ผลงานฉบับเต็ม

ของ

นายปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์

ตำแหน่ง นักวิชาการโรคพืชชำนาญการ

ตำแหน่งเลขที่ 935

กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

กรมวิชาการเกษตร

ขอประเมินเพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่ง นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ

ตำแหน่งเลขที่ 935

กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

		หน้า
1.	การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ (Interception of *Columnea latent viroid* (CLVd) in Imported Tomato Seed)	1
2.	การคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอต้านทานไวรัสจุดวงแหวน *Papaya ringspot virus* ในสภาพเรือนทดลอง (Screening Papaya Varieties for Resistant to *Papaya ringspot virus* under Greenhouse Condition)	42
3.	พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์กับส่วนขยายพันธุ์ของส้ม (Development of Viroid Detection on Citrus propagation)	67

กรมวิชาการเกษตร

ผลงานเรื่องที่ 1

พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์กับส่วนขยายพันธุ์ของส้ม

Development of Viroid Detection on Citrus propagation

กรมวิชาการเกษตร

เรื่อง การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Interception of *Columnea latent viroid* (CLVd) in Imported Tomato Seed

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[1] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1]
กาญจนา วาระวิชะนี[1] วันเพ็ญ ศรีชาติ[2]
กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[1]
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[2]

บทคัดย่อ

เชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อโรคพืชกักกันของประเทศไทย ไวรอยด์ชนิดนี้เป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของมะเขือเทศ ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 49 เปอร์เซ็นต์ เชื้อชนิดนี้มีพืชอาศัยที่กว้าง เช่น มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, แตงกวา, พริก, มะเขือชนิดต่าง ๆ และไม้ประดับอีกหลายชนิด อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ จากผลการตรวจสอบติดตามเพื่อการสกัดเชื้อ CLVd กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ (interception) ในกลุ่มประเทศที่มีความเสี่ยง ตั้งแต่ปี 2554 ถึง 2555 ด้วยวิธีการเพาะในโรงเรือน (seedling symptom test) เพื่อสังเกตอาการ และสุ่มตรวจด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR โดยสุ่มตรวจตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในปี 2554 จำนวน 6 ครั้ง จาก 7 ประเทศ และในปี 2555 จำนวน 10 ครั้ง จาก 12 ประเทศ ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ CLVd กับตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว และเมื่อทำการสำรวจและตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ที่ใช้เมล็ดพ่อ-แม่พันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (monitoring) ด้วยวิธีการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (Biological indexing) ตามด้วยเทคนิค RT-PCR และการใช้ความรู้ทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) เข้าช่วย สามารถตรวจพบเชื้อ CLVd จำนวน 4 ตัวอย่าง และเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) จำนวน 4 ตัวอย่าง โดยจากการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด พบว่ามีความเป็นไปได้ที่เชื้อดังกล่าวอาจเข้ามาตั้งรกรากในประเทศไทยแล้ว (establish) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ CLVd สายพันธุ์ใหม่จาก 1 ใน 4 isolate ที่ตรวจพบ มีคุณสมบัติในการทำให้พืชทดสอบมะอีก (*Solanum stramonifolium*) เกิดอาการที่รุนแรง คือทำให้เกิดอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ยอดและใบหดลดรูป ใบมีอาการด่าง เนื้อใบหดย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบและก้านใบ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อ CLVd isolate เดิมที่เคยมีการรายงานที่จะไม่แสดงอาการผิดปกติ (latent) บนมะอีก และจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับเชื้อ CLVd isolate เดิม พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันเพียง 2 เบสเท่านั้นที่

รหัสการทดลอง 03-04-54-03-03-00-10-54

มีความสัมพันธ์กับลักษณะอาการผิดปกติที่ปรากฏบนมะอึก คือที่ตำแหน่ง 83 ที่เกิดการเติมเบส A เพิ่มขึ้น 1 เบส (base insertion) และที่ตำแหน่ง 292 ที่เกิดการเปลี่ยนเบสจาก A หรือ T เป็นเบส G (base substitution) โดยทั้ง 2 เบสอยู่บริเวณตำแหน่ง P domain ของเชื้อไวรอยด์ ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกและความรุนแรงของอาการโรค

คำนำ

เชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุดที่มีรายงาน มีองค์ประกอบเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นวงปิดไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม มีขนาดประมาณ 370 เบส โดยปกติแล้วอาร์เอ็นเอไวรอยด์จะอยู่ในสภาพโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะเป็น rod-shape เนื่องจากการเกิดจับกันของเบสในสายอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรอยด์ด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความเสถียรมากที่สุด ไวรอยด์เป็นเชื้อปรสิตถาวรในพืชที่ไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ การเพิ่มปริมาณ การเคลื่อนย้าย และการทำให้พืชเกิดอาการผิดปกติจะใช้โปรตีนและสารเคมีต่าง ๆ จากพืชอาศัย (Hadidi *et al.*, 2003)

เชื้อ CLVd จัดจำแนกอยู่ในวงศ์ Pospiviroidae สกุล *Pospiviroid* เชื้อชนิดนี้เข้าทำลายพืชหลายชนิด เช่น มะเขือเทศ, มันฝรั่ง, แตงกวา, พริก, ต้นลิปสติก และพืชอื่นในสกุล *solanum* spp. เชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดโรคได้หลายทาง ได้แก่ ทางกล เช่น ทางบาดแผล, เมล็ดพันธุ์ (ศศิประภา, 2551; Matthews-Berry, 2010), และหัวพันธุ์ เชื้อชนิดนี้เป็นสาเหตุโรคที่สำคัญของมะเขือเทศ, พริก และมันฝรั่ง โดยก่อให้เกิดความเสียหายกับมะเขือเทศอย่างรุนแรง ทำให้ต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบเหลืองบิดม้วนและมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านใบและกิ่ง ดอกร่วง ผลที่ได้มีขนาดเล็ก (ปริเชษฐ์, 2548) มีรายงานการเข้าทำลายที่รุนแรงกับมะเขือเทศทำให้ผลผลิตลดลงสูงเกือบ 50 เปอร์เซ็นต์ (ศศิประภา, 2551) ซึ่งรุนแรงกว่าเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) มาก เชื้อชนิดนี้ทำให้มันฝรั่งเกิดอาการหัวมันม้วนเป็นกระสวยยาวคล้ายกับเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) (Owen *et al.*, 1978; Hammond *et al.*, 1989) นอกจากนี้ยังสามารถเข้าทำลายพริกเผ็ดได้ โดยทำให้เกิดอาการต้นโทรมแคระแกร็น ใบเหลืองบิดม้วนและมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ และก้านใบ (ปริเชษฐ์, 2548) แต่กลับไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติในมะเขือเปราะ (*Solanum melongena*) และมะอึก (*Solanum stramonifolium*) (ปริเชษฐ์, 2554)

เนื่องจากองค์ประกอบของไวรอยด์มีเพียงวงอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวขนาดเล็ก ที่ไม่โปรตีนห่อหุ้ม ดังนั้นการตรวจวินิจฉัยจึงทำได้ยาก และไม่สามารถใช้วิธีการทางเซรุ่มวิทยามาช่วยในการตรวจได้ ต้องพึ่งเทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology) เป็นหลักในการตรวจวินิจฉัย รวมถึงความรู้ทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) เข้ามาช่วยด้วย การใช้วิธีการ Biological indexing (หรือการใช้พืชทดสอบ) ร่วมกับเทคนิค nucleic hybridization และ RT-PCR เป็นวิธีการที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพอย่างยิ่งในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ (Hadidi *et al.*, 2003) โดยการใช้ *ndhB* ยีน (NADH dehydrogenase ND2 subunit) ทำหน้าที่เป็น internal control ในควบคุมและตรวจสอบ

คุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ เพื่อป้องกันการเกิดผลลบเทียม (false negative) ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ทำให้ผลการตรวจที่ได้มีความน่าเชื่อถือสูงมาก (Thompson *et al.*, 2003) โดย *ndhB* ยีน ที่ตรวจมีคุณสมบัติเป็น housekeeping ยีน อยู่ในคลอโรพลาสต์ ทำหน้าที่ในกระบวนการเคลื่อนย้าย electron (electron transport chain) ในการสร้างพลังงานและหายใจในระดับเซลล์ (ATP) ประกอบกับการใช้ความรู้ทางด้านชีวสารสนเทศศาสตร์เข้ามาช่วยในการเปรียบเทียบและวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่ง

เพื่อเป็นการป้องกันประเทศจากการแพร่ระบาดของโรคศัตรูร้ายแรงจากต่างประเทศ ประเทศไทยจึงได้กำหนดให้เชื้อ CLVd เป็นศัตรูพืชกักกัน ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ในลำดับที่ ๑๗๗ แต่อย่างไรก็ตาม จากการสำรวจตรวจกักกันพืชหลังการนำเข้า (post entry quarantine) ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ตรวจพบเชื้อ CLVd จำนวน 1 ตัวอย่าง ในปี 2547-48 (ปริเชษฐ์, 2548) ต่อมาในปี 2549-2551 ตรวจพบเชื้อดังกล่าวจำนวน 12 ตัวอย่าง (ปริเชษฐ์, 2554) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ CLVd มีโอกาสและความเสี่ยงที่จะปนเปื้อนและติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าได้สูง ประกอบกับปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพ่อ-แม่พันธุ์มะเขือเทศในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นในทุก ๆ ปี จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อ CLVd จะมีโอกาสเข้ามาสร้างความเสียหายกับประเทศไทยได้ นอกจากนี้จากข้อมูลการถ่ายทอดโรคและเพิ่มปริมาณในพืชหลายชนิดในวงศ์ Solanaceae เช่น มะอึก และ มะเขือเปราะ แบบไม่แสดงอาการ (latent) ทำให้เกิดปัญหาความยุ่งยากในการการตรวจวินิจฉัยและการกำจัดให้หมดสิ้น (Eradication) แสดงให้เห็นถึงศักยภาพที่เชื้อชนิดนี้จะสามารถติดเข้ามาแพร่ระบาดและก่อให้เกิดความเสียหายในประเทศไทยได้ จากความเสี่ยงดังกล่าวจึงทำให้มีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินการในการจัดการความเสี่ยงโดยการตรวจติดตามเชื้อ CLVd กับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศจากแหล่งที่มีความเสี่ยงดังกล่าว

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

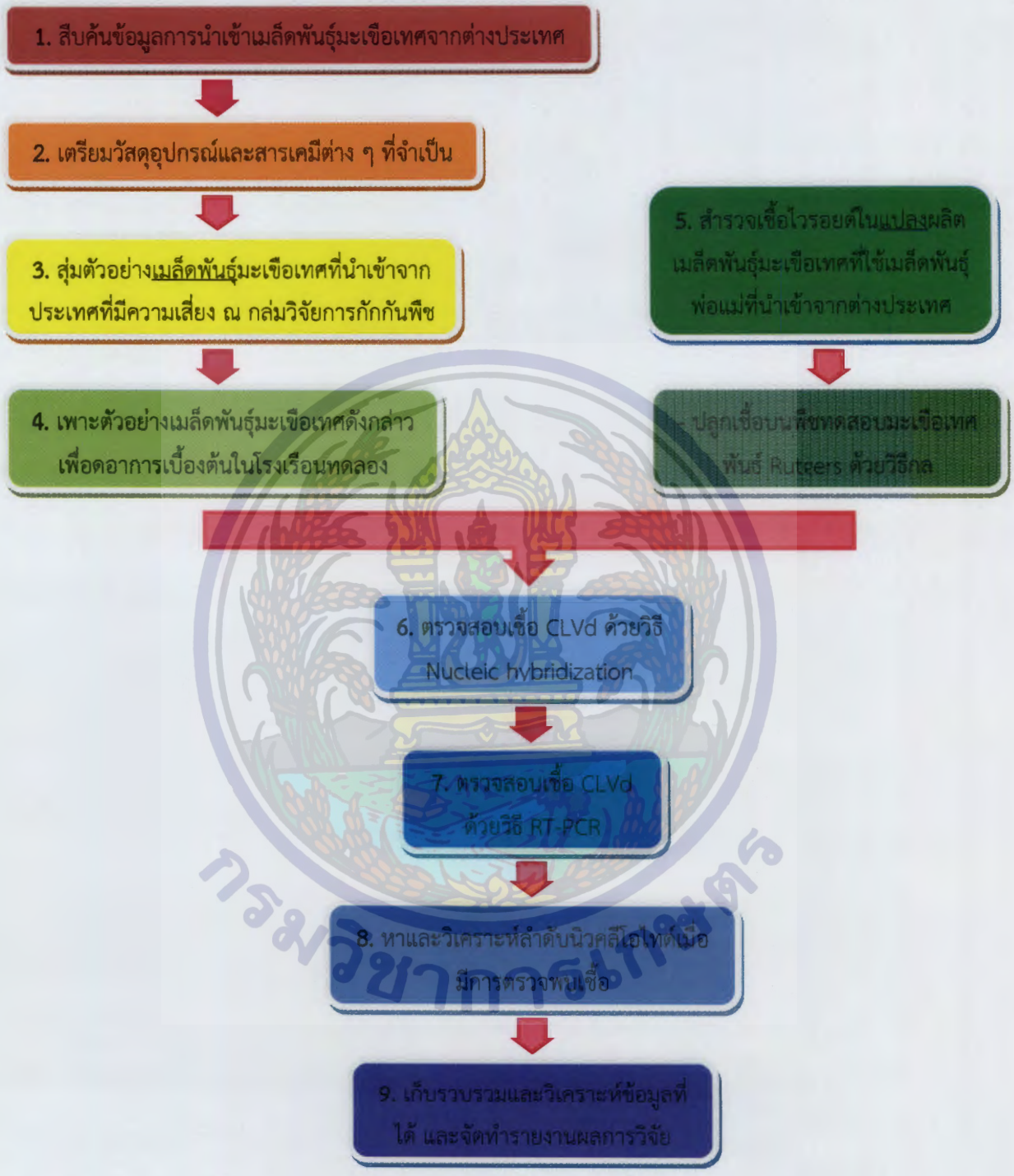
1. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
2. ตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส
4. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
7. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
8. Gel electrophoresis
9. Gel Documentation UV-transilluminator

สารเคมี

1. เอ็นไซม์ One-Step RT-PCR (SS III reverse transcriptase /PLATINUM Taq polymerase) (Invitrogen)
2. เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase
3. สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะ
4. 100 bp DNA Ladder
5. ชุด kit สกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit
6. pGEM-T easy vector (Promega)
7. competent cell (E. coli DH5α)
8. สารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal)
9. สารละลาย isopropyl-6-D thiogalactopyranoside (IPTG)
10. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการปลูกเชื้อบนพืชด้วยวิธีกล
11. DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)
12. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอน การสกัดอาร์เอ็นเอ การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา RT-PCR และ Nucleic Hybridization
13. พืชทดสอบชนิดต่าง ๆ
14. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

วิธีการ

ในการทดลองนี้จะแบ่งขั้นตอนการดำเนินงานออกเป็น 2 ส่วน คือ 1. การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* กับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (interception) และ 2. ตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* ในแปลงผลิตมะเขือเทศที่ใช้เมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (monitoring) โดยมีผังการดำเนินงานตามภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ผังการดำเนินงานทดลองตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid*

การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* กับเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (interception)

1. สืบค้นข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ

โดยตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อไวรอยด์ CLVd ได้แก่ ข้อมูลทางชีววิทยาของเชื้อ, รายชื่อประเทศที่มีรายงานการระบาดหรือพบเชื้อ และ ข้อมูลและรายชื่อประเทศที่มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมายังประเทศไทย รวมถึงประเทศคู่ค้าที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อด้วย เช่น ประเทศที่มีมาตรฐานทางสุขอนามัยพืชต่ำและประเทศที่มีสถานะภาพการปรากฏของเชื้อที่ไม่แน่นอน เพื่อกำหนดประเทศนำเข้าที่มีความเสี่ยงของโรคที่จะมีการตรวจสอบติดตามเชื้อ CLVd

2. เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ อุปกรณ์เกษตรที่จำเป็นในขั้นตอนต่าง ๆ

2.1 ขั้นตอนการเพาะเมล็ดในโรงเรือนเพื่อสังเกตอาการผิดปกติ

เตรียมโรงเรือนมุ้งขนาด 4 X 6 เมตร พร้อมอุปกรณ์เกษตรต่าง ๆ และเตรียมพืชทดสอบ 2 ชนิด คือ มะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และ มะอีก พร้อมทั้งฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 9.0 เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในเบื้องต้น โดยบัฟเฟอร์มีกรรมวิธีในการเตรียมดังนี้

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลาย 2 ชนิดที่เป็นส่วนประกอบสำคัญ คือ

a. 0.2 M $NaH_2PO_4.H_2O$ (molecular weight = 27.6 กรัม)

b. 0.2 M $Na_2HPO_4.12H_2O$ (molecular weight = 71.7 กรัม)

ในการเตรียม Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำโดย

1. เตรียมสารละลาย a. ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร $NaH_2PO_4.H_2O$ ปริมาตร 0.0276 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5.0 มิลลิลิตร

2. จากนั้นเตรียมสารละลาย b. ปริมาตร 150.0 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร $Na_2HPO_4.12H_2O$ ปริมาตร 2.151 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 150.0 มิลลิลิตร

3. ตวงสารละลาย b. ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตรใส่บีกเกอร์ จากนั้นเติมสารละลาย a. ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 9.0 โดยการใช้สารละลาย a. และ b. ที่เหลือ (ใช้สารละลาย a.ปรับ pH ให้ลดลง และสารละลาย b.ปรับ pH ให้เพิ่มขึ้น)

4. ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

2.2 ขั้นตอนในการสกัดอาร์เอ็นเอ CTAB (Scottish Agricultural Science Agency)

เตรียมสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นในขั้นตอนการเตรียม CTAB buffer มีดังนี้

1. สารละลาย CTAB extraction buffer (ปริมาตร 1,000 ml)

CTAB (Cetyltrimethylamonium Bromide)	20 g
1 M Tris-HCl pH 8.0 (จาก stock)	100 ml
0.5 M EDTA pH 8.0 (ethylenediamine tetraacetic acid) (จาก stock)	40 ml
NaCl	81.8 g

ละลายสารทั้ง 4 ชนิดเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเก็บเป็น stock buffer โดยก่อนใช้งาน ให้แบ่ง (aliquot) จาก stock CTAB buffer ในปริมาณที่ต้องการใช้ จากนั้นเติมสาร Na_2SO_3 และ PVP-40 โดยมีอัตราดังนี้

Na_2SO_3	1 % ของปริมาตร stock CTAB buffer ที่จะใช้งาน
PVP-40	2 % ของปริมาตร stock CTAB buffer ที่จะใช้งาน

2. สารละลาย TE Buffer + 1% SDS (ปริมาตร 500 ml) (โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย ดังนี้ 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0 และ 1% SDS) มีองค์ประกอบดังนี้

1 M Tris-HCl pH 8.0 (จาก stock)	5 ml
0.5 M EDTA pH 8.0 (จาก stock)	1 ml

เติมสารทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน ผสมและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นเติม SDS ลงไปปริมาณ 5 กรัม

3. สารละลาย chloroform: isoamyl alcohol (24:1) (ปริมาตร 1,000 ml) มีองค์ประกอบดังนี้

Chloroform ($CHCl_3$)	960 ml
Isoamyl alcohol ($(CH_3)_2CHCH_2CH_2OH$)	40 ml

ผสมสารทั้ง 2 ชนิดเข้าด้วยกัน (เตรียมใน fume hood) และเก็บไว้ในขวดสีชาหรือทึบแสงและมีฝาปิดสนิท

4. สารละลาย 5 M NaCl (ปริมาตร 500 ml) มีองค์ประกอบดังนี้

NaCl (MW = 58.44)	146.1 กรัม

ละลายน้ำกลั่นและปรับปริมาตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

5. Ice-cold Isopropanol ($(CH_3)_2CHOH$)

เติม Isopropanol ลงในขวดฝาเกลียวที่ปิดสนิท นำไปเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

6. สารละลาย 1 M Tris-HCl pH 8.0 (เตรียมเป็น stock buffer) (ปริมาตร 200 ml) มีองค์ประกอบดังนี้

Tris-HCl (MW = 121.14) 24.288 กรัม

ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml ปรับ pH ด้วยกรด HCl ให้ได้ 8.0 และปรับปริมาตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

7. สารละลาย 0.5 M EDTA pH 8.0 (เตรียมเป็น stock buffer) (ปริมาตร 200 ml) มีองค์ประกอบดังนี้

EDTA (MW = 292.24) 14.612 กรัม

ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยเติม NaOH (ในรูปเกล็ด) จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2.3 ขั้นตอนในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization

เตรียมสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นในขั้นตอนการทำ Nucleic Hybridization ตามคู่มือผลิตภัณฑ์ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)

2.4 ขั้นตอนในการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

เตรียมสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นในขั้นตอนการทำ RT-PCR รวมถึงไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบไวรอยด์และ internal control

3. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากประเทศที่มีความเสี่ยง ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

สุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากแหล่งประเทศที่มีรายงานการระบาดหรือตรวจพบเชื้อ CLVd นอกจากนี้ยังสุ่มตรวจในกลุ่มประเทศที่มีความเสี่ยงในด้านมาตรฐานสุขอนามัยและประเทศที่มีสถานะภาพการปรากฏของเชื้อที่ไม่แน่นอนด้วย

4. เพาะตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวเพื่อดูอาการเบื้องต้นในโรงเรือนทดลอง

เพาะเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าที่สุ่มจากกลุ่มวิจัยการกักกันพืช ในถาดเพาะในโรงเรือนมุ้งที่มิดชิด ปริมาณ 100 – 200 เมล็ดต่อ consignment (ขึ้นกับปริมาณที่สุ่มได้) เป็นระยะเวลา 1 จนถึง 6 สัปดาห์ เพื่อสังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้น และเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ CLVd ให้มากพอและง่ายต่อการตรวจสอบ โดยจะตรวจหาลักษณะอาการที่จำเพาะของเชื้อไวรอยด์ที่จะปรากฏบนมะเขือเทศ ดังนี้ อาการลำต้นแคระแกร็น ใบหดลดรูป ก้านใบและยอดหดสั้นอย่างรุนแรง ใบบิดม้วนเสียรูปทรง ยอดใหม่มีขนาดเล็กผิดปกติ มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ กิ่ง ก้าน และลำต้น

หากตรวจพบลักษณะอาการผิดปกติดังกล่าว จะนำต้นมะเขือเทศดังกล่าวไปสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Nucleic hybridization และ RT-PCR ต่อไป

ตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* ในแปลงผลิตมะเขือเทศที่ใช้เมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ (monitoring)

5. สำรวจเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

สำรวจเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าเมล็ดพันธุ์พ่อแม่เพื่อผลิตเป็นเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศในพื้นที่จังหวัดสกลนคร ขอนแก่น อุดรธานี มุกดาหาร กาฬสินธุ์ และมหาสารคาม โดยเก็บตัวอย่างมะเขือเทศที่แสดงอาการโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไวรอยด์ คือมีลักษณะอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ยอดแตกเป็นพุ่ม ก้านใบ ใบหดลดรูป ย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ ก้านใบ กิ่ง และลำต้น

จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวปลูกถ่ายเชื้อบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers (*Solanum lycopersicum*, Rutgers) และมะอึก (*Solanum stramonifolium*) ด้วยวิธีกล โดยการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 9.0 บดตัวอย่างพืช จากนั้นโรยผง carborundum ลงบนใบพืชทดสอบและทาใบพืชทดสอบด้วยน้ำคั้นจากพืชตัวอย่าง เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค สังเกตและจดบันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏ โดยอาการของโรคจะแสดงในระยะเวลาตั้งแต่ 2 อาทิตย์ ถึง 1 เดือน หลังจากปลูกถ่ายเชื้อแล้ว

6. ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Columnea latent viroid* ในขั้นละเอียดด้วยวิธีการ Nucleic hybridization

6.1 การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการ CTAB (Jeffries and Tina, n.d.)

หลังจากการเพาะเมล็ดพันธุ์ในถาดเพาะ นำต้นพืชที่แสดงอาการผิดปกติมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการ CTAB โดยการบดใบพืช 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40 เติมก่อนใช้งาน) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย) และ isopropanol แช่เย็น ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (1 เท่าของปริมาตรสารละลาย) ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ

isopropanol แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ตากตะกอนนิวคลีอิกให้แห้งสนิทและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาการปนเปื้อนเชื้อ CLVd

6.2 การผลิต cDNA probe ที่จำเพาะต่อเชื้อ CLVd

6.2.1 นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ของเชื้อ CLVd ไปเพิ่มปริมาณให้มากพอด้วยเทคนิค PCR และนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด agarose gel (QIAquick Gel Extraction Kit) (QIAGEN) เพื่อเตรียมสังเคราะห์ cDNA probe เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization ต่อไป

6.2.2 สกัด DNA ของไวรอยด์ออกจาก agarose เจลด้วยวิธีการ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) มีวิธีการดังนี้

6.2.2.1 ตัด agarose ในส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการ จากนั้นเติมสารละลาย QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์

6.2.2.2 เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจัดชุด column โดยนำ QIAquick spin column วางบน collection tube ดูดสารละลายผสมใส่ใน ชุด column โดยดูดสารละลายปริมาตรไม่เกิน 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งน้ำใสในหลอด collection tube

6.2.2.3 ล้าง QIAquick spin column ด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้าง QIAquick spin column อีกครั้งด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

6.2.2.4 จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย EB buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบขนาดและปริมาณ cDNA ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis หากได้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ จะต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ซ้ำอีกครั้งจนได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียว

6.2.3 สังเคราะห์ cDNA probe ด้วย DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche) โดยมีขั้นตอนการสังเคราะห์ดังนี้

6.2.3.1 นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ความเข้มข้นประมาณ 10 นาโนกรัม – 3 ไมโครกรัม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 15 ไมโครลิตร เติมลงในหลอด micro centrifuge

6.2.3.2 นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที และแช่น้ำแข็งทันที นาน 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ จากนั้นเติมสารละลาย DIG High Prime ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน spin down นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

6.2.3.3 จากนั้นเติมสารละลาย 0.2 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ซึ่งในขั้นนี้จะได้ cDNA probe ที่ถูกติดฉลากด้วย DIG (digoxigenin) เรียบร้อยแล้ว

6.3 การตรวจสอบความเข้มข้นและประสิทธิภาพของ cDNA probe ที่ผลิตได้

6.3.1 เตรียม series dilution ของ cDNA probe ที่เตรียมได้ และ DNA control ตามตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 1 การเตรียม series dilution ของ probe และ DNA control เพื่อตรวจสอบหาความเข้มข้นของ probe

Tube	DNA control (µl)	From tube	DNA Dilution Buffer (µl)	Dilution	Final Concentration
1	2	Original	198	1:100	10 pg/µl
2	15	1	35	1:3.3	3 pg/µl
3	5	2	45	1:10	1 pg/µl
4	5	2	45	1:10	0.3 pg/µl
5	5	3	45	1:10	0.1 pg/µl
6	5	4	45	1:10	0.03 pg/µl
7	5	5	45	1:10	0.01 pg/µl
8	0	6	50	-	0 pg/µl

6.3.2 เตรียมสารละลาย cDNA probe ที่ผลิตได้ให้มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} และ 10^{-8} เท่า (10 fold dilution) โดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย

6.3.3 ตัดแผ่น nylon membrane ให้มีขนาด 9 X 3 เซนติเมตร หยดสารละลาย cDNA probe และ DNA control ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ลงบนแผ่น nylon membrane หยดละ 1 ไมโครลิตร ตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผังการหยดสารละลาย cDNA probe และ DNA control ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

DNA control →	10 pg/µl	3 pg/µl	1 pg/µl	0.3 pg/µl	0.1 pg/µl	0.03 pg/µl	0.01 pg/µl	0 pg/µl
cDNA probe →	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}

6.3.4 นำแผ่น nylon membrane ไปวางบน UV-transilluminator โดยหันด้านที่หยด DNA เข้ากับแสง UV เพื่อตรึง DNA ให้ยึดติดกับแผ่น membrane จากนั้นแช่แผ่น membrane ในสารละลาย Maleic acid buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5) ที่อุณหภูมิ 15-25 องศาเซลเซียส เขย่า นาน 2 นาที และแช่ในสารละลาย Blocking solution (เจือจางสารละลาย 10 X Blocking solution ด้วยสารละลาย Maleic acid buffer) เขย่า นาน 30 นาที จากนั้นนำแผ่น membrane ไปแช่ในสารละลาย Antibody solution (ปั่นตกตะกอน Anti-Digoxigenin-AP ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเจือจางสารละลาย Anti-Digoxigenin-AP ด้วยสารละลาย Blocking solution ในอัตราส่วน 1:5,000) เขย่า นาน 30 นาที นำแผ่น membrane มาล้างในสารละลาย Washing buffer (0.1 M Maleic acid, 0.15 M NaCl, pH 7.5, 0.3% (v/v) Tween 20) เขย่า นาน 15 นาที 2 ครั้ง แช่แผ่น membrane ในสารละลาย Detection buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5) นาน 5 นาที จากนั้นแช่แผ่น membrane ในสารละลาย Color substrate solution (ผสมสารละลาย NBT/BCIP ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย Detection buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้ในที่มืดโดยไม่ต้องเขย่า ประมาณ 15 นาที – 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่แผ่น membrane ในน้ำกลั่นหรือสารละลาย TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ตรวจสอบความเข้มของจุดสีที่เกิดขึ้นเพื่อคำนวณความเข้มข้นของ cDNA probe ที่ได้ โดยเทียบกับ DNA control

6.4 การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization จาก cDNA probe ที่ผลิตได้ มีวิธีการดังนี้

6.4.1 นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ จำนวน 100-200 เมล็ดต่อ 1 รายการ มาปลูก รอจนต้นกล้าอายุได้ประมาณ 2 อาทิตย์ จึงนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ เพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization ในขั้นต่อไป

6.4.2 ตัดแผ่น nylon membrane ให้มีขนาดเหมาะสมกับจำนวนตัวอย่างที่จะตรวจสอบ หยดน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ อาร์เอ็นเอที่สกัดจากพืชที่เป็นโรคจากเชื้อ CLVd (positive control) อาร์เอ็นเอจากพืชปกติ (negative control) และอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างมะเขือเทศ ลงบนแผ่น nylon membrane หยดละ 1 ไมโครลิตร รอให้แห้ง จากนั้นหยดตามด้วยสารละลาย

Denature solution (0.125 X SSC, 0.125 M NaOH) นำแผ่น nylon membrane ไปวางบน UV-transilluminator โดยหันด้านที่หยด DNA เข้ากับแสง UV นาน 2 – 3 นาที เพื่อตรึง DNA ให้ยึดติดกับแผ่น membrane

6.4.3 อุ่นสารละลาย DIG Easy Hyb ในปริมาณที่เหมาะสมกับการใช้งาน (10 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น membrane 100 ตารางเซนติเมตร) ที่อุณหภูมิ 37 – 42 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการ Prehybridize แผ่น membrane ด้วยสารละลาย DIG Easy Hyb ที่เตรียมไว้ โดยเขย่าเบา ๆ ในภาชนะที่ปิดฝาสนิท นาน 30 นาที

6.4.4 ทำการ denature cDNA probe ที่สังเคราะห์ โดยต้ม cDNA probe ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร นาน 5 นาที นำไปแช่บนน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้นาน 5 นาที จากนั้นเติม cDNA probe ที่ผ่านการต้มแล้วลงไปยัง สารละลาย DIG Easy Hyb ที่เตรียมเอาไว้ ในปริมาณ 3.5 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น membrane 100 ตารางเซนติเมตร ผสมให้เข้ากันระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ เทสารละลาย Prehybridization solution ทิ้ง เติมสารละลาย probe/hybridization ลงไปยังแผ่น membrane บ่มเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส โดยเขย่าเบา ๆ

6.4.5 ล้างแผ่น membrane 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 2 X SSC ที่มี 0.1% SDS ผสมอยู่ ที่อุณหภูมิ 15 – 25 องศาเซลเซียส เขย่านาน 5 นาที จากนั้นล้างแผ่น membrane 2 ครั้ง ด้วยสารละลาย 0.5 X SSC ที่มี 0.1% SDS ผสม (ต้องอุ่นที่ 68 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน) ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส เขย่านาน 15 นาที

6.4.6 ล้างแผ่น membrane ในสารละลาย Washing buffer เขย่า นาน 5 นาที จากนั้นแช่แผ่น membrane ในสารละลาย Blocking solution (ปริมาณ 1 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น membrane 1 ตารางเซนติเมตร) นาน 30 นาที บ่มแผ่น membrane ในสารละลาย Antibody solution (ปริมาณ 1 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น membrane 1 ตารางเซนติเมตร) นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย Washing buffer (ปริมาณ 1 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น membrane 1 ตารางเซนติเมตร) 2 ครั้ง นาน 15 นาที จากนั้นแช่แผ่น membrane ในสารละลาย Detection buffer (ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร / พื้นที่แผ่น membrane 1 ตารางเซนติเมตร) นาน 5 นาที และบ่มแผ่น membrane ในสารละลาย Color substrate solution (เตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้งาน) ทิ้งไว้ในที่มืดบนพื้นราบโดยไม่ต้องเขย่า ประมาณ 16 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยแช่น้ำกลั่นหรือสารละลาย TE buffer ตรวจสอบความเข้มของจุดสีที่เกิดขึ้น โดยตัวอย่างที่เกิดจุดน้ำเงินม่วงเข้มปรากฏแสดงผลการตรวจพบเชื้อไวรอยด์ ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่เกิดจุดสีแสดงว่าไม่พบเชื้อไวรอยด์

7. ตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อ *Columnea latent viroid* ในขั้นละเอียดด้วยวิธีการ RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการ CTAB (ตามหัวข้อ 6.1) มาตรวจสอบหาการปนเปื้อนของเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR (one-step)

โดยการใช้ ไพรเมอร์ PC2 (ปริเชษฐ์ และคณะ, 2548) ซึ่งเป็น universal ไพรเมอร์ ที่ถูกออกแบบให้สามารถตรวจสอบ ไวรอยด์ในสกุล *Posipiviorid* ได้ 7 ชนิด คือ *Columnea latent viroid* (CLVd), *Mexican papita viroid* (MPVd), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd) และ *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) รวมถึงใช้ไพรเมอร์ CLVd (ปริเชษฐ์, 2548) ซึ่งมีความจำเพาะกับเชื้อ CLVd ในการตรวจติดตามเชื้อ CLVd และไพรเมอร์ NAD (Thompson *et al.*, 2003) ที่ใช้ในการตรวจหา *NdhB* gene ของพืช ซึ่งใช้เป็น internal control ในการควบคุมคุณภาพของวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอในงานทดลองนี้ด้วย โดยไพรเมอร์ทั้งหมดมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

ไพรเมอร์ PC2

cPC2: TGT-TTC-WRC-DGG-GAT-TAC-TCC-TG	23 เบส
hPC2: GGG-TTT-TCA-CCC-TTC-CTT-TC	20 เบส

หมายเหตุ: W = A หรือ T, R = A หรือ G, D = A หรือ G หรือ T

ไพรเมอร์ CLVd

cCLVd: GGG-GCT-CCT-GAG-ACC-GCT-C	19 เบส
hCLVd: GGG-GCA-ACT-CAG-ACC-GAG-CG	20 เบส

ไพรเมอร์ NAD

Nad2.1a: GGA-CTC-CTG-ACG-TAT-ACG-AAG-GAT-C	25 เบส
Nad2.2b: AGC-AAT-GAG-ATT-CCC-CAA-TAT-CAT	24 เบส

7.1 ขั้นตอนของปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

2X one-step buffer	10.0 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	4.5 ไมโครลิตร
2 μM ไพรเมอร์ สาย c	2.0 ไมโครลิตร
2 μM ไพรเมอร์ สาย h	2.0 ไมโครลิตร
Superscript RT/Platinum Taq polymerase	0.5 ไมโครลิตร
อาร์เอ็นเอตัวอย่าง	1.0 ไมโครลิตร
รวม	20.0 ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

สำหรับไพรเมอร์ PC-2 และ NAD

ขั้นที่ 1	48 องศาเซลเซียส	นาน 50 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 3	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 4	56 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 5	72 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
	โดยในขั้นที่ 3 ถึง 5 จะซ้ำอีก 34 รอบ		
ขั้นที่ 6	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 7	20 องศาเซลเซียส	นาน 15 นาที	1 รอบ

สำหรับไพรเมอร์ CLVd

ขั้นที่ 1	48 องศาเซลเซียส	นาน 50 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 3	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 4	60 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 5	72 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
	โดยในขั้นที่ 3 ถึง 5 จะซ้ำอีก 34 รอบ		
ขั้นที่ 6	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 7	20 องศาเซลเซียส	นาน 15 นาที	1 รอบ

7.2 ตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ด้วยวิธีการอีเล็คโตรโฟริซิสโดยการใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ NAD (internal control) จะมีขนาด 188 base pair และจากไพรเมอร์ PC-2 และ CLVd จะมีขนาดประมาณตั้งแต่ 350 - 370 base pair

8. หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ

โดยการนำ RT-PCR product ที่ได้จากในหัวข้อที่ 7 เชื่อมต่อเข้ากับ pGEM-T easy vector และถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell (DH5α) แล้วนำไปหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันผลการตรวจในขั้นสุดท้าย

8.1 ทำการโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้ เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรอยด์ โดยการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega) จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์

แบคทีเรีย และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ต่อไป ซึ่งวิธีการมีดังต่อไปนี้

8.1.1 เตรียมผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้ให้บริสุทธิ์ โดยการนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ โดยนำผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR มาแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยวิธีการอีเล็คโตรโฟริซิส ด้วยการใช้ 2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์ คือมีขนาดประมาณ 350 - 400 คู่เบส ใส่หลอด centrifuge tube และชั่งน้ำหนักของเจล โดยจะต้องไม่เกิน 400 มิลลิกรัม

8.1.2 สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ตามหัวข้อ 6.2.2 จากนั้นนำมาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอีเล็คโตรโฟริซิส (ตามหัวข้อ 8.1.1) ว่าได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียวขนาดตรงกับที่ต้องการหรือไม่ หากยังมีแถบดีเอ็นเออื่นปน ก็ให้ทำการตัดเจลเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ต้องการอีกครั้งและนำไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) อีก จนกระทั่งได้แถบดีเอ็นเอที่ต้องการแถบเดียว

8.1.3 เชื่อมต่อ cDNA ของเชื้อไวรอยด์ (ผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR) เข้ากับพลาสมิดพาหะ โดยเชื่อมต่อ cDNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วกับพลาสมิด pGEM-T Easy (Promega) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

T4 DNA Ligase 2X buffer	10.0 ไมโครลิตร
PGEM-T easy vector (50 ng)	1.0 ไมโครลิตร
PCR product	8.0 ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (3 unit/μl)	1.0 ไมโครลิตร
รวม	20.0 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลที่ได้ของปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้คือ พลาสมิดลูกผสม ที่มีชิ้นผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่เราคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อไวรอยด์เชื่อมต่อเข้าไปอยู่

8.1.4 นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ DH 5α ใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch *et al.*, 2001) โดยเติมสารละลายพลาสมิดลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านที่ทำให้พร้อมรับพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ E. *coli* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ จากนั้นแช่หลอดทดลองในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และรีบนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทอาหาร LB เดิมทิ้งและเติมอาหารเหลว LB ใหม่ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงไป ละลายตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย ทำการ spread ผิวหน้าอาหารแข็ง LB agar ที่มีแอมพิซิลิน

ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย isopropyl-6-D thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง จากนั้นนำสารละลายของเชื้อแบคทีเรีย spread บนอาหารแข็ง LB agar ดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือก colony ของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วน cDNA ของเชื้อไวรอยด์ โดยเลือกเฉพาะโคโลนีขนาดใหญ่สีขาว และอยู่ห่างจากโคโลนีอื่น ๆ โดยไม่เลือกโคโลนีที่มีสีฟ้าหรือน้ำเงิน หรือโคโลนีสีขาวขนาดเล็กที่อยู่รอบ ๆ โคโลนีขนาดใหญ่ หรือโคโลนีที่อยู่ชิดกันเป็นกระจุก หากเป็นไปได้ควรเลือกโคโลนีที่อยู่บริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อและเลี่ยงการเลือกโคโลนีที่อยู่บริเวณขอบจาน

8.1.5 สกัดพลาสมิดลูกผสม ใช้วิธีการ Alkaline lysis (Sambrook and Russell, 2001) โดยเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่มีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีการเติมแอมพิซิลิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารเหลวออก เติมสารละลาย Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture จากนั้นเติมสารละลาย Solution II (0.2 M NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200ไมโครลิตร ที่เตรียมใหม่ก่อนการใช้งาน ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติมสารละลาย Solution III (3 M potassium acetate, 0.2 M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่บนน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายและตากตะกอนพลาสมิดให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร

