

ชื่อวิทยานิพนธ์

การตรวจสอบและแยกชนิดของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย
ในอ้อยและแมลงพาหะ โดยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์

นางสาวชุตินันท์ ชูสาย

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพา หาญบุญทรง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรทิพย์ วงศ์แก้ว)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พิศาล ศิริวรร)

บทคัดย่อ

การใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (Polymerase Chain Reaction: PCR) เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวในอ้อย พืชอื่นๆ และในแมลงพาหะเพลี้ยจักจั่น *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) จากการใช้ primer ที่สังเคราะห์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมา 3 ส่วน ซึ่งประกอบด้วย primer ที่สังเคราะห์จากส่วนของยีน 16s rRNA ได้แก่ universal primer (U 1, U 2), specific primer (MLO 1, MLO X, P 1) primer ที่เจาะจงในส่วนของยีน 23s rRNA ได้แก่ specific primer MLO 7, MLO Y, P 2 และ primer ที่ส่วน intergenic spacer ได้แก่ specific primer MLO 3 ความเข้มข้นของสารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมในปฏิกิริยา คือ 4 มิลลิโมลาร์ สำหรับชุด primer MLO X, MLO Y และ 1.5 มิลลิโมลาร์สำหรับ primer อื่น แต่ละรอบของปฏิกิริยาประกอบด้วยช่วง denaturation เป็นเวลา 60 วินาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสใน primer อื่น ยกเว้น primer MLO X, MLO Y และ P 1, P 2 ใช้ที่ 92 องศาเซลเซียส ช่วง annealing เป็นเวลา 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสใน primer อื่น ยกเว้น primer P 1, P 2 ใช้ที่ 68 องศาเซลเซียส และในช่วง extension เป็นเวลา 90 วินาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสในทุก primer ส่วนจำนวนรอบ

ของปฏิกิริยาสำหรับตรวจพืชอยู่ที่ 30 รอบและการตรวจแมลงพาหะใช้ 37 หรือ 40 รอบ ขึ้นอยู่กับชุด primer ที่ใช้

การตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดโรคใบขาวในอ้อย หน้้าข้อ หน้้าแพรก หน้้าปากควาย อาการใบเหลืองในหน้้ามาเลเชีย หน้้าเจ้าชู้ หน้้าขน ผักปราบ ตะไคร้หอม อาการใบต่างในอ้อยและแข่งใบมน และอาการกอตะไคร้ในอ้อย โดยเทคนิค PCR โดยใช้ universal primer สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาขนาด 1.35 kb จากอ้อยที่แสดงอาการใบขาวและอาการกอตะไคร้ และพืชอื่นๆที่แสดงอาการใบขาวและอาการใบเหลือง แต่ไม่พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากอ้อยปกติ อ้อยและแข่งใบมนที่แสดงอาการใบต่าง และเมื่อตรวจโดยใช้ specific primer MLO 1, MLO 3 พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็น 2 แถบขนาด 654 และ 720 bp จากหน้้ามาเลเชีย หน้้าเจ้าชู้ ผักปราบ และหน้้าขนที่แสดงอาการใบเหลือง แต่ในอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ และอ้อย หน้้าข้อ หน้้าแพรก หน้้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 654 bp ส่วนการใช้ primer MLO 1, MLO 7 เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ และอ้อย หน้้าข้อ หน้้าแพรก หน้้าปากควายที่แสดงอาการใบขาวพบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 810 bp และผลจากการตรวจในแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* (Matsumura) โดยใช้เทคนิค nested PCR พบแถบชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 654 และ 218 bp จากการใช้ชุด primer U 1, MLO 7 กับ MLO 1, MLO 3 และ MLO X, MLO Y กับ P 1, P 2 ตามลำดับ

การศึกษารูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอของเชื้อไฟโตพลาสมาที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) ในอ้อยและพืชอื่นๆ โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่เพิ่มปริมาณจากการใช้ universal primer มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 15 ชนิด ได้แก่ *Msp* I, *Rsa* I, *Alu* I, *Acc* I, *Hpa* I, *Hpa* II, *Dra* I, *Xba* I, *Bgl* I, *EcoR* I, *Kpn* I, *Sal* I, *BamH* I, *Hind* III และ *Taq* I พบว่า รูปแบบ RFLPของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อย หน้้าข้อ หน้้าแพรก และหน้้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว แตกต่างจากอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิด *Msp* I และ *Hpa* II รูปแบบ RFLP ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยที่แสดงอาการใบขาว แตกต่างจากหน้้าข้อ หน้้าแพรก และหน้้าปากควายที่แสดงอาการใบขาวเมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ชนิด *Taq* I ส่วนรูปแบบ RFLP ของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยและพืชอื่นๆที่แสดงอาการใบขาว และอ้อยที่แสดงอาการกอตะไคร้ ที่เพิ่มปริมาณจากการใช้ specific primer MLO 1, MLO 3 ไม่แตกต่างกัน

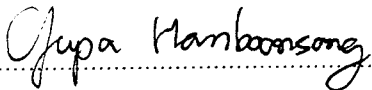
การศึกษาคความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไฟโตพลาสมาในอ้อยแสดงอาการกอตะไคร้ อ้อย หน้้าข้อ หน้้าแพรก หน้้าปากควายที่แสดงอาการใบขาว และแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus*

