	31.3	34.3	35.9	34.3	32.6	34.3	35.5	99.4	99.4
19.	SecY-XII	35.6	35.6	35.6	38.9	37.4	33.7	34.5	39.4	36.4	61.7	61.7
20.	SecY-XIII	35.6	35.6	35.6	38.1	38.0	39.8	33.7	35.5	40.7	64.3	64.3
21.	SecY-X	42.8	42.8	42.6	36.6	45.0	45.1	41.1	46.8	49.8	43.2	43.2
22.	Out Group	25.6	25.6	25.4	21.3	25.2	23.1	23.0	24.4	27.6	24.4	24.4

ตารางผนวกที่ 3.2 (ต่อ)

		12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.
1.	SPP_SEPT										
2.	SPP_SEPN										
3.	SecY-II										
4.	SecY-III										
5.	SecY-VI										
6.	SecY-VII										
7.	SecY-V										
8.	SecY-VIII										
9.	SecY-IV										
10.	SEBR4										
11.	SELE1										
12.	SENM1										
13.	SEBR5	99.7									
14.	SEPL3	99.8	99.7								
15.	SENW1	99.6	99.6	99.6							
16.	SEST1	99.6	99.6	99.6	99.5						
17.	SEST2	99.6	99.6	99.6	99.5	100.0					
18.	SecY-I	99.3	99.2	99.3	99.1	99.3	99.3				
19.	SecY-XII	61.6	61.4	61.6	61.3	61.8	61.8	61.7			
20.	SecY-XIII	64.1	64.0	64.1	64.0	64.3	64.3	64.6	69.4		
21.	SecY-X	43.0	42.8	43.0	43.0	42.8	42.8	42.8	45.0	44.1	
22.	Out Group	24.1	24.1	24.1	24.4	24.3	24.3	24.4	24.0	23.4	28.2

ตารางผนวกที่ 3.3 แสดงค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของยีน 16S rRNA และกลุ่ม/กลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในแต่ละไอโซเลท เมื่อเทียบกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่เป็นตัวแทน

ไอโซเลท	สายพันธุ์อ้างอิง (GenBank accession no.)	ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึง	กลุ่ม/กลุ่มย่อย
SELB5	L33765	0.92	16SrII-A*
SENM1	NC_005303	1.00	16SrI-B
SENM5	L33765	1.00	16SrII-A
SEST1	NC_005303	0.94	16SrI-B*
SEST2	NC_005303	1.00	16SrI-B
SEPB1	L33765	0.94	16SrII-A*
SEPB2	L33765	1.00	16SrII-A
SENW1	NC_005303	0.98	16SrI-B
SEKB4	L33765	0.97	16SrII-A*
SEKB5	L33765	1.00	16SrII-A
SELE1	NC_005303	0.99	16SrI-B
SELE2	L33765	1.00	16SrII-A
SEPL3	NC_005303	1.00	16SrI-B
SEBR4	NC_005303	1.00	16SrI-B
SEBR5	NC_005303	1.00	16SrI-B

หมายเหตุ L33765 คือ Peanut witches'-broom phytoplasma

NC_005303 คือ Onion yellows phytoplasma OY-M

* คือ ไอโซเลทที่จัดอยู่ในกลุ่มย่อยใหม่ในกลุ่ม 16SrI และ 16SrII

ตารางผนวกที่ 3.4 แสดงข้อมูลของตัวแทนกลุ่มย่อยของเชื้อไฟโตพลาสมาในกลุ่ม 16SrI และ 16SrII ที่กำหนดโดยโปรแกรม *i*Phyclassifier

กลุ่มย่อย	GenBank accession number	สายพันธุ์อ้างอิง
กลุ่ม 16SrI		
A	NC_007716	Aster yellows witches'-broom phytoplasma AYWB
B	NC_005303	Onion yellows phytoplasma OY-M, strain onion yellows
C	AF222065	Clover phyllody phytoplasma, strain CPh
D	AY265206	Aster yellows phytoplasma, strain PaWB
E	AY265213	Blueberry stunt phytoplasma, strain BBS3
F	AY265211	Aster yellows phytoplasma, strain ACLR-AY
K	U96616	Phytoplasma sp., strain STRAWB2
O	AF268405	Aster yellows phytoplasma O, isolate 98UW166B
P	AF503568	Aster yellows phytoplasma I-P
Q	AY034089	Cherry little leaf phytoplasma, strain CherLL
กลุ่ม 16SrII		
A	L33765	Peanut witches'-broom phytoplasma
B	U15442	*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia, strain WBDL
C	AJ293216	Cactus witches'-broom phytoplasma, isolate YNO1
D	Y10097	Mollicutes sp. (associated with papaya yellow crinkle disease)
F	EU099556	Cactus witches'-broom phytoplasma, strain YN11
G	EU099568	Cactus witches'-broom phytoplasma, strain YN23
H	EU099569	Cactus witches'-broom phytoplasma, strain YN24
I	EU099551	Cactus witches'-broom phytoplasma, strain YN06
J	EU099552	Cactus witches'-broom phytoplasma, strain YN07
K	EU099572	Cactus witches'-broom phytoplasma, strain YN28
L	EU099546	Cactus witches'-broom phytoplasma, strain YN01
S	AF200718	Cactus phytoplasma 'Martinez-Soriano 1999'

ภาคผนวกที่ 4
การนำผลการวิจัยไปเผยแพร่/ถ่ายทอด

4.1 นาถยา พานทอง สุภาพร กลิ่นคง วิชัย โฆสิตรัตน และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2554. การจำแนกเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคแตกพุ่มฝอยของงาในประเทศไทยด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร ว. วิทย.กษ. 42(3).337-348.

4.2 Panthong, N., S. Klinkong, W. Kositratana and S. Patarapuwadol. 2010. Molecular Classification of Phytoplasma Associated with Sesame (*Sesamum indicum* L.) Phyllody in Thailand. The 4th AG-BIO/PERDO Graduate Conference on Agricultural Biotechnology and UT-KU Joint Seminar. Kasetsart University, Nakhon Pathom. p. 29.