8.1.6 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะ โดยเทคนิค PCR ทำโดยการตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอไวรอยด์ ด้วยไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบไวรอยด์ในขั้นต้น คือ PC-2 หรือ CLVd ขึ้นกับผลการตรวจสอบในขั้นต้น โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับไวรอยด์ดังกล่าวจะไปเพิ่มปริมาณเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอของไวรอยด์ และตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอีเล็คโตรโฟริซิส ทำให้สามารถตรวจสอบได้ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอไวรอยด์ขนาดเดิมที่เราต้องการอยู่หรือไม่ ซึ่งวิธีการมีดังนี้

การตรวจด้วยเทคนิค PCR มีองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ต่อ 1 reaction ดังนี้

dd H_2O	10.9 µl
10X PCR buffer	2.0 µl
25 mM $MgCl_2$	1.6 µl
10 mM dNTPs	0.5 µl
2 µM Primer +	2.0 µl
2 µM Primer -	2.0 µl
Taq polymerase	0.5 µl
Total volume	19.0 µl
ตัวอย่างพลาสมิดลูกผสม	0.5 µl
Total volume	20.0 µl

หลังจากที่ผสมสารต่าง ๆ ด้านบนลงในหลอด PCR tube เรียบร้อยให้นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส	นาน 40 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 3	56-62 องศาเซลเซียส	นาน 40 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 4	72 องศาเซลเซียส	นาน 40 วินาที	1 รอบ
	ซ้ำ Step ที่ 2 - 4 อีก 34 รอบ		
ขั้นที่ 5	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6	20 องศาเซลเซียส	นาน 15 นาที	1 รอบ

จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ไปตรวจสอบขนาด DNA ด้วยเทคนิคเจลอีเล็คโตรโฟริซิส โดยใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที นำโคลนของพลาสมิดลูกผสมที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 300 - 400 คู่เบสไปวิเคราะห์หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

8.2 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ หลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะและได้โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามที่ต้องการแล้ว นำโคลนดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยเครื่อง Automated DNA sequencer แล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

8.2.1 วิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยอาศัยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ทั้งหมดในฐานข้อมูลของ GenBank ซึ่งผลที่ได้จะได้ข้อมูลว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เราสงสัยจะมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์หรือไม่ และตรงกับชนิดพันธุ์ใด โดยการจำแนกชนิดเชื้อไวรอยด์จะทราบจากการเปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งตัวของเชื้อ (whole genome) ว่ามีความคล้ายหรือความเหมือนกัน (identity) มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หรือไม่ หากค่าความเหมือนอยู่ในระดับตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป จะถือว่าเป็นไวรอยด์ชนิดเดียวกัน

ปกติแล้วโปรแกรม Blastn จะมีค่าที่ใช้พิจารณาความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ข้อมูลของโปรแกรม 3 ค่า ได้แก่

1. ค่า % identity เป็นค่าบอกระดับความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับเชื้อไวรอยด์จะอยู่ที่ระดับตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจึงจะถือว่าเป็นเชื้อไวรอยด์ชนิดเดียวกัน หากต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ลงมา จะถือว่าเป็นไวรอยด์ชนิดพันธุ์ใหม่

2. ค่า score เป็นค่าที่เกิดจากการคำนวณค่าเมทริกโดยการเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เราสนใจกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูลแต่ละตัว (pairwise alignment) โดยโปรแกรม Blastn ซึ่งค่าจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเหมือนและความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบ โดยปกติแล้วค่า score จะต้องมีค่ามากกว่า 200 bits จึงจะถือว่ามีความน่าเชื่อถือ

3. ค่า expect value เป็นค่าที่ได้จากการค้นและเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank โดยที่ค่า expect value จะเป็นค่าที่บอกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับสิ่งที่เปรียบเทียบมากน้อยแค่ไหน โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ และหากมีค่าเป็นศูนย์หมายความว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน

8.2.2 วิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อไวรอยด์ที่ได้ โดยอาศัยโปรแกรม mfold RNA-Folding-Form (http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form) เพื่อให้โปรแกรมสร้างโครงสร้างสองมิติที่เป็นไปได้ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งโครงสร้างสองมิติของไวรอยด์เป็นคุณลักษณะที่สำคัญอย่างหนึ่งของเชื้อในกลุ่มนี้ ทำให้สามารถช่วยในการยืนยันผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เป็นอย่างดี

8.2.3 วิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ที่ได้ โดยอาศัยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW) ในการทำ multiple sequence alignment และสร้าง phylogenetic tree ของกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เราศึกษาว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไร และสามารถจัดจำแนกกลุ่มออกมาได้ในลักษณะไหน เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อไวรอยด์ที่ตรวจสอบได้มีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรอยด์สายพันธุ์เดียวกัน isolate อื่น ๆ ที่มีรายงานอย่างไร

โดยในขั้นตอนการ alignment ได้กำหนดค่า parameter ให้ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ดังนี้ ที่ pairwise alignment กำหนดให้ค่า gap opening penalty เท่ากับ 10, gap extension penalty เท่ากับ 0.1 ส่วน multiple sequence alignment กำหนดให้ค่า gap opening penalty เท่ากับ 10, gap extension penalty เท่ากับ 0.2, DNA weight matrix เลือกเป็น IUB และ transition weight เท่ากับ 0.8

ในการสร้าง phylogenetic tree เลือกใช้วิธีการ Neighbor joining method เนื่องจากเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับการศึกษาความสัมพันธ์ในกลุ่มประชากรระดับชนิดพันธุ์เดียวกัน และไม่ต้องการทราบสายการวิวัฒนาการ บรรพบุรุษร่วม และ molecular clock

9. เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้ รายงานผลการตรวจพบเชื้อไวรอยด์ต่อกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และจัดทำรายงานผลการวิจัย

โดยรายงานผลการตรวจพบ (หรือไม่พบ) เชื้อไวรอยด์ต่อกลุ่มวิจัยการกักกันพืช และเก็บรวบรวมข้อมูลที่ได้ นำไปวิเคราะห์ผลเพื่อประเมินความเสี่ยงของเชื้อไวรอยด์ที่ตรวจพบ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม 2553 ถึงกันยายน 2555 รวม 2 ปี

สถานที่วิจัย :
1. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูลการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากต่างประเทศ

ผลการสืบค้นข้อมูลมีดังนี้

1.1 ข้อมูลทางชีววิทยาของเชื้อ CLVd: ก่อให้เกิดโรคที่รุนแรงใน มะเขือเทศ, พริก และมันฝรั่ง โดยทำให้เกิดอาการต้นแคระแกร็น ใบเหลืองบิดม้วนและมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านใบ และกิ่ง ผลมีขนาดเล็ก เมล็ดลีบหรือไม่สร้างเมล็ด ในมะเขือเทศ ในขณะที่ทำให้พริกเกิดอาการต้นโทรม ใบเหลืองบิดม้วนและมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านใบ โดยที่จะทำให้หัวมันฝรั่งเกิดอาการอาการบิดยาวแหลม แต่ไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติกับมะเขือเปราะและมะอึก

เชื้อชนิดนี้ถ่ายทอดโรคผ่านทางกล (บาดแผล) ได้ดีมาก สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางส่วนขยายพันธุ์ต่าง ๆ และเมล็ดพันธุ์ได้ แต่ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลการถ่ายทอดโรคผ่านทางละอองเกสร ปัจจุบันประเทศที่มีรายงานการตรวจพบหรือมีการระบาดของเชื้อทั้งสิ้น 8 ประเทศ ได้แก่ แคนาดา, เบลเยียม, เดนมาร์ก, เยอรมนี, เนเธอร์แลนด์, สหราชอาณาจักร, สหรัฐอเมริกา และ ประเทศไทย (Hadidi *et al.*, 2003; Verhoeven *et al.*, 2004; Matthews-Berry, 2010 และ ปริเชษฐ์, 2548)

ซึ่งประเทศที่มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศเข้ามายังประเทศไทยมีเพียง 5 ประเทศ คือ แคนาดา, เยอรมนี, เนเธอร์แลนด์, สหราชอาณาจักร และ สหรัฐอเมริกา

สำหรับประเทศที่มีความไม่ชัดเจนของสภานะภาพการปรากฏของเชื้อ CLVd ได้แก่ ประเทศจีน, อินเดีย และอินโดนีเซีย เนื่องจากมีแนวโน้มที่เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวมีการแพร่ระบาดในประเทศ ส่วนประเทศอื่นที่ไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ แต่มีความเสี่ยงด้านข้อกำหนดมาตรฐานสุขอนามัยพืช จึงทำให้มีความจำเป็นต้องตรวจติดตาม ได้แก่ ประเทศในแถบอเมริกากลางและใต้

ดังนั้นจึงได้ข้อมูลรายชื่อประเทศที่จะต้องมีการสุ่มตรวจติดตามการปนเปื้อนของเชื้อ CLVd ดังต่อไปนี้ ได้แก่ แคนาดา, เยอรมนี, เนเธอร์แลนด์, สหราชอาณาจักร, สหรัฐอเมริกา, จีน, อินเดีย, อินโดนีเซีย, และ ประเทศในแถบอเมริกากลางและใต้

2. เตรียมวัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ อุปกรณ์ทางการเกษตรที่จำเป็นในขั้นตอนต่าง ๆ

ได้สังเคราะห์ probe ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Columnea latent viroid* โดยวิธีการ DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche)

ได้ไพรเมอร์ PC-2 และ CLVd ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ *Columnea latent viroid* และไพรเมอร์ NAD เพื่อใช้ในการตรวจสอบยืนพืช เป็น internal control รวมถึงสารเคมีที่จำเป็นต่าง ๆ เพื่อใช้ในงานทดสอบ

3. สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศที่มีความเสี่ยง ณ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช

ได้สุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ ดังต่อไปนี้

3.1 ปีงบประมาณ 2554 จำนวน 6 ครั้ง ได้แก่

1. ประเทศจีน น้ำหนัก 0.05 Kg นำเข้าวันที่ 4 มีนาคม 2554
2. ประเทศอินเดีย น้ำหนัก 24.7 Kg นำเข้าวันที่ 24 เมษายน 2554
3. ประเทศจีน น้ำหนัก 276.8 Kg นำเข้าวันที่ 4 พฤษภาคม 2554
4. ประเทศอเมริกา เปรู ชิลี และเม็กซิโก น้ำหนัก 14.131 Kg นำเข้าวันที่ 24 พฤษภาคม 2554
5. ประเทศเนเธอร์แลนด์ น้ำหนัก 0.282 Kg นำเข้าวันที่ 6 กรกฎาคม 2554
6. ประเทศเนเธอร์แลนด์ น้ำหนัก 0.357 Kg นำเข้าวันที่ 6 กรกฎาคม 2554

3.2 ปีงบประมาณ 2555 จำนวน 10 ครั้ง ได้แก่

1. ประเทศฝรั่งเศส น้ำหนัก 0.84 Kg นำเข้าวันที่ 30 ธันวาคม 2554
2. ประเทศอินโดนีเซีย น้ำหนัก 11.768 Kg นำเข้าวันที่ 23 มกราคม 2555
3. ประเทศพม่า น้ำหนัก 4.83 Kg นำเข้าวันที่ 23 มกราคม 2555
4. ประเทศแอฟริกาใต้ น้ำหนัก 0.022 Kg นำเข้าวันที่ 23 มกราคม 2555
5. ประเทศญี่ปุ่น น้ำหนัก 7.5 Kg นำเข้าวันที่ 23 มกราคม 2555

6. ประเทศจีน น้ำหนัก 70.55 Kg นำเข้าวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2555

7. ประเทศสหรัฐอเมริกา เปรู ชิลี เม็กซิโก และอิสราเอล น้ำหนัก 9.078 Kg นำเข้าวันที่ 4 พฤษภาคม 2555

8. ประเทศสหรัฐอเมริกา เปรู ชิลี เม็กซิโก และอิสราเอล น้ำหนัก 4.322 Kg นำเข้าวันที่ 4 พฤษภาคม 2555

9. ประเทศเปรู น้ำหนัก 2.0 Kg นำเข้าวันที่ 14 พฤษภาคม 2555

10. ประเทศอินเดีย น้ำหนัก 30.3 Kg นำเข้าวันที่ 25 พฤษภาคม 2555

4. เพาะตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าวเพื่อดูอาการเบื้องต้นในโรงเรือนทดลอง

ผลการตรวจสอบตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศที่สุ่มจากกลุ่มวิจัยกักกันพืช ผลการสังเกตอาการผิดปกติเมื่อนำไปปลูกเพื่อดูอาการในโรงเรือนพบว่า ไม่มีตัวอย่างใดแสดงอาการของโรคที่จำเพาะของเชื้อไวรอยด์ มีเพียงบางตัวอย่างที่แสดงลักษณะอาการผิดใกล้เคียงกับไวรัสเท่านั้น

จากการที่ไม่พบอาการเฉพาะต้องสงสัยในการตรวจสอบดูอาการในโรงเรือน ดังนั้นจึงต้องทำการสุ่มตรวจหาเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค Nucleic hybridization และ RT-PCR ในขั้นต่อไป

5. ตรวจตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่แสดงอาการผิดปกติในขั้นละเอียดด้วยเทคนิค Nucleic hybridization และ RT-PCR

ผลการตรวจสอบตัวอย่างมะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศทั้งที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าว และที่ไม่แสดงอาการผิดปกติ ด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR พบว่าให้ผลเป็น negative ในทุกตัวอย่าง แสดงว่าไม่มีตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ใดพบการปนเปื้อนเชื้อ CLVd เลย

สำหรับในการทดลองในส่วนนี้ อาจเป็นไปได้ที่วิธีการในการตรวจติดตามการปนเปื้อนของเชื้อกับเมล็ดพันธุ์นำเข้าอาจยังไม่เหมาะสม ทั้งนี้อาจเนื่องด้วยอัตราการปนเปื้อนของเชื้อที่ต่ำ จึงทำให้ตรวจไม่พบการปนเปื้อนกับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวแต่กลับตรวจพบในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ซึ่งหากเป็นกรณีนี้จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเมล็ดพันธุ์ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบให้มีปริมาณมากขึ้น โดยอาจอยู่ระหว่าง 500-1,000 เมล็ด เพื่อเพิ่มโอกาสในการตรวจพบเชื้อ แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นกับปริมาณเมล็ดที่สามารถสุ่มตรวจได้ขึ้นกับปริมาณเมล็ดที่นำเข้าด้วย เนื่องจากส่วนใหญ่เป็นเมล็ดพ่อ-แม่พันธุ์ที่มีปริมาณน้อย จึงทำให้ไม่สามารถสุ่มปริมาณที่มากได้

6. สำรวจเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้เมล็ดพันธุ์พ่อแม่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้เมล็ดพ่อแม่พันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ และตัวอย่างมะอีก และนำมาปลูกเชื้อบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และมะอีก ด้วยวิธีกล พบว่าตัวอย่างมะเขือเทศจำนวน 7 ตัวอย่างและมะอีก 1 ตัวอย่าง แสดงผลอาการจำเพาะบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ให้อาการลำต้นแคระแกร็น ใบหดลดรูป ก้านใบและยอดหดสั้นอย่างรุนแรง ใบบิดม้วนเสียรูปทรง ยอดใหม่มีขนาดเล็กผิดปกติ มีอาการ

เซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ กิ่ง ก้าน และลำต้น ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่จำเพาะของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ (ภาพที่ 2) (ตารางที่ 3)

ภาพที่ 2 อาการผิดปกติบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers

สำหรับผลการทดสอบบนพืชทดสอบมะอีก พบว่าตัวอย่างทั้ง 8 ตัวอย่างแสดงลักษณะอาการที่แตกต่างกัน คือ ตัวอย่างมะเขือเทศจำนวน 3 ตัวอย่าง ไม่ทำให้พืชทดสอบมะอีกแสดงอาการผิดปกติอย่างใด (ภาพที่ 3) (ตารางที่ 3) ซึ่งคล้ายลักษณะอาการของเชื้อ CLVd ที่เคยมีรายงาน ในขณะที่ตัวอย่างมะเขือเทศจำนวน 4 ตัวอย่างที่เหลือ ทำให้พืชทดสอบมะอีกแสดงอาการ ใบหดลดรูป เนื้อใบย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อลำเลียงของพืชเล็กน้อย แต่ไม่มีอาการแคระแกร็น (ภาพที่ 4, 5 และ 6) (ตารางที่ 3) ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวแตกต่างจากอาการที่มีรายงานของเชื้อ CLVd

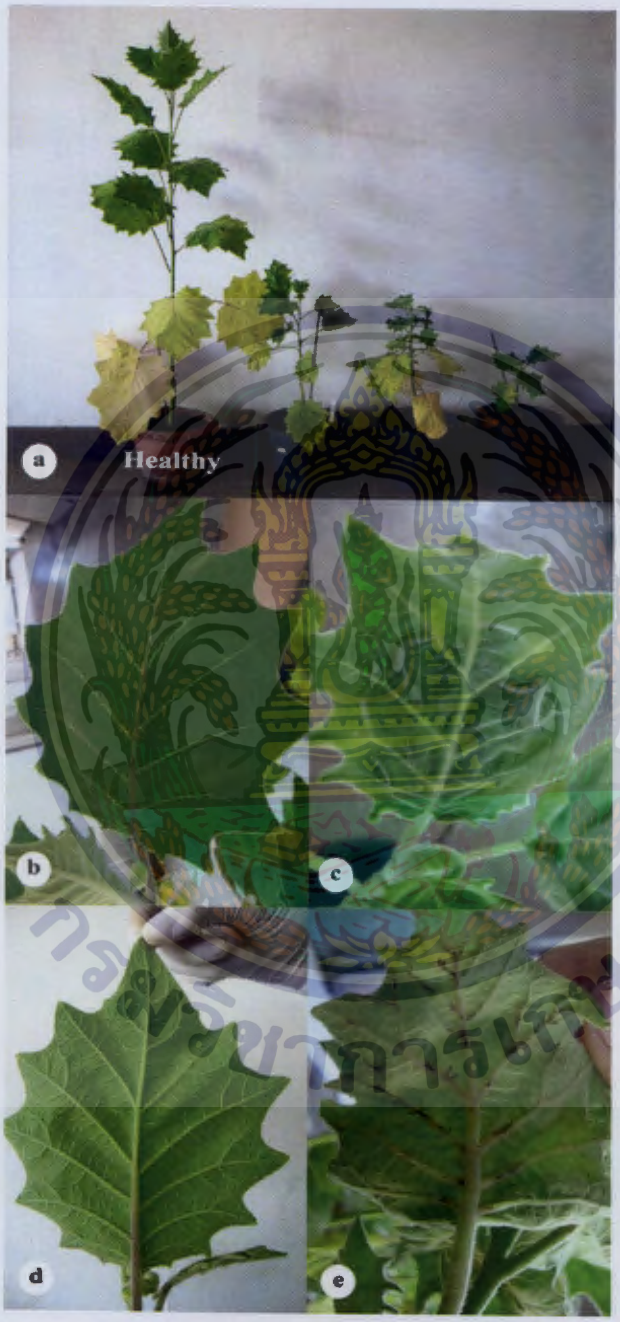
ภาพที่ 3 อาการแฝงบนพืชทดสอบมะอีก

ภาพที่ 4 อาการใบย่นหดลดรูปบนพืชทดสอบมะอึก เปรียบเทียบกับมะอึกปกติด้านขวา

ภาพที่ 5 อาการผิดปกติบนพืชทดสอบมะอึก ซึ่งแสดงอาการใบหดลดรูป เนื้อใบย่น

ภาพที่ 6 อาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ (necrosis vein) บนพืชทดสอบมะอึก

นอกจากนี้ ตัวอย่างมะอึก 1 ตัวอย่างทำให้พืชทดสอบมะอึกแสดงอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ยอดและใบหดลดรูป ใบ มีอาการด่าง เนื้อใบหดย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ลักษณะอาการผิดปกติของมะอึกที่ได้รับการปลูกเชื้อ

a) เปรียบเทียบความสูงของต้นที่เป็นโรคกับต้นปกติ

b) หลังใบของต้นปกติ

c) หลังใบของต้นที่เป็นโรค: มีอาการด่าง เนื้อใบหดย่น

d) ท้องใบของต้นปกติ

e) ท้องใบของต้นที่เป็นโรค: มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ

และใบข้างที่สร้างใหม่จะมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 8) (ตารางที่ 3) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีรายงานว่ามีเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในพืชกลุ่มมะเขือได้ และเป็นลักษณะที่แตกต่างจากเชื้อ *Columnea latent viroid* ซึ่งจะไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ บนมะอึก (latent)

ภาพที่ 8 ลักษณะอาการผิดปกติของใบข้างมะอึกที่สร้างใหม่ มีอาการเล็กแกร็นและเนื้อใบหดย่น