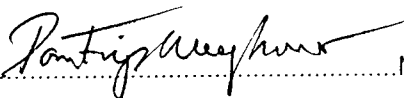
(Matsumura) โดยการตรวจลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ระหว่างยีน 16s rRNA และ 23s rRNA ในพืช กับ 16s rRNA และ intergenic spacer ในแมลงพาหะ พบว่า เชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้้อยแสดงอาการใบขาว และอาการกอตะไคร้อยในกลุ่มเดียวกัน และมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกัน แต่เชื้อไฟโตพลาสมาในหญ้าขจร้อย หญ้าแพรก และหญ้าปากควาย ที่แสดงอาการใบขาวจัดอยู่อีกกลุ่มหนึ่ง ส่วนเชื้อไฟโตพลาสมาในแมลงพาหะ *M. hiroglyphicus* (Matsumura) มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับเชื้อไฟโตพลาสมาที่ทำให้เกิดอาการใบขาวใน้อย

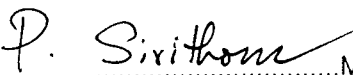
THESIS TITLE : DETECTION AND DIFFERENTIATION OF PHYTOPLASMA
ASSOCIATED WITH SUGARCANE WHITE LEAF DISEASE IN
SUGARCANE AND INSECT VECTOR USING MOLECULAR
TECHNIQUES

AUTHOR : MISS CHUTINAN CHOOSAI

THESIS ADVISORY COMMITTEE :

.....Chairman
(Assistant Professor Dr.Yupa Hanboonsong)

.....Member
(Associate Professor Dr.Porntip Wongkaew)

.....Member
(Associate Professor Dr.Pisan Sirithon)

ABSTRACT

The Polymerase Chain Reaction (PCR) method was developed to detect phytoplasma associated with white leaf disease in sugarcane, other plants and insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura). The primer sets used were from three phytoplasmas DNA regions including a conserved region in the 16s rRNA (Universal primers: U 1, U 2, specific primers MLO 1, MLO X, P 1), a specific region in the 23s rRNA (specific primers MLO 7, MLO Y, P 2) and intergenic spacer region (specific primer MLO 3). Optimal concentration of magnesium chloride in the reaction was 4 mM for primers MLO X and MLO Y and 1.5 mM for other primer sets. Each PCR cycle consisted of 60s denaturation at 94 °C (92 °C for primers MLO X, MLO Y and primers P 1, P 2), 30s annealing at 60 °C (68 °C for primers P 1, P 2) and 90s extension

at 72 °C. Thirty PCR cycles were carried out in plants and thirty-seven or forty PCR cycles were used in insect vector depended on the set of primers.

Detection of phytoplasma that cause white leaf disease in sugarcane, brachiaria grass, bermuda grass, crowfoot grass; and yellow leaf disease in carpet grass, gold beard grass, panicum grass, dayflower and citronella grass; chlorosis symptoms in sugarcane and wire bush and grassy shoot symptom in sugarcane was carried out using PCR. Universal primers amplified a 1.35 kb DNA fragment from phytoplasma sugarcane with white leaf and grassy shoot symptoms and other plants with symptoms of white leaf and yellow leaf disease. No band was obtained from healthy sugarcane and from sugarcane and wire bush with chlorosis symptoms. Two DNA fragments of 654 bp and 720 bp were amplified by using specific primers MLO1 and MLO3 from carpet grass, gold beard grass, dayflower, and panicum grass showing yellow leaf symptoms. But a DNA fragment of 654 bp was amplified in sugarcane with grassy shoot symptom and sugarcane, brachiaria grass, bermuda grass, citronella grass and crowfoot grass with white leaf symptoms. PCR amplification with specific primers MLO1 and MLO 7 of DNA from sugarcane with grassy shoot symptom and sugarcane, brachiaria grass, bermuda grass, and crowfoot grass with white leaf symptoms resulted in a 810 bp fragment. Nested PCR performed in insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) resulted in 654 bp and 218 bp fragments by using primer sets of U 1, MLO 7; primer MLO 1, MLO 3 and primer sets MLO X, MLO Y; primer P 1, P 2, respectively.

RFLP patterns of phytoplasma infected sugarcane and other plants were studied by digestion of PCR product that amplified by using Universal primers with 15 restriction endonucleases: *Msp* I, *Rsa* I, *Alu* I, *Acc* I, *Hpa* I, *Hpa* II, *Dra* I, *Xba* I, *Bgl* I, *EcoR* I, *Kpn* I, *Sal* I, *BamH* I, *Hind* III and *Taq* I. Restriction digestion of PCR product with *Msp* I and *Hpa* II showed different banding patterns in sugarcane with grassy shoot symptom compared to sugarcane and weeds showing white leaf symptom. Digestion of PCR products with *Taq* I showed different banding patterns in sugarcane with white leaf disease compared to brachiaria grass, bermuda grass and crowfoot grass showing

white leaf symptoms. No different banding pattern was obtained in sugarcane, brachiaria grass, bermuda grass and crowfoot grass with white leaf symptoms compared to sugarcane with grassy shoot symptom by digestion of PCR product that amplified with specific primers MLO 1, MLO 3.

The genetic relationships of phytoplasma in sugarcane with grassy shoot symptom; sugarcane, brachiaria grass, bermuda grass with white leaf symptoms and the insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) were investigated by sequencing of DNA fragments between 16s rRNA and 23s rRNA in plants, and 16s rRNA and intergenic spacer region in insect vector. Phytoplasmas in sugarcane with grassy shoot and white leaf symptoms were closely related and clustered in the same group. Phytoplasma in brachiaria grass, crowfoot and bermuda grass with white leaf symptoms were clustered in another group. The phytoplasma in insect vector *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) was closely related with phytoplasma associated with sugarcane white leaf.