ตารางที่ 3 แสดงผลการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และมะอึก

ตัวอย่างที่	ชื่อ clone	อาการในมะเขือเทศ	อาการในมะอึก
1	Solanum	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลดรูป ใบบิดม้วน เสียรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ต้นแคระแกร็น ยอดและใบหดลดรูป ใบหดย่น ด่าง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ
2	Prayong-17	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลดรูป ใบบิดม้วน เสียรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ไม่แสดงอาการผิดปกติ
3	Sathap	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลดรูป ใบบิดม้วน เสียรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ไม่แสดงอาการผิดปกติ
4	Duenpen	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลดรูป ใบบิดม้วน เสียรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ไม่แสดงอาการผิดปกติ
5	Pinit	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลดรูป ใบบิดม้วน เสียรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดลดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อลำเลียงของพืชเล็กน้อย
6	Prayong-19	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลดรูป ใบบิดม้วน เสียรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดลดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อลำเลียงของพืชเล็กน้อย
7	Supattha	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลดรูป ใบบิดม้วน เสียรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดลดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อลำเลียงของพืชเล็กน้อย
8	Aurai	ต้นแคระแกร็น ก้านใบและยอดหดลดรูป ใบบิดม้วน เสียรูปทรง มีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านและลำต้น	ใบย่น หดลดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อลำเลียงของพืชเล็กน้อย

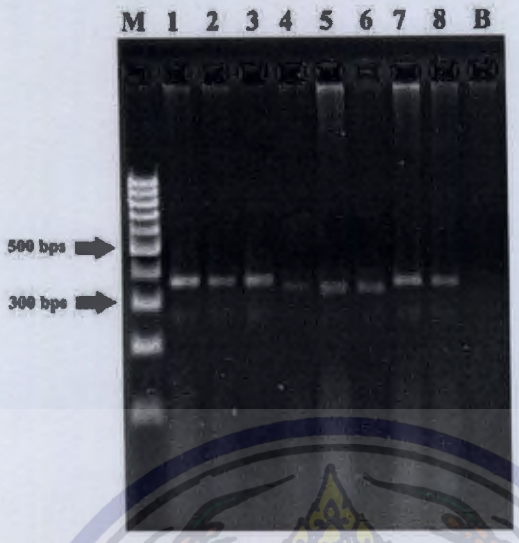
จากผลการแสดงอาการของพืชทดสอบมะอีก ทำให้คาดได้ว่าตัวอย่างทั้ง 8 ตัวอย่าง น่าจะมีเชื้อไวรอยด์มากกว่า 1 ชนิด ซึ่งจะต้องทำการพิสูจน์ในขั้นต่อไปโดยการตรวจวินิจฉัยขั้นละเอียดด้วยเทคนิค RT-PCR

7. ตรวจตัวอย่างเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในขั้นละเอียดด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการนำพืชทดสอบมะอีกไปสกัดอาร์เอ็นเอ และทดสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ (internal control) โดยตรวจติดตาม *ndhB* ยีน ด้วยการใช้ไพรเมอร์ NAD พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 เบส (ภาพที่ 9) ซึ่งตรงกับขนาดของ PCR product ของไพรเมอร์ NAD ที่มีขนาด 188 เบส แสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างทั้ง 8 ตัวอย่างมีคุณภาพที่ดีสามารถนำมาตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ได้

ภาพที่ 9 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR และ Gel electrophoresis โดยคู่ไพรเมอร์ NAD (internal control)
M = 100 bps DNA Ladder
B = buffer (blank)
1-8 = อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างมะเขือเทศและมะอีกทั้ง 8 ตัวอย่าง

จากการตรวจหาไวรอยด์ด้วยไพรเมอร์ PC-2 กับอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ พบว่าตัวอย่างพืชทั้ง 8 ตัวอย่าง ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 และ 350 เบส (ภาพที่ 10) โดยเป็นแถบขนาด 370 เบส 4 ตัวอย่าง และ 350 เบส 4 ตัวอย่าง ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์



ภาพที่ 10 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR และ Gel electrophoresis โดยคู่ไพรเมอร์ PC-2

M = 100 bps DNA Ladder

1-8 = อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างมะเขือเทศและมะอึกทั้ง 8 ตัวอย่าง

B = buffer (blank)

8. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โครงสร้างทุติยภูมิ และการจัดกลุ่มของแถบดีเอ็นเอที่ตรวจได้

หลังจากการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR และได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์แล้ว ตามปกติแล้วควรจะต้องทำการยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ก่อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ได้ขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างไปจากเดิม หรือได้ผลการทดสอบอาการบนพืชทดสอบที่แตกต่างไปจากเดิม เพื่อตรวจสอบว่าเป็นไวรอยด์ชนิดเดียวกันกับที่สงสัยหรือไม่

โดยขั้นตอนในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์นั้น จะต้องดำเนินการจากการ cloning ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณเสียก่อน จากนั้นจึงส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์และจึงทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นั้นต่อไป

8.1 หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการ cloning ชิ้นดีเอ็นเอที่สงสัยทั้ง 8 ตัวอย่าง เพื่อเพิ่มปริมาณและส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 เบส จำนวน 4 ตัวอย่าง (ภาพที่ 11-14) และขนาดประมาณ 350 เบส จำนวน 4 ตัวอย่าง (ภาพที่ 15-18)

> Solanum-4
CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAAAAGAAC
GGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGTCTTGAC
CAGTGGCGAGCGCCCTGTTCAGACAGGAGTAATCCCAGCAGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTC
TTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCG
ACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCATACCTCCTTTTTCTTCATTCTAGCTTGGTCTCC
GGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT

ภาพที่ 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์จากตัวอย่างต้นมะอึก

> Prayong-17
CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCGAAGAAAAAAGAACG
GGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGTCTTGACC
AGTGGCGAGCGCCCTGTTCAGACAGGAGTAATCCCCGCAGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCT
TCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCGA
CCGGTGGCATCACCGAGCTCGCTCAAGCCTCTACCTCCTTTTTCTCTATCTAGCTCGGTCTCCGGG
CGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAGTTGGTTCCT

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์จากตัวอย่างต้นมะเขือเทศ isolate Prayong-17

> Sathap-3
CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAAAAGAAC
GGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGTCTTGAC
CAGTGGCGAGCGCCCTGTTCAGACAGGAGTAATCCCCGCAGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTC
TTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCG
ACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCTACCTCCTTTTTCTTCATTCTAGCTTGGTCTCCG
GGCGAGGGTGTTTAGCCCGTGGAACCGCAGTTGGTTCCT

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์จากตัวอย่างต้นมะเขือเทศ isolate Sathap-3

> Duenpen-8
CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGCTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAAAAGATC
GGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAGCGGGGTCTTGAC
CAGTGGCGAGCGCCCTGTTCAGACAGGAGTAATCCCCGCAGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTC
TTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTCTTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCG
ACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCTACCTCCTTTTTCTTCATTCTAGCTTGGTCTCCG
GGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACTGCAGTTGGTTCCC

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์จากตัวอย่างต้นมะเขือเทศ isolate Duenpen-8

> Pinit-29
CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGGGAA
GCAAGCATCTCCTGTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGCACGAGC
GGGACCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCCGTTAATCGAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCGGGTT
TCCTTCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTCGGCCTTCTCGCGCACTGCTGTCCGGCTACTACCCGGTGG
ATACAACTGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCGACTTCTACCGACGCGGCCGGGAGTGAAGCTAC
CCGGGACCCGAGAGGATCT

ภาพที่ 15 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์จากตัวอย่างต้นมะเขือเทศ isolate Pinit-29

> Prayong-19
CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCCGAAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGGGAA
GCAAGCATCTCCTGTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGCACGAGC
GGGACCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGTAGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCGGGTT
TCCTTCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTCGGCCTTCTCGCGCACTGCTGTCCGGCTACTACCCGGTGG
ATACAACTGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCTACTTCTACCGACGCGGCCGGGAGTGAAGCTAC
CCGGGACCCGAGAGGATCT

ภาพที่ 16 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์จากตัวอย่างต้นมะเขือเทศ isolate Prayong-19

> Supattha-3
CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCCGTAGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGGGAA
GCAAGCATCTCCTGTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGCACGAGC
GGGACCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCAGCAGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCGGGTT
TCCTTCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTCGGCCTTCTCGCGCACTGCTGTCCGGCTACTACCCGGTGG
ATACAACTGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCGACTTCTACCGACGCGGCCGGGAGTGAAGCTAC
CCGGGACCCGAGAGGATCT

ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์จากตัวอย่างต้นมะเขือเทศ isolate Supattha-3

> Aurai-2
CCGGATTCTTCTAAGGGTGCCTGTGGTGCCTCCCCCGACGCCCGCTTAGGGAAAAAGAAAGGGGAA
GCAAGCATCTCCTGTTCAGGGATCCCCGGGGAAACCTGGACAGACCGGGCGGAGAAGCGCACGAGC
GGGACCGTCTTCTGACAGGAGTAATCCCTGTAGAAACAGGGTTTTCACCCTTCCTTTCTTCGGGTT
TCCTTCCTCAGTCGACCGGTCCGCGTCGGCCTTCTCGCGCACTACTGTCCGGCTACTACCCGGTGG
ATACAACTGACAGAGGTGCTTTTTCTTCCACCCGACTTCTACCGACGCGGCCGGGATGAAGCTACC
CGGGACCCGAGAGGATCT

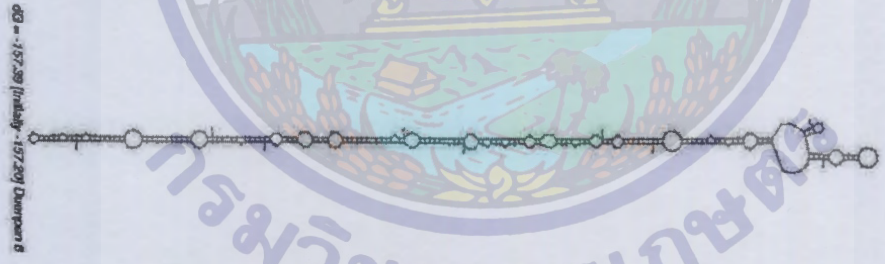
ภาพที่ 18 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์จากตัวอย่างต้นมะเขือเทศ isolate Aurai-2

จากการวิเคราะห์หาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม Blastn พบว่า แถบดีเอ็นเอขนาด 370 เบสทั้ง 4 ตัวอย่างเป็นเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และแถบดีเอ็นเอขนาด 350 เบสทั้ง 4 ตัวอย่างเป็นเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) โดยตัวอย่างที่จำแนกได้เป็นเชื้อ CLVd มีขนาดตั้งแต่ 368 – 370 เบส มีค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) อยู่ในระดับ 97-99 เปอร์เซ็นต์ มีค่า score อยู่ในช่วง 612-665 bits และมีค่า expect value อยู่ในช่วง 6e-172 ถึง 0.0 และตัวอย่างที่จำแนกได้เป็นเชื้อ PCFVd มีขนาดตั้งแต่ 348 – 349 เบส มีค่า % identity (ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์) อยู่ในระดับ 96-99 เปอร์เซ็นต์ มีค่า score อยู่ในช่วง 549-634 bits และมีค่า expect value อยู่ในช่วง 4e-153 ถึง 1e-178 ซึ่งค่าทั้งหมดที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นเชื้อไวรอยด์ CLVd และ PCFVd

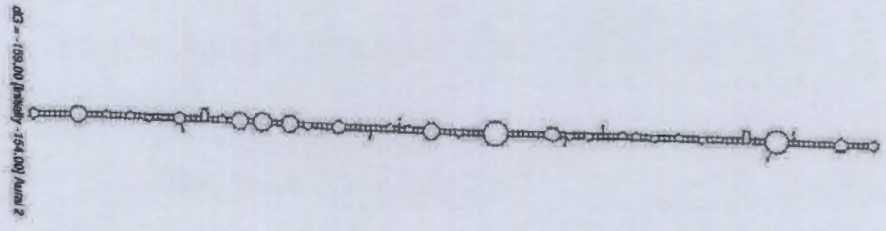
8.2 วิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ

จากการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ (โครงสร้างสองมิติ) ของอาร์เอ็นเอที่เป็นไปได้โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของโคลนทั้ง 8 มาวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิที่มีค่าพลังงาน Gibb's free energy ต่ำสุดด้วยโปรแกรม mfold version 3.1 เพื่อช่วยในการยืนยันผล พบว่าได้ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิที่มีลักษณะเป็นแท่ง (rod-like secondary structure) ที่มี hairpin loop เกิดขึ้นทั้ง 8 โคลน (ภาพที่ 19, 20 และ 21) เป็นการช่วยยืนยันผลการวิเคราะห์ว่าชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากตัวอย่างพืชทั้ง 8 ตัวอย่าง เป็นเชื้อไวรอยด์ CLVd และ PCFVd

ภาพที่ 19 โครงสร้างทุติยภูมของเชื้อ CLVd โคลน (clone Solanum-4)



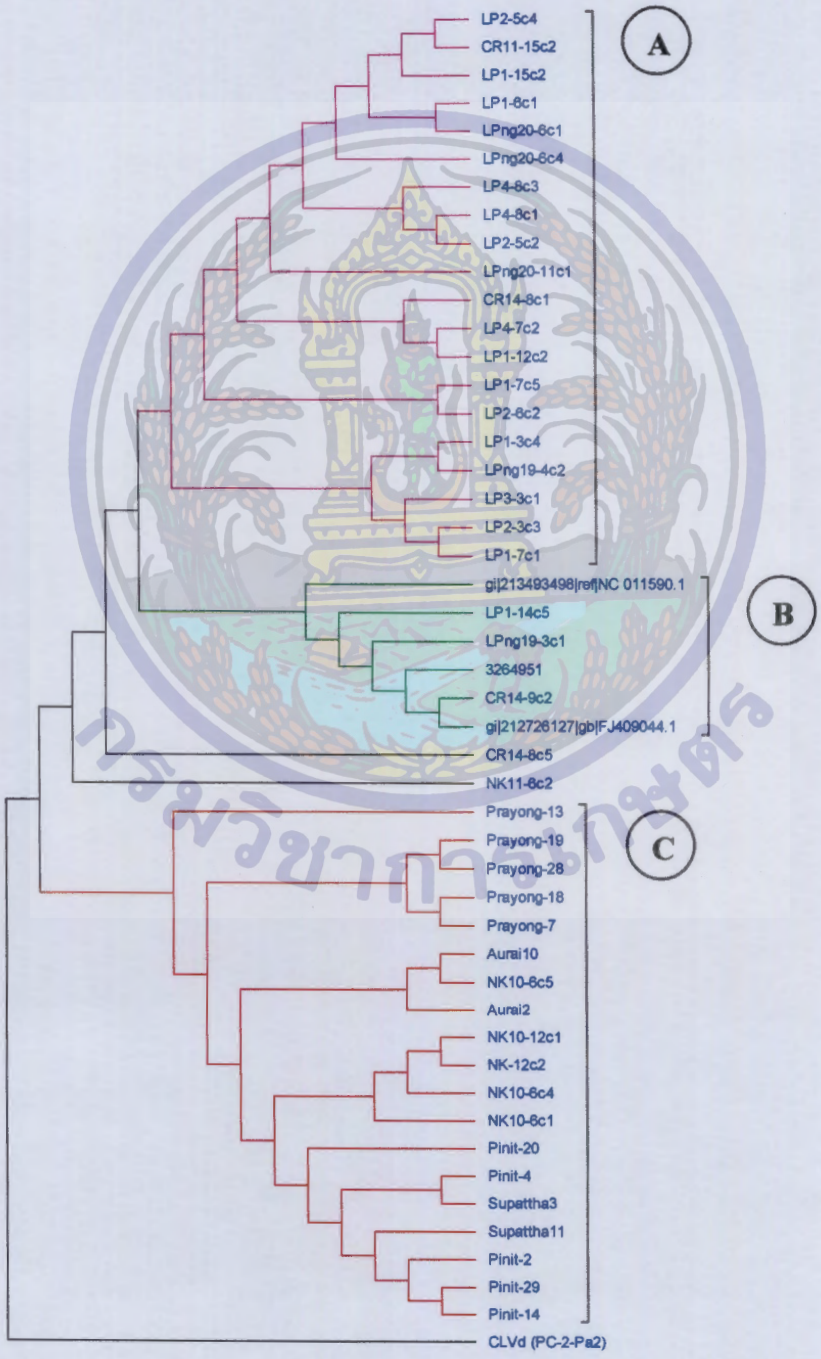
ภาพที่ 20 โครงสร้างทุติยภูมของเชื้อ CLVd โคลน (clone Duenpen 8)



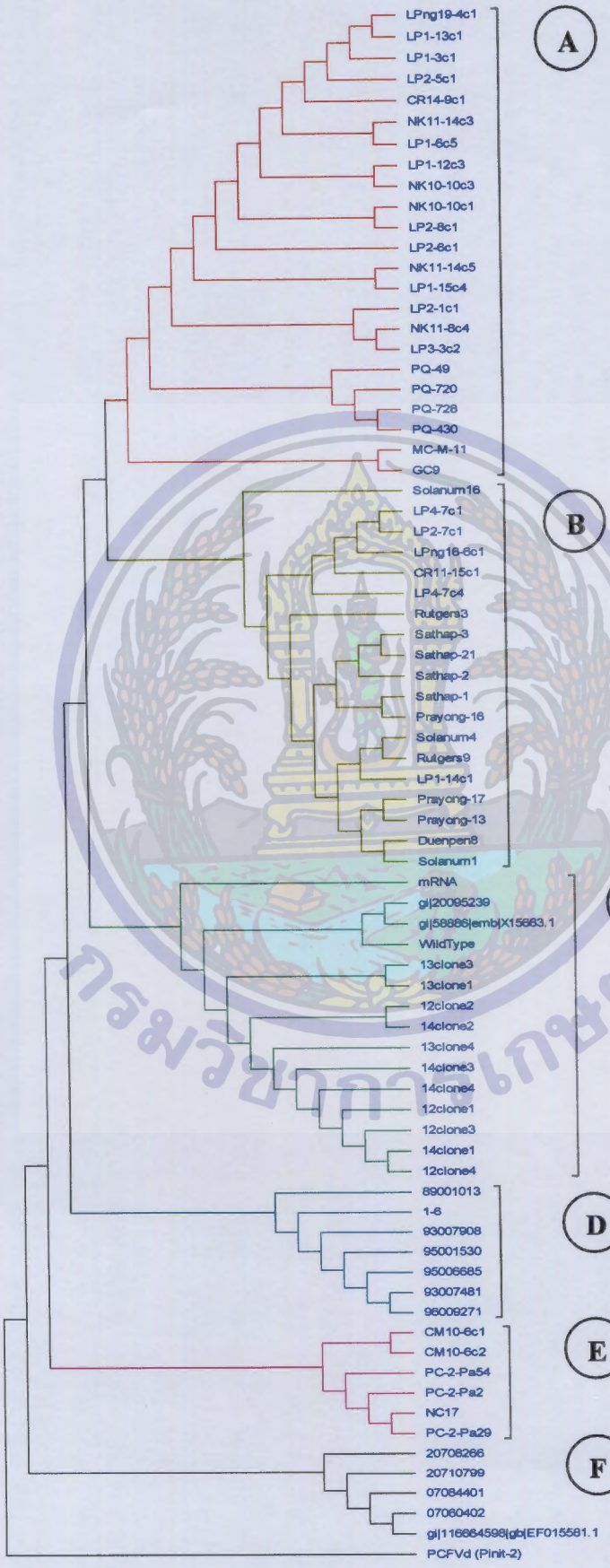
ภาพที่ 21 โครงสร้างทุติยภูมของเชื้อ PCFVd โคลน (clone Aurai-2)

8.3 จัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Phylogenetic tree)

จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด คือ *Columnea latent viroid* และ *Pepper chat fruit viroid* ที่มีรายงานทั้งหมดใน NCBI ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW) พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ PCFVd ได้เป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 22) และสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ CLVd ได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 22 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อ PCFVd ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW)



ภาพที่ 23 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อ CLVd ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW)

ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ PCFVd โดยการทำ Phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้เป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 22) ดังนี้

1. กลุ่ม A เป็นเชื้อ PCFVd ที่ตรวจพบในพื้นที่จังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทยทั้งหมด

2. กลุ่ม B เป็นเชื้อ PCFVd ที่มีรายงานการเข้าทำลายในพริกที่ประเทศเนเธอร์แลนด์ได้รายงานไว้ (Verhoeven *et al.*, 2009) และเชื้อ PCFVd ที่ตรวจพบในพื้นที่จังหวัดทางภาคเหนือของประเทศไทยร่วมด้วย

3. กลุ่ม C เป็นเชื้อ PCFVd ที่ตรวจพบในพื้นที่จังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยทั้งหมด

โดยพบว่าเชื้อ PCFVd ทั้ง 4 isolate ใหม่ จัดจำแนกอยู่กลุ่ม C ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่ตรวจพบเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยเท่านั้น

จากการค้นข้อมูล พบว่า เชื้อ PCFVd น่าจะเพิ่งเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกในช่วงปี 2553 ตามที่มีรายงานการตรวจพบครั้งแรก (Reanwarakorn *et al.*, 2011) ซึ่งจากข้อมูลการสำรวจตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าพ่อ-แม่พันธุ์จากต่างประเทศ ตั้งแต่ปี 2548 จนถึง 2551 ประเทศไทยไม่เคยมีการตรวจพบเชื้อดังกล่าวเลย

และจาก Phylogenetic tree ที่ได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ PCFVd ที่มีรายงานในประเทศไทยไม่น่าจะติดมาจากการปนเปื้อนจากการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พริกจากประเทศเนเธอร์แลนด์เป็นแหล่ง เนื่องจากเชื้อ PCFVd ที่พบในภาคเหนือส่วนใหญ่และภาคตะวันออกเฉียงเหนือทั้งหมดมิได้มีความสัมพันธ์จัดกลุ่มร่วมเดียวกัน (กลุ่ม A และ C) กับเชื้อที่มีรายงานในเนเธอร์แลนด์ (กลุ่ม B) อีกทั้งในเรื่องของความสัมพันธ์ของช่วงระยะเวลาที่ตรวจพบเชื้อระหว่างไทยและเนเธอร์แลนด์ยังมิได้แตกต่างกันมากนัก แสดงว่าเชื้อ PCFVd น่าจะติดเข้ามากับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ปนเปื้อนเชื้อจากต่างประเทศที่เป็นประเทศคู่ค้า แต่อาจจะมิได้มีวิธีการตรวจสอบตามมาตรฐานสุขอนามัยพืชที่ถูกต้องนัก แต่อย่างไรก็ดี จากผลการจัดจำแนกในกลุ่ม B พบว่ามีเชื้อ PCFVd บาง isolate ที่พบในภาคเหนืออยู่ในกลุ่มเดียวกับที่พบในพริกจากเนเธอร์แลนด์ จึงมีความเป็นไปได้อีกว่าเชื้อชนิดอาจติดเข้ากับเมล็ดพันธุ์จากประเทศเนเธอร์แลนด์ด้วยแต่เป็นในปริมาณที่น้อย

นอกจากนี้ยังทำให้ทราบว่าเชื้อ PCFVd ติดเข้ามาในประเทศไทย อาจมิได้ติดเข้ามาจากแหล่งระบาดเชื้อเพียงแหล่งเดียว แต่เกิดจากการนำเข้าเมล็ดพันธุ์อย่างน้อย 2 แหล่ง โดยอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจากแหล่งแรกเข้ามาในพื้นที่จังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือก่อน ในปีต่อมาจึงมีการปนเปื้อนของเชื้อจากแหล่งใหม่เข้ามาในพื้นที่จังหวัดภาคเหนือ ทั้งนี้เนื่องจากความสัมพันธ์ของเชื้อที่พบในภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือ จัดกลุ่มแยกกันอย่างชัดเจน

ประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ PCFVd ครั้งแรกในปี 2553 ในจังหวัดขอนแก่น และมีการตรวจพบต่อเนื่องในปี 2554-2555 ในจังหวัดขอนแก่น, หนองคาย, เชียงราย, ลำปาง และ ลำพูน

ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ CLVd โดยการทำ Phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้เป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 23) ดังนี้

1. กลุ่ม A เป็นเชื้อ CLVd ที่ตรวจพบในพื้นที่จังหวัดทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในปี 2549-2551 (ปริเชษฐ์, 2554; ศศิประภา, 2551) และภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน (จังหวัดหนองคาย) ของประเทศไทยในปี 2552-2555

2. กลุ่ม B เป็นเชื้อ CLVd ที่ตรวจพบในพื้นที่จังหวัดทางภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในปี 2552-2555

3. กลุ่ม C เป็นเชื้อ CLVd ที่ตรวจพบในไม้ประดับทั้งหมด (รวมถึงต้นลิปสติกที่มีรายงานการตรวจพบครั้งแรก) ซึ่งไม่มีการตรวจพบในประเทศไทย

4. กลุ่ม D เป็นเชื้อ CLVd ที่ตรวจพบมะเขือเทศในต่างประเทศ (มาลี และ เนเธอร์แลนด์)

5. กลุ่ม E เป็นเชื้อ CLVd ที่ตรวจพบในพื้นที่จังหวัดทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในปี 2547-2548 (ตรวจพบเชื้อครั้งแรกในประเทศไทย) (ปริเชษฐ์, 2548) และภาคเหนือของประเทศไทยในปี 2552-2555

6. กลุ่ม F เป็นเชื้อ CLVd ที่ตรวจพบมะเขือเทศในต่างประเทศ (ฝรั่งเศส, สหราชอาณาจักร และ โปรตุเกส)

โดยพบว่าเชื้อ CLVd ทั้ง 4 isolate ใหม่ จัดจำแนกอยู่กลุ่ม B ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อในพื้นที่จังหวัดทางภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในปี 2552-2555

จาก Phylogenetic tree ที่ได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อ CLVd ที่มีรายงานในประเทศไทย (กลุ่ม A, B และ E) ไม่น่าจะติดมาจากการนำเข้าไม้ประดับที่ปนเปื้อนเชื้อจากต่างประเทศ (กลุ่ม C) รวมถึงติดจากการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปนเปื้อนที่ปนเปื้อนเชื้อจากต่างประเทศในกลุ่มที่มีรายงานใน GenBank (กลุ่ม D และ F) แต่น่าจะติดเข้ามากับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ปนเปื้อนเชื้อจากต่างประเทศที่เป็นประเทศคู่ค้าอื่น แต่อาจจะมิได้มีวิธีการตรวจสอบตามมาตรฐานสุขอนามัยพืชที่ถูกต้องนัก แต่ไม่ได้ติดเข้ามาจากประเทศ ฝรั่งเศส, สหราชอาณาจักร, โปรตุเกส, มาลี และเนเธอร์แลนด์

เช่นเดียวกันกับเชื้อ PCFVd ติดเข้ามาในประเทศไทย เชื้อ CLVd เอง ก็อาจมิได้ติดเข้ามาจากแหล่งระบาดเชื้อเพียงแหล่งเดียว แต่เกิดจากการนำเข้าเมล็ดพันธุ์อย่างน้อย 3 แหล่ง ซึ่งมีอย่างน้อย 3 ครั้งในการปนเปื้อนเชื้อ CLVd ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้า เนื่องจากการตรวจพบเชื้อดังกล่าวใน 3 ช่วงระยะเวลา เชื้อ CLVd มีความแตกต่างกันคนละกลุ่ม คือ เชื้อที่ตรวจพบในปี 2547-2548 จัดอยู่ในกลุ่ม E ในขณะที่เชื้อที่ตรวจพบในปี 2549-2551 จัดอยู่ในกลุ่ม A และเชื้อที่ตรวจพบในปี 2549-2551 จัดอยู่ในกลุ่ม A, B และ E โดยที่กลุ่ม B จะเป็นเชื้อที่ตรวจพบในปี 2553-2555 ทั้งสิ้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อ CLVd ที่ตรวจพบในแต่ละช่วงปี น่าจะมาจากแหล่งที่ปนเปื้อนเชื้อคนละแหล่งกัน

นอกจากนี้ จากข้อมูลการตรวจพบเชื้อ CLVd ล่าสุดในประเทศไทย (2552-2555) พบว่ามีการกระจายตัวอยู่ในทุกกลุ่ม ทั้งกลุ่ม A, B และ E จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อชนิดนี้จะแพร่ระบาดกระจายไปพื้นที่ปลูกมะเขือเทศในพื้นที่หลายจังหวัดของภาคเหนือและตะวันออกเฉียงเหนือแล้ว

ประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ CLVd แล้วครั้งแรกในปี 2548 ในจังหวัดขอนแก่น (ปริเชษฐ์, 2548) ต่อมามีการตรวจพบอย่างต่อเนื่องในปี 2549-2551 ในจังหวัดขอนแก่น, สกลนคร, อุดรธานี, มหาสารคาม, กาฬสินธุ์ และ มุกดาหาร (ปริเชษฐ์, 2554; ศศิประภา, 2551) และมีการตรวจพบในปี 2552-2555 ในจังหวัดขอนแก่น, สกลนคร, อุดรธานี, มหาสารคาม, กาฬสินธุ์, มุกดาหาร, หนองคาย, เชียงใหม่, เชียงราย, ลำปาง และ ลำพูน

อย่างไรก็ตาม จากผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเชื้อ CLVd แล้ว อาจมีความเป็นไปได้สูงว่า ประเทศไทยได้รับเชื้อ CLVd มาจากประเทศคู่ค้าอื่นที่การระบาดของเชื้อแต่มิได้มีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้ออย่างเป็นทางการ ดังนั้นการเลือกสุ่มและตรวจสอบตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเบื้องต้น (หัวข้อการทดลองที่ 3 และ 4) จึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อได้เช่นกัน

9. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd-new strain

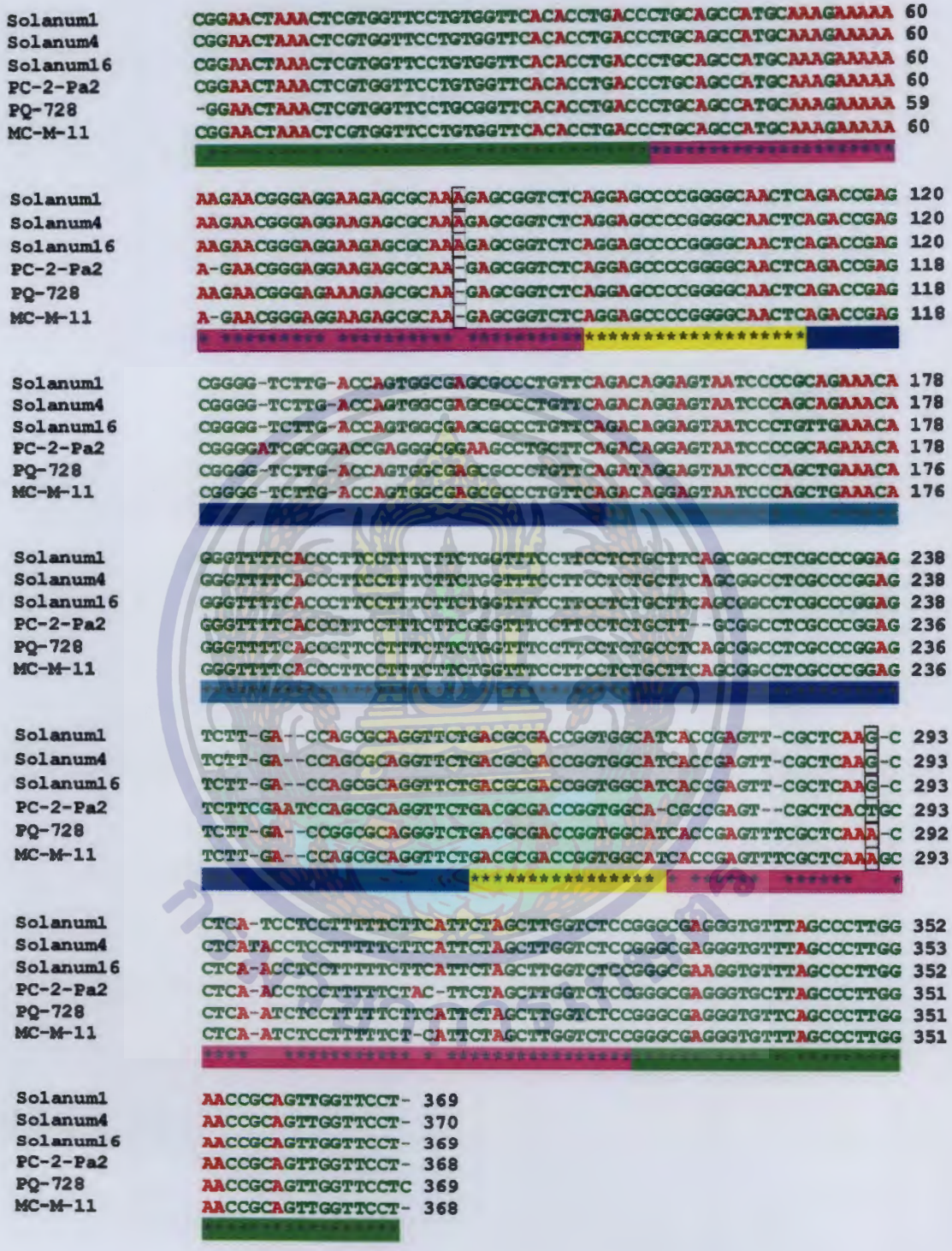
สำหรับเชื้อ CLVd isolate solanum เป็นเชื้อ *Columnea latent viroid* strain ใหม่ที่มีความแตกต่างจากชนิดที่ได้มีการรายงานไว้เดิมเนื่องจากมีคุณสมบัติในการก่อให้เกิดโรคในมะอีก ซึ่งปกติแล้วเชื้อ CLVd จะไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอีก (latent) ในขณะที่ CLVd isolate solanum จะก่อให้เกิดอาการที่ต้นเตี้ยแคระแกร็นที่รุนแรง อาการยอดและใบด่างและย่นหดลดรูป รวมถึงมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ และกิ่งก้าน (vein necrosis) (ภาพที่ 24) ถึงแม้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จะมีความแตกต่างกันไม่มากนักก็ตาม ปัจจุบันตั้งชื่อเป็น CLVd-bolo maka (Tangkanchanapas *et al.*, 2012)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd-bolo maka มาวิเคราะห์ทำ multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW2 โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd ที่มีรายงานว่าไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอีก (latent) ซึ่งได้แก่ PC-2-Pa2 (DQ022677.1), PQ-728 (DQ923061.1) และ MC-M-11 (AM698095.1) (ปริเชษฐ์, 2548; ปริเชษฐ์, 2554; ศศิประภา, 2551) พบการผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ P domain เป็นส่วนใหญ่ (บริเวณตำแหน่งที่ 39 – 91 และ 277 – 328) ซึ่งบริเวณดังกล่าวมีบทบาทหน้าที่เกี่ยวกับการทำให้พืชเป็นโรคและการควบคุมความรุนแรงของโรค โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ CLVd MC-M-11 พบว่ามีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 9 ตำแหน่ง [เปลี่ยนเบส 2 ตำแหน่ง และเกิดช่องว่าง (gab) 7 ตำแหน่ง] ซึ่งช่องว่างทั้ง 7 ตำแหน่งอยู่บริเวณ P domain ทั้งหมด ในขณะที่ CLVd PQ-728 มีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 14 ตำแหน่ง (เปลี่ยนเบส 10 ตำแหน่ง และเกิดช่องว่าง 4 ตำแหน่ง) ซึ่งการเปลี่ยนเบส 2 ตำแหน่งและการเกิดช่องว่างทั้ง 4 ตำแหน่งอยู่บริเวณ P domain ส่วน CLVd PC-2-Pa2 มีนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 28 ตำแหน่ง (เปลี่ยนเบส 9 ตำแหน่ง และเกิดช่องว่าง 19 ตำแหน่ง) ซึ่งการเปลี่ยนเบส 4 ตำแหน่งและการเกิดช่องว่างทั้ง 5

ตำแหน่งอยู่บริเวณ P domain (ภาพที่ 25) ซึ่งทั้ง MC-M-11, PQ-728 และ PC-2-Pa2 ไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอีกแต่อย่างใด ในขณะที่ CLVd-bolo maka ก่อให้เกิดอาการที่รุนแรงในมะอีก

ภาพที่ 24 เปรียบเทียบลักษณะยอดและขนาดใบ ระหว่างเชื้อ CLVd-bolo maka (ขวามือ) กับเชื้อ CLVd สายพันธุ์ที่เคยมีรายงานมาก่อน (ซ้ายมือ)

นอกจากนี้ การวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของ CLVd-bolo maka พบว่ามีนิวคลีโอไทด์เพียง 2 ตำแหน่งเท่านั้นที่เปลี่ยนแปลงตามอาการบนมะอีก คือที่ตำแหน่ง 83 และ 292 โดยนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 83 เกิดการเติมเบส A เพิ่มขึ้น 1 เบส (base insertion) และที่ตำแหน่ง 292 เกิดการเปลี่ยนจากเบส A หรือ T เป็นเบส G (base substitution) โดยความแตกต่างดังกล่าวจะแปรผันตามลักษณะอาการที่ปรากฏกับพืชทดสอบ (ภาพที่ 25 และตารางที่ 4) ดังนั้นจึงน่าจะอนุมานได้ว่าตำแหน่งที่มีความแตกต่างกันบน P domain 2 ตำแหน่งดังกล่าว เป็นส่วนควบคุมความรุนแรงของอาการที่เกิดขึ้นในมะอีก



ภาพที่ 25 ภาพเปรียบเทียบโครงสร้างแสดงโดเมนทั้ง 5 ของเชื้อ CLVd-bolo maka กับเชื้อ CLVd ที่ไม่ก่อให้เกิดอาการผิดปกติในมะอึก (PC-2-Pa2, PQ-728 และ MC-M-11)

หมายเหตุ สีเขียว = TL domain, สีชมพู = P domain, สีเหลือง = C domain, สีน้ำเงิน = V domain, สีฟ้า = TR domain

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในแต่ละโดเมนของเชื้อ CLVd-bolo maka กับเชื้อ CLVd สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดอาการในมะอึก

โดเมน	ตำแหน่งนิวคลีไทด์	% ความเหมือนของเชื้อ CLVd-bolo maka			CLVd สายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในมะอึก
		Solanum 1	Solanum 4	Solanum 16	
Left terminal domain	329 - 39 (79 base)	96	96	95	PQ-728
		98	98	97	PC-2-Pa2
		100	100	98	MC-M-11
Upper pathogenic domain	40 - 91 (51-54 base)	96	96	96	PQ-728
		100	100	100	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Upper central domain	92 - 110 (19 base)	100	100	100	PQ-728
		100	100	100	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Upper variable domain	111 - 153 (41-43 base)	100	100	100	PQ-728
		68	68	68	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Right terminal domain	154 – 215 (62 base)	95	97	95	PQ-728
		98	96	93	PC-2-Pa2
		96	98	96	MC-M-11
Lower variable domain	216 - 259 (43-44 base)	93	93	93	PQ-728
		90	90	90	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Lower central domain	260 - 276 (14-17 base)	100	100	100	PQ-728
		100	100	100	PC-2-Pa2
		100	100	100	MC-M-11
Lower pathogenic domain	278 - 328 (54-56 base)	92	92	95	PQ-728
		88	80	90	PC-2-Pa2
		94	85	96	MC-M-11

ในปัจจุบันมีรายงานว่าการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์เพียงเบสเดียวก็ส่งผลต่อความรุนแรงของโรคและชนิดของพืชอาศัย (Wassenegger *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไวรอยด์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีอัตราการกลายของสารพันธุกรรมสูงสุด (Gago *et al.*, 2009) ทำให้โอกาสเป็นไปได้ที่จะเกิดเชื้อไวรอยด์ชนิดพันธุ์ใหม่ หรือชนิดพันธุ์เดิมที่มีความรุนแรงของโรคที่เปลี่ยนไป หรือเข้าทำลายพืชอาศัยต่างชนิดจากที่เคยมีรายงานมาได้ อย่างไรก็ตามการพิสูจน์ว่านิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 83 และ 292 ซึ่งอยู่บริเวณ P domain มีผลต่อการควบคุมการแสดงออกของอาการโรคของเชื้อ *Columnea latent viroid* จำเป็นต้องมีการศึกษาและทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อยืนยันข้อสมมุติฐานดังกล่าว (โดยการทำ mutagenesis เปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CLVd) หากตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ตำแหน่งมีบทบาทในเรื่องการควบคุมความรุนแรงของเชื้อ CLVd จริง ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการสร้างความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกลในก่อโรคของเชื้อไวรอยด์ และอาจนำมาพัฒนาวิธีการควบคุมและป้องกันโรคเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองพบว่า ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ *Columnea latent viroid* ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากประเทศที่มีความเสี่ยง ทั้งจากการปลูกเพื่อสังเกตอาการ และการตรวจสอบในขั้นละเอียดด้วยเทคนิค Nucleic Hybridization และ RT-PCR ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากปริมาณการสุ่มตรวจที่น้อยเกินไป ควรมีการเพิ่มปริมาณในการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ในปริมาณที่มากขึ้น ซึ่งอาจต้องมากกว่า 1,000 เมล็ด แต่ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณเมล็ดพันธุ์ที่นำเข้าด้วย อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่าอาจมีความเป็นไปได้ที่ประเทศไทยได้รับเชื้อ CLVd มาจากประเทศคู่ค้าอื่นที่การระบาดของเชื้อแต่มิได้มีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้ออย่างเป็นทางการ ทำให้ในการเลือกประเทศที่จะสุ่มตรวจสอบตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเบื้องต้นจึงอาจไม่ตรงกับแหล่งที่มาของเชื้อก็เป็นได้

ผลการสำรวจเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ที่ใช้เมล็ดพ่อ-แม่พันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ตรวจพบเชื้อไวรอยด์ 2 ชนิดคือ *Columnea latent viroid* และ *Pepper chat fruit viroid* จำนวนชนิดละ 4 ตัวอย่าง ซึ่งไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทยแล้วในปี 2548 และ 2553 ตามลำดับ โดยปัจจุบันในปี 2555 ตรวจพบเชื้อ CLVd ในพื้นที่ปลูกมะเขือเทศ 11 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น, สกลนคร, อุดรธานี, มหาสารคาม, กาฬสินธุ์, มุกดาหาร, หนองคาย, เชียงใหม่, เชียงราย, ลำปาง และ ลำพูน และตรวจพบเชื้อ PCFVd ในพื้นที่ปลูกมะเขือเทศ 5 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น, หนองคาย, เชียงราย, ลำปาง และ ลำพูน

นอกจากนี้ยังพบเชื้อ *Columnea latent viroid* strain ใหม่ (CLVd- bolo maka) ที่แตกต่างจากเชื้อ CLVd strain อื่น ๆ ที่เคยมีรายงานมาก่อน โดยก่อให้เกิดอาการรุนแรงในมะอีก ทำให้เกิดอาการที่ต้นเตี้ยแคระแกร็นที่รุนแรง อาการยอดและใบด่างและย่นหดลดรูป และมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ และกิ่งก้าน โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วพบว่า มีนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลงไปตามลักษณะอาการที่ผิดปกติ 2 เบส คือตำแหน่งที่ 83 เกิดการเติมเบส A เพิ่มขึ้น 1 เบส และที่ตำแหน่ง 292 เกิดการเปลี่ยนเบสจาก A หรือ T เป็นเบส G ซึ่งนิวคลีโอไทด์ทั้ง 2 ตำแหน่งอยู่บริเวณ P domain ของเชื้อไวรอยด์ ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการแสดงออกและความรุนแรงของอาการโรค

เอกสารอ้างอิง

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. **การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2554. **การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในมะเขือเทศโดยเทคนิคชีวโมเลกุล. ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม**. หน้า 66-71. *ใน* การประชุมสัมมนาวิชาการอารักขาพืช "อารักขาพืชไทย สู้ภัยศัตรูพืช" สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช 28-30 มิถุนายน 2554 ณ โรงแรมทวาราวดี จังหวัดปราจีนบุรี.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์, คนึงนิตย์ เหรียญวรากร, เสริมศิริ จันทร์เปรม และ รัชนี ฮงประยูร. 2548. ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศ 6 ชนิด ในกลุ่ม *Pospiviroid* ด้วยเทคนิค RT-PCR. **วารสารโรคพืช**. 1-2: 13-21.

ศศิประภา มาราช. 2551. **โคลนก่อโรคของเชื้อ *Columnea latent viroid* และผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้า. วิทยานิพนธ์**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.

Fristch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 2001. Molecular Cloning: **A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 186 p.

Gago, S., S. F. Elena, R. Flores and R. Sanjuan. 2009. Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. **Science**. 323: 1308.

Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. **Viroids**. Science Pulishers, Inc., USA. P. 370.

Hammond, R., D.R. Smith and T.O. Diener. 1989. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnea latent viroid*: a natural mosaic of viroid sequences. **Nucleic Acids Res**. 17 (23): 10083-10094.

Jeffries, C. and J. Tina. n.d. **PROTOCOL FOR THE DIAGNOSIS OF QUARANTINE ORGANISM: Potato spindle tuber viroid (PSTVd)**. Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, EH 12 8NJ, United Kingdom. Available Source: http://www.csl.gov.uk/science/organ/ph/diagpro/PSTVd.pdf, August 20, 2004.

Matthews-Berry, S. 2010. Emerging viroid threats to UK tomato production. **Plant Disease Factsheet**. 2010. P. 5.

Owens, R.A., D.R. Smith and T.O. Diener. 1978. Measurement of viroid sequence homology by hybridization with complementary DNA prepared in vitro. **Virology**. 89: 388-394.

Reanwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnurn. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. **New Disease Reports**. 24: 6 p.

Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Vol.1, 1.44-1.46.

Tangkanchanapas, P., W. Kirdpipat and K Reanwarakorn. 2012. **The New Strain of *Columnea latent viroid* (CLVd) Causes Serious Symptoms on Solanum Plants.** Poster session presented at The International Conference on Tropical and Sub-Tropical Plant Diseases 2012, Chiang Mai, Thailand.

Thompson, J.R., S. Wetzel, M.M. Klerks, D. Vaskova, C.D. Schoen, J. Spak and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. **Journal of Virological Methods**. 111: 85-93.

Verhoeven, J.T.J., C.C.C. Jansen, J.W. Roenhorst, R. Flores and M. de la Pena. 2009. *Pepper chat fruit viroid*: Biological and molecular properties of a proposed new species of the genus *Pospiviroid*. **Virus Res**. 144 (1-2): 209-14.

Verhoeven, J.T.J., C.C.C. Jansen, T.M. Willemen, L.F.F. Kox, R.A. Owens, and J.W. Roenhorst. 2004. Natural Infections of Tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. **Eur. J. Plant Pathol.** 110: 823-831.

Wassenegger M., R. L. Spieker, S. Thalmeir, F. U. Gast, L. Riedel and H. L. Sanger. 1996. A single nucleotide substitution converts *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *nicotiana tabacum*. **Virology**. 226: 191–197.

Zhu Y., Y. Qi, Y. Xun, R. Owens and Ding B. 2002. Movement of *Potato spindle tuber viroid* reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. **Plant Physiol**. 130: 138–146.

ผลงานเรื่องที่ 2

การคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอต้านทานไวรัสจุดวงแหวน *Papaya ringspot virus* ในสภาพเรือนทดลอง

Screening Papaya Varieties for Resistant to *Papaya ringspot virus* under Greenhouse Condition

กรมวิชาการเกษตร

พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์กับส่วนขยายพันธุ์ของส้ม

Development of Viroid Detection on Citrus propagation

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[1] กาญจนา วาระวิชะนี[1]
วันเพ็ญ ศรีชาติ[2] วานิช คำพานิช[2] ปรียพรรณ พงศาพิชญ์[2]
กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[1]
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[2]

บทคัดย่อ

เชื้อไวรอยด์ที่เข้าทำลายพืชกลุ่มส้มมีรายงานทั้งสิ้น 7 ชนิด คือ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Citrus viroid* II (CVd-II) [หรือ *Hop stunt viroid* citrus-type], *Citrus viroid* III (CVd-III), *Citrus viroid* IV (CVd-IV) และ *Citrus viroid* OS (CVd-OS), *Japanease citrus viroid* (JCVd) โดยตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ได้กำหนดให้เชื้อไวรอยด์หลายชนิดเป็นศัตรูพืชกักกัน ดังนั้นการพัฒนาการตรวจวินิจฉัยจึงมีบทบาทที่จำเป็น ซึ่งจากผลการทดลองหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อพืชกลุ่มส้มพบว่ามีวิธีการที่เหมาะสม 3 วิธี คือ MacKenzie buffer, RNeasy Plant Mini Kit และ CTAB buffer โดยทั้ง 3 วิธีการได้อาร์เอ็นเอที่มีปริมาณ ความสะอาดและคุณภาพสูง แต่วิธี MacKenzie buffer และ RNeasy Plant Mini Kit มี unit cost ที่สูงกว่าวิธี CTAB buffer มาก ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยการตรวจด้วยสายดีเอ็นเอไวรอยด์สังเคราะห์ทั้ง 2 เชื้อ คือ CEVd และ HSVd พบว่ามีความสามารถในการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ได้ดี โดยมีความจำเพาะกับชนิดของเชื้อไวรอยด์สูง ยังไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ CLVd และอาร์เอ็นเอของมะนาวปกติ และจากการสำรวจสวนส้ม ส้มโอ และมะนาว ในพื้นที่จังหวัด นครปฐม ราชบุรี และชัยนาท ตั้งแต่ปี 2551 ถึง 2553 ยังไม่พบอาการผิดปกติที่ลักษณะคล้ายอาการที่เกิดเชื้อไวรอยด์ และเมื่อทำการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธีการปลูกเชื้อในพืชทดสอบ (Biological indexing) และเทคนิค RT-PCR พบว่าไม่มีตัวอย่างอาการผิดปกติใดที่ให้ผลแสดงอาการผิดปกติบนพืชทดสอบและได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับเชื้อไวรอยด์ แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรอยด์ทั้ง 5 ชนิดยังไม่มีการระบาดในพื้นที่ผลิตส้มในประเทศไทย ส่วนเชื้อไวรอยด์ 2 ชนิดที่มีรายงานในประเทศไทยแล้ว (CEVd และ HSVd) อาจยังไม่มีการแพร่กระจายข้ามพืชอาศัยจากพืชอาศัยเดิมคือมะนาวและองุ่นไปยังส้ม หรืออาจมีการกระจายตัวของเชื้อในพื้นที่บริเวณแคบ

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-04-01-01-51

คำนำ

ส้ม (Orange, *Citrus sinesis*) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูง มีการปลูกกันแพร่หลายทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยด้วย โดยจังหวัดที่มีการปลูกมากได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แพร่ น่าน สุโขทัย กำแพงเพชร สระบุรี ปทุมธานี พิจิตร ลพบุรี สมุทรสงคราม ชุมพร และนครศรีธรรมราช เป็นต้น พืชสกุลส้มมีอยู่ 130 สกุล ประมาณ 1,500 ชนิด สามารถปลูกได้ในสภาพภูมิอากาศเขตกึ่งร้อน ตั้งแต่ซีกโลกเหนือ เขตเมดิเตอร์เรเนียน จนถึงซีกโลกใต้ แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ คือ ส้ม ส้มเขียวหวาน เลมอนและมะนาว เกรปฟรุตและส้มโอ และส้มอื่น ๆ ส้มเป็นผลไม้ที่มีรสชาติดีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงเป็นที่นิยมบริโภคแพร่หลายทั่วโลกทั้งการบริโภคผลสด หรือนำมาผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น น้ำผลไม้ แยม ผลไม้เชื่อม สกัดน้ำมันเป็นน้ำมันหอมระเหย ใช้ในอุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง ในปี พ.ศ. 2548 มีการนำเข้าผลส้มเข้ามาในปริมาณถึง 4,072 ตัน คิดเป็นมูลค่า 103.6 ล้านบาท และมีการส่งออกผลส้มในปริมาณ 12,939 ตัน คิดเป็นมูลค่า 248.8 ล้านบาท เนื่องจากส้มเป็นพืชที่มีโรคและแมลงศัตรูมากมายหลายชนิดด้วยกัน ประกอบกับประเทศไทยมีภูมิอากาศที่ร้อนชื้น ส่งเสริมให้โรคและแมลงศัตรูพืชสามารถเกิดและเข้าทำลายส้มได้ดี เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไวรอยด์

จากรายงาน ในปัจจุบันมีเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชสกุลส้ม ทั้งสิ้น 7 ชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) [หรือ Citrus viroid I (CVd-I)], *Citrus viroid* II (CVd-II) [หรือ *Hop stunt viroid* citrus-type], *Citrus viroid* III (CVd-III), *Citrus viroid* OS (CVd-OS), *Citrus viroid*-IV (CVd-IV) [หรือ *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd)] และ *Japanese citrus viroid* (JCVd) (Hadidi *et al.*, 2003) โดยลักษณะอาการที่สำคัญของโรคที่เกิดจากเชื้อ CEVd จะก่อให้พืชเกิดอาการแคระแกร็นอย่างรุนแรง ใบโค้งงอเหลืองซีด และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำท่อลำเลียง (necrosis vein) ร่วมด้วย และจะปรากฏอาการเปลือกแตกที่ต้นตอ (bark scaling) และทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง โดยจะขึ้นกับพันธุ์ส้มที่นำมาใช้เป็นยอดหรือต่อเป็นสำคัญ (Hadidi *et al.*, 2003) ในขณะที่เชื้อดังกล่าวจะทำให้เกิดอาการแผลเป็นจุดที่ใบในมะนาวร่วมด้วย และใน citron จะมีอาการใบย่นและม้วนลงอย่างรุนแรง ใบแตกและเซลล์ตายเป็นแผลสีน้ำตาลที่ใต้เส้นใบและใบยอด โดยมีอาการแคระแกร็นร่วม เชื้อชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคจากการใช้กิ่งพันธุ์ที่เป็นโรค การปนเปื้อนเชื้อจากอุปกรณ์ทางเกษตรต่าง ๆ เข้าสู่บาดแผลของพืช dodder โดยสามารถทำความเสียหายให้กับการผลิตส้มได้สูงถึง 5,147 ดอนล่า ต่อ เฮคแตร์ (Hadidi *et al.*, 2003)

สำหรับเชื้อ CVd I (หรือ CBLVd) จะทำให้พืชเกิดอาการเซลล์ตายที่เส้นกลางใบส่วนท้องใบและใบมีอาการโค้งงอลง ในขณะที่เนื้อใบไม่มีอาการผิดปกติ (Duran-Vila *et al.*, 1993) และเปลือกต้นต่อมีอาการเป็นหลุมลึก โดยทำให้พืชแตกกิ่งลดลงอย่างชัดเจน (Roistacher *et al.*, 1993) ในขณะที่เชื้อ CVd II (หรือ HSVd citrus-type) จะมี 2 กลุ่มอาการ CVd IIa จะทำให้เกิดอาการ cachexia คือมีอาการเนื้อใต้เปลือกเป็นหลุม (stem pitting) และมียางเหนียว (gumming) ปรากฏให้เห็น

(Hadidi *et al.*, 2003) ส่วน CVd IIb จะก่อให้พืชต้นแคระแกร็นไม่รุนแรง เกิดอาการเปลือกแตก โดยเนื้อไม้ใต้เปลือกจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว (Roistacher *et al.*, 1993) ขณะที่เชื้อ CVd III จะทำให้ citron เกิดอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ ใบโค้งงอลง และทำให้ใบร่วง ลำต้นและพุ่มใบพืชมีขนาดเล็กลง (Roistacher *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังทำให้ผลมีขนาดเล็กลงร่วมถึงผลผลิตที่ได้ลดลงด้วย (Semancik *et al.*, 1997) และเชื้อ CVd IV เป็นเชื้อไวรอยด์ในส้มที่มีการแพร่กระจายตัวต่ำที่สุด ทำให้พืชเกิดอาการแคระแกร็น (Duran-Vila *et al.*, 1988)

หากเชื้อไวรอยด์เหล่านี้ติดเข้ามากับส่วนขยายพันธุ์ของพืชสกุลส้มอาจก่อให้เกิดความเสียหายกับการผลิตส้มและพืชชนิดอื่นในประเทศไทยได้ ดังนั้นการป้องกันและควบคุมไม่ให้โรคศัตรูพืชติดเข้ามากับส่วนขยายพันธุ์ส้มที่นำเข้าจากต่างประเทศจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการปกป้องภาคการเกษตรของประเทศไทย โดยตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ได้กำหนดให้เชื้อไวรอยด์หลายชนิดเป็นศัตรูพืชกักกัน (Quarantine pest) แต่เนื่องจากไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุดประกอบด้วยอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นวงปิด และไม่มีโปรตีนห่อหุ้มเหมือนไวรัส จึงไม่สามารถด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาได้ ต้องอาศัยการนำใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาในการตรวจวินิจฉัยเท่านั้น ประกอบกับลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อไวรอยด์มีความแตกต่างจากเชื้อสาเหตุโรคชนิดอื่น ดังนั้นการนำเทคนิคทางอณูชีววิทยาต่าง ๆ มาช่วยพัฒนาการตรวจวินิจฉัยโรค เช่น RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความถูกต้องแม่นยำสูงและให้ผลการตรวจวินิจฉัยผลที่รวดเร็ว จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสมในการป้องกันการแพร่ระบาดและการสร้างความเสียหายจากเชื้อไวรอยด์

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
2. ตู้แช่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
3. ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส
4. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
7. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
8. Gel electrophoresis
9. Gel Documentation UV-transilluminator

กรมวิชาการเกษตร

สารเคมี

1. เอ็นไซม์ One-Step RT-PCR (SS III reverse transcriptase /PLATINUM Taq polymerase) (Invitrogen)
2. เอ็นไซม์ *Taq* DNA polymerase
3. สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะ
4. 100 bp DNA Ladder
5. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการปลูกเชื้อบนพืชด้วยวิธีกล
6. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอน การสกัดอาร์เอ็นเอ การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา RT-PCR และ Nucleic Hybridization
7. พืชทดสอบชนิดต่าง ๆ
8. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

วิธีการ

1. สำรวจโรคในสวนส้มและเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไวรอยด์

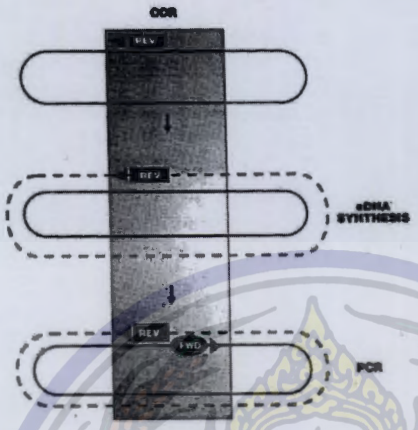
สำรวจโรคในส้มในพื้นที่จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และชัยนาท เก็บตัวอย่างส้มที่แสดงอาการโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไวรอยด์ คือมีลักษณะอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบเหลืองซีด โค้งลง และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ

จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวปลูกถ่ายเชื้อบนพืชทดสอบ Citron (*Citrus medica*) และ Gynura (*Gynura aurantiaca*) ด้วยวิธีกล โดยการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 M pH 9.0 บดตัวอย่างพืช จากนั้นโรยผง carborundum ลงบนใบพืชทดสอบและทาใบพืชทดสอบด้วยน้ำคั้นจากพืชตัวอย่าง เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค สังเกตและจดบันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏ โดยอาการของโรคจะแสดงในระยะเวลาตั้งแต่ 1 ถึง 2 เดือน หลังจากปลูกถ่ายเชื้อแล้ว หากมีเชื้อไวรอยด์อยู่พืชทดสอบ Citron จะแสดงอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบเหลืองซีด ยอดโค้งงอลง และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ ในขณะที่ Gynura จะเกิดอาการใบย่น ยอดใบหดลดรูปอย่างรุนแรง

2. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในส้มเพื่อออกแบบไพรเมอร์

โดยตรวจเอกสารข้อมูลของเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในส้มจากตำราและฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm. nih.gov/) ลักษณะอาการ, แหล่งแพร่ระบาด และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ รวมถึงข้อมูลไพรเมอร์ต่าง ๆ ที่มีรายงาน และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์แต่ละชนิดเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ที่มีรายงาน หากมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ isolate ใหม่ ๆ ที่ไพรเมอร์ที่มีรายงานไว้เดิมไม่สามารถตรวจจับได้ จะทำการปรับแก้ไขหรือออกแบบใหม่ ในกรณีไม่พบรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจกับไวรอยด์ชนิดหนึ่งชนิดใด ก็จะทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ โดยอาศัยโปรแกรม

Multiple sequence alignment ในการหาตำแหน่งเบสอนุรักษ์ (conserve sequence) โดนออกแบบไพรเมอร์ให้สามารถสังเคราะห์เชื้อไวรอยด์ให้ได้แบบเต็มวง (full length) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์เชื้อไวรอยด์แบบเต็มตัว (full length) ด้วยเทคนิค RT-PCR

ที่มา: Hadidi *et al.*, 2003

3. ทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

เนื่องจากในงานทดลองนี้ ดำเนินการกับเชื้อศัตรูพืชกักกันซึ่งมี 2 ชนิดที่มีรายงานในประเทศไทยแต่ไม่พบในวงกว้าง คือเชื้อ CEVd และ HSVd ดังนั้นในการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ออกแบบมาจึงมีความจำเป็น เพื่อทำให้มั่นใจว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถตรวจจับเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดได้ จำเป็นต้องมีเชื้อดังกล่าวไว้ใช้เป็น positive control แต่อย่างไรก็ดีเนื่องจากเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 เป็นศัตรูพืชกักกัน จึงไม่สามารถนำเข้าเชื้อตัวอย่างมาเพื่อใช้เป็น positive control ได้ ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ปัญหาดังกล่าว การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอไวรอยด์ (Gene synthesis) จึงนำมาใช้เพื่อเป็น positive control ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้

ทั้งนี้ในการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอไวรอยด์ จะสังเคราะห์ตามลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CEVd และ HSVd ที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย คือ

1. เชื้อ *Hop stunt viroid* isolate Thailand, complete genome เลข ACCESSION NUMBER DQ023269 ขนาด 298 เบส โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้

```
>gi|66269343|gb|DQ023269.1| Hop stunt viroid isolate Thailand,
complete genome
CTGGGGAATTCTCGAGTTGCCGCATCAGGCAAGCAAAGAAAAAACAAGGCAGGGAGGTACTTA
CCTGAGAAAGGAGCCCCGGGGCAACTTCTTCTCAGAATCCAGCGAGAGGCGTGGAGAGAGGGC
CGCGGTGCTCTGGAGTAGAGGCTCTGCCTTCGAAACACCATCGATCGTCCCTTCTTCTTTACC
TTCTTCTGGCTCTTCCGATGAGACGCGACCGGTGGCATCACCTCTCGGTTCGTCCCAACCTGC
TTTTTGTCTATCTGAGCCTCTGCCGCGGATCCTCTCTTGAGCCCCT
```

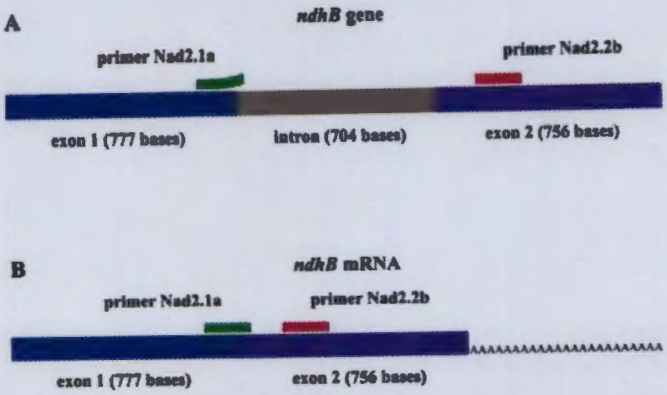
2. เชื้อ *Citrus exocortis viroid* isolate lime, complete genome เลข ACCESSION NUMBER – (ไม่ได้ submit ใน GenBank) ขนาด 371 เบส โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังต่อไปนี้

```
>CEV-lime
CGGGAACTTTCTTGAGGTTCCTGTGGTGCTCACCTGACCCTGCAGGCAGGAAAAGAAAAAAGA
GGCGGCGGGGGAAGAAGTTCTTCAGGGATCCCCGGTGGAAACCTGGAGGAAGTCGAGGTCGGG
GGGACAGCTGCTTCGGTCGCCGCGGATCACTGGCGTCCAGCGGAGAAACAGGAGCTCGTCTCC
TTCCTTTCGCTGCTGGCTCCACATCCGATCGTCGCTGAAGCGCCTCGCCCCCTCGCCCGGAGC
TTCTCTCTGGAGACTACCCGGTGGAAACAACTGAAGCTTCAACCCCAAACCGCTTTTCTTGTA
TCTTCACTGCTCTCCGGGCGAGGGTGAAAGCCCTTGGAACCCTAGATTGGGTCCCT
```

โดยการนำสายดีเอ็นเอไวรอยด์สังเคราะห์ทั้ง 2 เชื้อ นำมาตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด แล้วตรวจสอบดูผลผลิตของปฏิกิริยา PCR ที่ได้ (วิธีการตามหัวข้อที่ 4) ว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดถูกต้องและมีความชัดเจนหรือไม่

4. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบส้ม

เปรียบเทียบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบส้ม โดยเปรียบเทียบจากคุณภาพของอาร์เอ็นเอของ Citron ที่สกัดได้ด้วยวิธีการ 4 วิธี ได้แก่ วิธี MacKenzie buffer (MacKenzie *et. al.*, 1997), วิธี RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), วิธี CTAB buffer (Jeffries and Tina, n.d.) และ วิธี MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ จากนั้นนำอาร์เอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพโดยการตรวจสอบ *NdhB gene* (NADH dehydrogenase ND2 subunit) ซึ่งเป็น housekeeping gene ในคลอโรพลาสต์ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ NAD (Thompson *et al.*, 2003) ซึ่งออกแบบให้ไพรเมอร์เส้น forward (Nad2.1a) สามารถตรวจติดตาม *NdhB* gene ได้เฉพาะในสภาพ mRNA เท่านั้น แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับ *NdhB* gene ได้เฉพาะในสภาพ Genomic DNA (ภาพที่ 2) การตรวจ *NdhB* gene จึงเป็นการตรวจ internal control เพื่อป้องกันการเกิดผลลบเทียม (false negative) อันเนื่องจากการสกัดอาร์เอ็นเอไม่ได้หรืออาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีสารโปรตีนยับยั้ง (inhibitor) ปนเปื้อนอยู่มากจนไปขัดขวางการเกิดปฏิกิริยา RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)



ภาพที่ 2 ไพรเมอร์ NAD ที่ใช้ในการตรวจ *NdhB* gene (internal control)

A: ไพรเมอร์ Nad2.1a จะไม่จับกับ *NdhB* gene ในสภาพ Genomic DNA

B: ไพรเมอร์ Nad2.1a เกิดปฏิกิริยากับ *NdhB* gene ในสภาพ mRNA

สำหรับวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่นำมาเปรียบเทียบทั้ง 4 วิธีมีขั้นตอนดังนี้

4.1 วิธี MacKenzie buffer: บดใบพืช 200 มิลลิกรัม ด้วย MacKenzie buffer (4M Guanindine thiocyanate, 0.2 M Sodium acetate, 25 mM EDTA pH 8.0 และ2.5% PVP-40) ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร จนละเอียด เติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติมสารละลาย Sarkosyl ความเข้มข้น 20% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นดูดของเหลวปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงบน QIAshredder™ column (QIAGEN) ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายที่ผ่าน QIAshredder™ column ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม ethanol (96-100%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและดูดสารละลายผสมดังกล่าวลงบน RNeasy® mini spin column (QIAGEN) ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube เดิมเข้ากับ column เติม QIAGEN buffer RW1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน column ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube ใหม่เข้ากับ column จากนั้นเติม QIAGEN buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน column ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube เดิมเข้ากับ column เติม QIAGEN buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน column ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ

collection tube เดิมเข้ากับ column และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ประกอบ RNeasy® mini spin column เข้ากับหลอด micro centrifuge ใหม่ เติม RNase-free sterile water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยหยดลงบน filter โดยตรง บ่มนาน 2 นาที จากนั้นปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอ

4.2 วิธี RNeasy Plant Mini Kit: บดใบพืช 100 มิลลิกรัม ด้วย RLT buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่มี β-mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จนกระทั่งตัวอย่างละเอียด นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดของเหลวใสส่วนบน 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดของเหลวใสส่วนบน 300 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ absolute alcohol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส 15 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิกและล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิกและล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ไม่มี nuclease ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

4.3 วิธี CTAB: บดใบพืช 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40 เติมก่อนใช้งาน) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน เติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ isopropanol แช่เย็น ปริมาตรเท่ากับของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่

ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที และตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4.4 วิธี MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ร่วมกับการใช้ chloroform: isoamyl alcohol: บดใบพืช 200 มิลลิกรัม ด้วย MacKenzie buffer (4M Guanindine thiocyanate, 0.2 M Sodium acetate, 25 mM EDTA pH 8.0 และ2.5% PVP-40) ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร จนละเอียด เติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติมสารละลาย Sarkosyl ความเข้มข้น 20% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน เติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ isopropanol แช่เย็น ปริมาตรเท่ากับของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที และตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

จากนั้น นำอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดทั้ง 4 วิธีการ มาตรวจสอบคุณภาพด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ NAD เพื่อตรวจหายีน *NdhB* ในพืช ซึ่งมีลำดับเบสดังนี้

Nad2.1a: GGA-CTC-CTG-ACG-TAT-ACG-AAG-GAT-C	(25 bps)	Tm = 63.2
Nad2.2b: AGC-AAT-GAG-ATT-CCC-CAA-TAT-CAT	(24 bps)	Tm = 60.2

ขั้นตอนการทำ RT-PCR

ขั้นตอน Reverse Transcription (RT) เพื่อสร้างสาย cDNA ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

2 พิโคกรัม ไพรเมอร์ สาย c	10.0 ไมโครลิตร
ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ	3.5 ไมโครลิตร
รวม	13.5 ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

ขั้นที่ 1:	97°C	นาน 5 นาที	1 รอบ

จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งทันทีตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

ขั้นที่ 2:	37°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

จากนั้นนำมาเติมสารดังนี้

5X reverse transcriptase buffer	4.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	2.0	ไมโครลิตร
200 U/μl reverse transcriptase	0.5	ไมโครลิตร
รวม	6.5	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 1 รอบ

ขั้นตอน Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ให้มากพอที่จะตรวจสอบได้ ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

50 mM $MgCl_2$	0.8	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.5	ไมโครลิตร
2 พิโคกรัม ไพรเมอร์ สาย c	2.0	ไมโครลิตร
2 พิโคกรัม ไพรเมอร์ สาย h	2.0	ไมโครลิตร
2 U/μl Taq DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	10.2	ไมโครลิตร
cDNA	2.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 3:	56°C	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 30 วินาที	1 รอบ
	โดยในขั้นที่ 2 ถึง 4 จะซ้ำอีก 34 รอบ		
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

ตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ด้วยวิธีการอีเล็คโตรโฟริซิสโดยการใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ NAD จะมีขนาด 188 base pair

5. ตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดด้วยเทคนิค RT-PCR

เมื่อได้วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมแล้ว ทำการตรวจหาเชื้อไวรอยด์กับตัวอย่างที่เก็บจากสวนส้มของเกษตรกรและจากพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อ โดยมีขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

5.1 สกัดอาร์เอ็นเอตัวอย่างพืชกลุ่มส้ม และพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อมาด้วยวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้

5.2 ตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจเชื้อไวรอยด์ทั้ง 8 ชนิด โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้จะมีขนาดอยู่ในช่วงตั้งแต่ 300 ถึง 400 base pair โดยไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้มีลำดับเบสดังต่อไปนี้

5.3 ขั้นตอนการทำ RT-PCR

5.3.1 ขั้นตอน Reverse Transcription (RT) เพื่อสร้างสาย cDNA จากเชื้อไวรอยด์ ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

2 พิโคกรัม ไพรเมอร์ สาย c	10.0	ไมโครลิตร
ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ	3.5	ไมโครลิตร
รวม	13.5	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

ขั้นที่ 1: 97°C นาน 5 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งทันทีตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

ขั้นที่ 2: 37°C นาน 15 นาที 1 รอบ

จากนั้นนำมาเติมสารดังนี้

5X reverse transcriptase buffer	4.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	2.0	ไมโครลิตร
200 U/μl reverse transcriptase	0.5	ไมโครลิตร
รวม	6.5	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 1 รอบ

ขั้นตอน Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ให้มากพอที่จะตรวจสอบได้ ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

50 mM $MgCl_2$	0.8	ไมโครลิตร
10X PCR buffer	2.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.5	ไมโครลิตร
2 พิโคกรัม ไพรเมอร์ สาย c	2.0	ไมโครลิตร
2 พิโคกรัม ไพรเมอร์ สาย h	2.0	ไมโครลิตร
2 U/μl Taq DNA Polymerase	0.5	ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	10.2	ไมโครลิตร
cDNA	2.0	ไมโครลิตร
รวม	20.0	ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 3:	54 ถึง 60°C (ขึ้นกับไพรเมอร์)	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 30 วินาที	1 รอบ
	โดยในขั้นที่ 2 ถึง 4 จะซ้ำอีก 34 รอบ		
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

5.4 ตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ด้วยวิธีการอีเล็คโตรโฟริซิสโดยการใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ จะมีขนาดประมาณ 300-400 base pair

6. การตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันการจำแนกของไวรอยด์

หากได้แถบดีเอ็นเอจากขั้นตอนการตรวจด้วยวิธีการ PCR แล้ว จะดำเนินการหาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเพื่อยืนยันผลการตรวจ โดยการนำ PCR product ที่ได้จากในหัวข้อที่ 4 เชื่อมต่อเข้ากับ pGEM-T easy vector และถ่ายโอนเข้าสู่ competent cell (DH5α) โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

ทำการโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้ เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรอยด์ โดยการเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega) จากนั้นถ่ายโอนเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ต่อไป ซึ่งวิธีการมีดังต่อไปนี้

6.1 เตรียมผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้ให้บริสุทธิ์ โดยการนำไปเชื่อมต่อกับ พลาสมิดพาหะ โดยนำผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR มาแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยวิธีการอีเล็คโตรโฟริซิส ด้วยการใช้ 2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์ คือมีขนาดประมาณ 350 - 400 คู่เบส ใส่หลอด centrifuge tube และชั่งน้ำหนักของเจล โดยจะต้องไม่เกิน 400 มิลลิกรัม

6.2 สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ด้วยวิธีการดังนี้

6.2.1 เติมสารละลาย QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์

6.2.2 เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจัดชุด column โดยนำ QIAquick spin column วางบน collection tube ดูดสารละลายผสมใส่ในชุด column โดยดูดสารละลายปริมาตรไม่เกิน 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งน้ำใสในหลอด collection tube

6.2.3 ล้าง QIAquick spin column ด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้าง QIAquick spin column อีกครั้งด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

6.2.4 จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย EB buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบขนาดและปริมาณ cDNA ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis หากได้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ จะต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ซ้ำอีกครั้งจนได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียว

จากนั้นนำมาตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ด้วยเทคนิคอีเล็คโตรโฟริซิส ด้วยการใช้ 2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที เพื่อตรวจสอบดูว่าได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียวขนาดตรงกับที่ต้องการหรือไม่ หากยังมีแถบดีเอ็นเออื่นปน ก็ให้ทำการตัดเจลเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่ต้องการอีกครั้งและนำไปสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) อีก จนกระทั่งได้แถบดีเอ็นเอที่ต้องการแถบเดียว

6.3 เชื่อมต่อ cDNA ของเชื้อไวรอยด์ (ผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR) เข้ากับ พลาสมิดพาหะ โดยเชื่อมต่อ cDNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วกับพลาสมิด pGEM-T Easy (Promega) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

T4 DNA Ligase 2X buffer	10.0 ไมโครลิตร
PGEM-T easy vector	1.0 ไมโครลิตร
PCR product	8.0 ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (3 unit/μl)	1.0 ไมโครลิตร
รวม	20.0 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ผลที่ได้ของปฏิกิริยาในขั้นตอนนี้คือ จะได้พลาสมิดลูกผสม ที่มีชิ้นผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่เราคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อไวรอยด์เชื่อมต่อเข้าไปอยู่

6.4 นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย โดยถ่ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย Escherichia coli สายพันธุ์ DH 5α ใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch *et al.*, 2001) โดยเติมสารละลายพลาสมิดลูกผสมจากปฏิกิริยา ligation ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ในหลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านที่ทำให้พร้อมรับพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ E. *coli* ปริมาตร 100 ไมโครลิตร พลิกหลอดไปมาเบา ๆ จากนั้นแช่หลอดทดลองในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำหลอดมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และรีบนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร นำไปแช่ในน้ำแข็งเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 - 3 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เทอาหาร LB เดิมทิ้งและเติมอาหารเหลว LB ใหม่ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงไป ละลายตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย ทำการ spread ผิวหน้าอาหารแข็ง LB agar ที่มีแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย isopropyl-6-D thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง จากนั้นนำสารละลายของเชื้อแบคทีเรีย spread บนอาหารแข็ง LB agar ดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือก colony ของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วน cDNA ของเชื้อไวรอยด์ โดยเลือกเฉพาะโคโลนีขนาดใหญ่สีขาว และอยู่ห่างจากโคโลนีอื่น ๆ โดยไม่เลือกโคโลนีที่มีสีฟ้าหรือน้ำเงิน หรือโคโลนีสีขาวขนาดเล็กที่อยู่รอบ ๆ โคโลนีขนาดใหญ่ หรือโคโลนีที่อยู่ชิดกันเป็นกระจุก หากเป็นไปได้ควรเลือกโคโลนีที่อยู่บริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อและเลี่ยงการเลือกโคโลนีที่อยู่บริเวณขอบจาน

6.5 สกัดพลาสมิดลูกผสม ใช้วิธีการ Alkaline lysis (Sambrook and Russell, 2001) โดยเลือกโคโลนีของเชื้อ *E. coli* ที่มีสีขาวมาเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่มีการเติมแอมพิซิลิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารเหลวออก เติมสารละลาย Solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM

EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 100ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture จากนั้นเติมสารละลาย Solution II (0.2 M NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200ไมโครลิตร ที่เตรียมใหม่ก่อนการใช้งาน ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติมสารละลาย Solution III (3 M potassium acetate, 0.2 M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแช่บนน้ำแข็งนาน 5 นาที นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายใส่หลอดใหม่ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตร สารละลาย ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ทิ้งสารละลายและตากตะกอนพลาสมิดให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 20 ไมโครลิตร

6.6 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะ โดยเทคนิค PCR ทำโดยการตรวจหาชิ้นดีเอ็นเอไวรอยด์ ด้วยไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบไวรอยด์ในขั้นต้น คือ PC-2 หรือ CLVd ขึ้นกับผลการตรวจสอบในขั้นต้น โดยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับไวรอยด์ดังกล่าวจะไปเพิ่มปริมาณเฉพาะชิ้นดีเอ็นเอของไวรอยด์ และตรวจสอบผลผลิตที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอีเล็คโตรโฟริซิส ทำให้สามารถตรวจสอบได้ว่ามีชิ้นดีเอ็นเอไวรอยด์ขนาดเดิมที่เราต้องการอยู่หรือไม่ ซึ่งวิธีการมีดังนี้

การตรวจด้วยเทคนิค PCR มีองค์ประกอบของสารเคมีที่ใช้ต่อ 1 reaction ดังนี้

dd H_2O	10.9 µl
10X PCR buffer	2.0 µl
25 mM $MgCl_2$	1.6 µl
10 mM dNTPs	0.5 µl
2 µM Primer +	2.0 µl
2 µM Primer -	2.0 µl
Taq polymerase	0.5 µl
Total volume	19.0 µl
ตัวอย่างพลาสมิดลูกผสม	0.5 µl
Total volume	20.0 µl

หลังจากที่ผสมสารต่าง ๆ ด้านบนลงในหลอด PCR tube เรียบร้อยให้นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

ขั้นที่ 1	94 องศาเซลเซียส	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส	นาน 40 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 3:	54 ถึง 60°C (ขึ้นกับไพรเมอร์)	นาน 30 วินาที	1 รอบ

ขั้นที่ 4	72 องศาเซลเซียส	นาน 40 วินาที	1 รอบ
	ซ้ำ Step ที่ 2 - 4 อีก 34 รอบ		
ขั้นที่ 5	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6	20 องศาเซลเซียส	นาน 15 นาที	1 รอบ

จากนั้นนำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ไปตรวจสอบขนาด DNA ด้วยเทคนิค เจลอีเล็คโตรโฟริซิส โดยใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที นำโคลนของพลาสมิดลูกผสมที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 300 - 400 คู่เบสไปวิเคราะห์หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

6.7 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ หลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะและได้โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามที่ต้องการแล้ว นำโคลนดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยเครื่อง Automated DNA sequencer แล้ว นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังนี้

6.7.1 วิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยอาศัยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ทั้งหมดในฐานข้อมูลของ GenBank ซึ่งผลที่ได้จะได้ข้อมูลว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เราสงสัยจะมีความใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์หรือไม่ และตรงกับชนิดพันธุ์ใด โดยการจำแนกชนิดเชื้อไวรอยด์จะทราบจากการเปรียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งตัวของเชื้อ (whole genome) ว่ามีความคล้ายหรือความเหมือนกัน (identity) มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ หรือไม่ หากค่าความเหมือนอยู่ในระดับตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป จะถือว่าเป็นไวรอยด์ชนิดเดียวกัน

ปกติแล้วโปรแกรม Blastn จะมีค่าที่ใช้พิจารณาความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ข้อมูลของโปรแกรม 3 ค่า ได้แก่

1. ค่า % identity เป็นค่าบอกระดับความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับเชื้อไวรอยด์จะอยู่ที่ระดับตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจึงจะถือว่าเป็นเชื้อไวรอยด์ชนิดเดียวกัน หากต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ลงมา จะถือว่าเป็นไวรอยด์ชนิดพันธุ์ใหม่

2. ค่า score เป็นค่าที่เกิดจากการคำนวณค่าเมทริกโดยการเทียบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เราสนใจกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในฐานข้อมูลแต่ละตัว (pairwise alignment) โดยโปรแกรม Blastn ซึ่งค่าจะเปลี่ยนแปลงไปตามความเหมือนและความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบ โดยปกติแล้วค่า score จะต้องมีค่ามากกว่า 200 bits จึงจะถือว่ามีความน่าเชื่อถือ

3. ค่า expect value เป็นค่าที่ได้จากการค้นและเปรียบเทียบข้อมูลลำดับ นิวคลีโอไทด์ใน GenBank โดยที่ค่า expect value จะเป็นค่าที่บอกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับสิ่งที่

เปรียบเทียบมากน้อยแค่ไหน โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ และหากมีค่าเป็นศูนย์หมายความว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน

6.7.2 วิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อไวรอยด์ที่ได้ โดยอาศัยโปรแกรม mfold RNA-Folding-Form (http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form) เพื่อให้โปรแกรมสร้างโครงสร้างสองมิติที่เป็นไปได้ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งโครงสร้างสองมิติของไวรอยด์เป็นคุณลักษณะที่สำคัญอย่างหนึ่งของเชื้อในกลุ่มนี้ ทำให้สามารถช่วยในการยืนยันผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้เป็นอย่างดี

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 ถึงกันยายน 2553 รวม 3 ปี

สถานที่วิจัย :
1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. สวนส้มของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดราชบุรี นครปฐม และ ชัยนาท

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สำรวจโรคในสวนส้มและปลูกถ่ายเชื้อบนพืชทดสอบ Citron และ Gynura

จากการสำรวจโรคและเก็บตัวอย่างอาการในสวนส้มและมะนาวในพื้นที่จังหวัด ราชบุรี นครปฐม ชัยนาท ได้ตัวอย่างใบมะนาวที่แสดงอาการโรคที่ใกล้เคียงกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ รวม 2 ตัวอย่าง โดยมีลักษณะอาการใบเหลืองซีด บิดม้วนหดลดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบและก้านใบ แต่ลักษณะอาการผิดปกติดังกล่าวไม่ได้ชัดเจนทีเดียวเนื่องจากมีความคล้ายคลึงกันกับอาการที่เกิดจากเชื้อ greening ด้วยเช่นกัน (ภาพที่ 3)

ผลการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ Citron และ Gynura ในระยะเวลา 2 เดือน ไม่พบอาการผิดปกติที่เป็นอาการบ่งชี้เฉพาะของเชื้อไวรอยด์ในส้มปรากฏ

ภาพที่ 3 ลักษณะอาการบนตัวอย่างมะนาวที่เป็นโรค

A: อาการใบเหลืองซีด มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบและก้านใบ

B: อาการใบหดลดรูป และใบบิดม้วนก้านใบ

2. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศและออกแบบไพรเมอร์

จากการสืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชกลุ่มส้มจากตำราวิชาการและฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชกลุ่มส้ม 7 ชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) [หรือ Citrus viroid I (CVd-I)], *Citrus viroid* II (CVd-II) [หรือ *Hop stunt viroid* citrus-type], *Citrus viroid* III (CVd-III), *Citrus viroid* OS (CVd-OS), *Citrus viroid*-IV (CVd-IV) [หรือ *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd)] และ *Japanease citrus viroid* (JCVd) (Hadidi *et al.*, 2003) ซึ่งจากการตรวจเอกสารพบว่ามีไวรอยด์ 7 ชนิดที่มีความเสี่ยงที่อาจตรวจพบเพียง 6 ชนิด คือ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* II (HSVd), *Citrus viroid* III (CVd-III), *Citrus viroid* OS (CVd-OS) และ *Citrus viroid*-IV (CVd-IV)

ตรวจสอบข้อมูลรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ในการเชื้อไวรอยด์แต่ละชนิด โดยนำมาไพรเมอร์แต่ละเส้นมาเปรียบเทียบกับนำข้อมูลลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรอยด์ที่มีรายงานใน GenBank ทุก ๆ isolate เพื่อตรวจสอบว่าไพรเมอร์แต่ละเส้นที่มีรายงานสามารถจับกับไวรอยด์ชนิดนั้น ๆ ได้ทุก isolate หรือไม่ หากไม่สามารถจับได้จะทำการปรับแก้ไขหรือออกแบบใหม่ ในกรณีไม่พบรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจกับไวรอยด์ชนิดหนึ่งชนิดใด ก็จะทำการออกแบบไพรเมอร์ใหม่ โดยอาศัยโปรแกรม Multiple sequence alignment ในการหาตำแหน่งเบสอนุรักษ์ (conserve sequence) ซึ่งผลการทดสอบในขั้นนี้ ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรอยด์ทั้ง 6 ชนิดดังกล่าวจำนวนทั้งสิ้น 16 เส้น ได้แก่

CEVd (Ben-Shaul et al., 1995)

c- CCG-GGG-ATC-CCT-GAA-GGA-CTT	(21 bps)	Tm = 61.4
h- GGA-AAC-CTG-GAG-GAA-GTC-GAG	(21 bps)	Tm = 57.9

CBLVd

c- GTC-GAC-GAC-GAC-CAG-TCA-GCT-CC	(23 bps)	Tm = 67.1
h- GAA-GGC-TCG-TCA-GCT-GCG-GAG-G	(22 bps)	Tm = 69.6

CVdI

c- CCG-AGG-AGC-CCT-CAG-GGG-TTC	(21 bps)	Tm = 65.8
h- AGA-CTT-CTT-GTG-GTT-CCT-GTG-GTG	(24 bps)	Tm = 62.7

CVdII

c- GGC-TCA-AGA-GAG-GAT-CCG-CGG	(21 bps)	Tm = 67.0
h- CCT-GGG-GAA-TTC-TCG-AGT-TGC-CG	(23 bps)	Tm = 66.4

CVdIII

c- GTC-GAC-GAC-GAC-AGG-TAA-GTT-CCC (24 bps) Tm = 64.4

h- GAA-GGC-AGC-TAA-GTT-GGT-GAC-GCC (24 bps) Tm = 66.7

CVdIV

c- TTC-CCC-GGG-GAT-CCC-TCT-TCA-GG (23 bps) Tm = 65.8

h- ATC-TCT-TCA-GAC-TCG-TCG-AGG-GG (23 bps) Tm = 65.3

CVdOS

c- TTA-CCC-TGG-GGA-CTC-CAC-CGC-CG (23 bps) Tm = 67.5

h- AAC-ACG-ATT-GGT-GTT-TCC-CCG-GAG-G (25 bps) Tm = 65.2

HSVd

c- TCG-GAA-GAG-CCA-GAA-GG (17 bps) Tm = 54.7

h- TGA-GAC-GCG-ACC-GGT-GGC-ATC-ACC-T (25 bps) Tm = 67.5

สำหรับเชื้อ CEVd

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	56°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

สำหรับเชื้อ CBLVd, CVdII, CVdIV และ CVdOS

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	64°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

สำหรับเชื้อ CVdI

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	60°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

สำหรับเชื้อ CVdIII

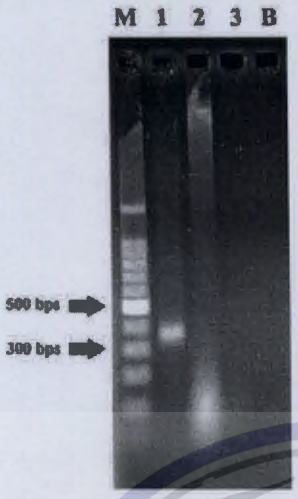
ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	62°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 7 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

สำหรับเชื้อ HSVd

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	52°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 45 วินาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 7 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	20°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

3. ทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ออกแบบ

ผลการทดสอบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ออกแบบต่อสายดีเอ็นเอไวรอยด์สังเคราะห์ทั้ง 2 เชื้อ คือ CEVd isolate lime และ HSVd isolate Thailand พบว่าไพรเมอร์ CEVd ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 เบส (ภาพที่ 4) และ ไพรเมอร์ HSVd ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 เบส (ภาพที่ 5) ซึ่งตรงกับขนาดของเชื้อทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ ยังไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ CLVd และอาร์เอ็นเอของมะนาวปกติอีกด้วย แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้ง 2 คู่ มีความสามารถในการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ได้ดี และมีความจำเพาะกับชนิดของเชื้อไวรอยด์สูง



ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบคู่ไพรเมอร์ CEVd ด้วยสายดีเอ็นเอไวรอยด์สังเคราะห์ โดยเทคนิค RT-PCR

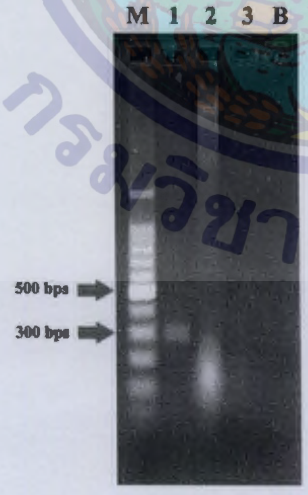
M = 100 bps DNA Ladder

1 = สายดีเอ็นเอไวรอยด์สังเคราะห์ (CEVd isolate lime)

2 = อาร์เอ็นเอจากมะเขือเทศที่มีเชื้อ CLVd

3 = อาร์เอ็นเอจากมะนาวปกติ

B = buffer (blank)



ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบคู่ไพรเมอร์ CEVd ด้วยสายดีเอ็นเอไวรอยด์สังเคราะห์ โดยเทคนิค RT-PCR

M = 100 bps DNA Ladder

1 = สายดีเอ็นเอไวรอยด์สังเคราะห์ (HSVd isolate Thailand)

2 = อาร์เอ็นเอจากมะเขือเทศที่มีเชื้อ CLVd

3 = อาร์เอ็นเอจากมะนาวปกติ

B = buffer (blank)

4. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบส้ม

ผลการเปรียบเทียบคุณภาพของ mRNA ของยีน NADH *dehydrogenase* ND2 subunit พืช จากวิธีสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธีการ ได้แก่ MacKenzie buffer, RNeasy Plant Mini Kit, CTAB buffer และ MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ พบว่าทั้ง 4 วิธีการสามารถสกัดอาร์เอ็นเอจากใบ citron ได้ทั้งหมด เมื่อนำมาตรวจสอบหา *ndhB gene* (NADH dehydrogenase ND2 subunit) ด้วยเทคนิค RT-PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 188 bp (ภาพที่ 6) แสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดีทั้ง 4 วิธีการ ยกเว้นวิธีการ MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ พบว่าตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้จะปริมาณแป้งค่อนข้างมากซึ่งอาจส่งผลรบกวนต่อปฏิกิริยา RT-PCR ได้

ภาพที่ 6 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธี โดยการตรวจ *ndhB gene*

M = 100 bps DNA Ladder

1 = MacKenzie buffer,

2 และ 3 = CTAB buffer

4 = RNeasy Plant Mini Kit

5 และ 6 = MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์

7 = buffer

และเมื่อเปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหลืออีก 3 วิธี พบว่า วิธีการ MacKenzie buffer และ RNeasy Plant Mini Kit มีความสะดวกรวดเร็วในการปฏิบัติงานสูงสุด โดยใช้เวลาในการสกัดอาร์เอ็นเอเพียงครึ่งวันเท่านั้น แต่จำเป็นต้องใช้สารเคมีและชุดสกัดอาร์เอ็นเอที่มีราคาสูงมาก ส่วนวิธี CTAB buffer จะใช้เวลาในการสกัดอาร์เอ็นเอถึงหนึ่งวันครึ่ง แต่สารเคมีที่ใช้จะมีราคาที่ถูกกว่ามาก ซึ่งวิธี CTAB buffer น่าจะมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ในส้มได้ เนื่องจากได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพที่ดี และมี unit cost ต่อหน่วยต่ำที่สุด

5. ตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการตรวจตัวอย่าง ส้ม ส้มโอ และมะนาว จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Reverse RT-PCR ทดสอบหาเชื้อไวรอยด์ทั้ง 6 ชนิด คือ CEVd, CBLVd, HSVd, CVd III, CVd IV และ CVd OS ผลปรากฏว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย (246-380 เบส) แสดงให้เห็นว่ายังไม่พบการระบาดของเชื้อไวรอยด์ส้มชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย

จากผลการตรวจด้วยวิธีการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ (Biological indexing) และ RT-PCR ที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรอยด์ทุกชนิดที่กล่าวมา รวมถึงผลจากการเก็บตัวอย่างอาการโรคจากในสวนส้มและมะนาวที่ไม่ปรากฏลักษณะอาการที่ต้องสงสัยจำเพาะของเชื้อไวรอยด์ แสดงให้เห็นว่ายังไม่พบการระบาดของเชื้อ *Citrus bent leaf viroid*, *Citrus viroid* III, *Citrus viroid* IV และ *Citrus viroid* OS ซึ่งไวรอยด์ทั้ง 4 ชนิดนี้ยังไม่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทยด้วย

ส่วนไวรอยด์อีก 2 ชนิดที่มีรายงานตรวจพบในประเทศไทย คือ *Citrus exocortis viroid* (สมบูรณ์, 2545) และ *Hop stunt viroid* (วราลักษณ์, 2545) นั้นจากการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าเชื้อ HSVd มีการตรวจพบเฉพาะในพื้นที่ปลูกองุ่นในพื้นที่จังหวัดราชบุรี, สมุทรสาคร และ กาญจนบุรีเท่านั้น (วราลักษณ์, 2545) จึงมีความเป็นไปได้อย่างมากที่ว่าเชื้อ HSVd ยังไม่ได้แพร่กระจายไปยังพืชกลุ่มส้มหรือมะนาว เนื่องจากเชื้อชนิดนี้มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดโรคทางกลได้ดีมาก แต่ไม่สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์, ละอองเกสร และแมลงได้ ทำให้กลไกในการแพร่กระจายตัวของเชื้อข้ามไปยังพืชอาศัยชนิดอื่น ๆ จะต้องเกิดจากการใช้ท่อนพันธุ์องุ่นที่มีการปนเปื้อนเชื้อมาต่อกับท่อนพันธุ์ส้ม หรือเกิดจากการใช้อุปกรณ์เครื่องมือเกษตรที่มีการปนเปื้อนเชื้อจากแหล่งปลูกองุ่นไปยังแหล่งปลูกส้ม ซึ่งเป็นไปได้ยาก นอกจากนี้เชื้อ HSVd ยังมีคุณสมบัติในด้าน strain specific คือแต่ละ strain มีความจำเพาะกับพืชอาศัย (5 type) ได้แก่ plum-type, hop-type, grapevine-type, cucumber-type และ citrus-type (CVd II) (Hadidi *et al.*, 2003) จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อ HSVd grapevine-type อาจไม่สามารถแพร่กระจายโรคไปยังส้มหรือมะนาวได้ และมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อชนิดนี้มิได้มีการระบาดในวงกว้างแต่จำกัดเฉพาะในพื้นที่ปลูกองุ่นบางแห่งเท่านั้น

สำหรับเชื้อ CEVd มีการตรวจพบเฉพาะในพื้นที่ปลูกมะนาวในพื้นที่จังหวัดราชบุรี, นครปฐม และ ชัยนาท เท่านั้น (สมบูรณ์, 2545) เนื่องจากเชื้อ CEVd มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดโรคทางกลได้ดีมาก แต่ไม่สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์, ละอองเกสร และแมลงได้ ทำให้กลไกในการกระจายตัวของเชื้อ จะต้องเกิดจากการใช้ท่อนพันธุ์มะนาวหรืออุปกรณ์เครื่องมือเกษตรที่มีการปนเปื้อนเชื้อ ดังนั้นหากไม่มีการนำเอาตาหรือกิ่งมะนาวไปติดขยายพันธุ์กับส้ม หรือการใช้เครื่องมือเกษตรร่วมกันจึงเป็นไปได้ยากที่เชื้อ CEVd จะแพร่กระจายจากแปลงมะนาวไปปนเปื้อนยังพื้นที่ผลิตส้ม นอกจากนี้เชื้อ CEVd มีรายงานการตรวจพบในพื้นที่ปลูกมะนาวเพียงบางพื้นที่บางสวนเท่านั้น โดยไม่ได้กระจายตัวทั่วทั้งพื้นที่ปลูกของจังหวัด จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อ CEVd อาจยังไม่ได้แพร่ระบาดข้ามพืชอาศัยจากมะนาวมายังส้ม

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองในขั้นแรกพบว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อส้มมี 3 วิธี ได้แก่ MacKenzie buffer, RNeasy Plant Mini Kit และ CTAB buffer โดยทั้ง 3 วิธีให้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพสูง โดยวิธี MacKenzie buffer และ RNeasy Plant Mini Kit มีความสะดวกและรวดเร็ว แต่มี unit cost ที่สูงกว่าวิธี CTAB buffer มาก

ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบด้วยการตรวจด้วยสายดีเอ็นเอไวรอยด์สังเคราะห์ทั้ง 2 เชื้อ คือ CEVd และ HSVd พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ มีความสามารถในการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ได้ดีและมีความจำเพาะกับชนิดของเชื้อไวรอยด์สูง ยังไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อ CLVd และอาร์เอ็นเอของมะนาวปกติ

ผลการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธีการ Biological indexing และเทคนิค RT-PCR ไม่พบเชื้อไวรอยด์ส้มทั้ง 6 ชนิด ซึ่ง 4 ชนิด คือ CBLVd, CVd-III, CVd-IV และ CVd-OS ซึ่งยังไม่มีการการตรวจพบในประเทศไทย แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรอยด์ทั้ง 4 ชนิดยังไม่มีการระบาดในประเทศไทย ในขณะที่ไวรอยด์อีก 2 ชนิดที่มีรายงานตรวจพบในประเทศไทย คือ CEVd และ HSVd (ที่พบในมะนาวและองุ่นตามลำดับ) มีความเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดอาจยังไม่มีการแพร่กระจายข้ามพืชอาศัยจากมะนาวและองุ่นไปยังส้ม และมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้มีการระบาดในวงเฉพาะในบางพื้นที่เท่านั้น

คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คนึงนิตย์ เหรียญวรากร ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน ขอขอบคุณ คุณวิภา เกิดพิพัฒน์ ที่ช่วยปลูกและดูแลพืชทดสอบให้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

วราลักษณ์ รักษ์แดง. 2545. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในองุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบูรณ์ พรหมมา. 2545. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในมะนาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ben-Shaul, A., Y. Guang, N. Mogilner, R. Hadas, M. Mawassi, R. Gafny and M. Bar-Joseph. 1995. Genomic diversity among populations of two citrus viroids from different graft-transmissible dwarfing complexes in Israel. **Phytopathology**. 85: 359-364.

Duran-Vila, N., J.A. Pina, J.A., Ballester, J.F. Juarez, J. Roistacher, C.N. Rivera-Bustamante and J.S. Semancik. 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid RNAs. Proceedings of the International Organization of Citrus. **Virologists**. 10: 152-164.

Duran-Vila, N., J.A. Pina and L. Navarro. 1993. Improved indexing of citrus viroids. Pages 202-211. In: *Proc. 12th Conf. IOCV,*. IOCV, Riverside, CA.

Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. **Viroids**. Science Pulishers, Inc., USA. P. 370.

Jeffries, C. and J. Tina. n.d. **PROTOCOL FOR THE DIAGNOSIS OF QUARANTINE ORGANISM: Potato spindle tuber viroid (PSTVd)**. Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, EH 12 8NJ, United Kingdom. Available Source: http://www.csl.gov.uk/science/organ/ph/diagpro/PSTVd.pdf, August 20, 2004.

MacKenzie, D.J., M.A. McLean, S. Mukerji and M. Green. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription -polymerase chain reaction. **Plant Disease**. 81: 222-226.

Roistacher, C.N., J.A. Bash, J.S. Semancik. 1993. Distinct disease symptoms in *Poncirus trifoliata* indusced by three citrus viroids from three specific groups. Pages 173-179. In: *Proc. 12th Conf. Int. Organization Citrus Virol., IOCV*, Riverside, CA.

Semancik, J.S., A.G. Rakowski, J.A. Bash and D.J. Gumpf. 1997. Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of "Valencia" orange. **J. Hortic. Sci**. 72: 563-570.

Thompson, J.R., S. Wetzel, M.M. Klerks, D. Vaskova, C.D. Schoen, J. Spak and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in Fragaria spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. **Journal of Virological Methods**. 111: 85-93.

ผลงานเรื่องที่ 3

การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ

Interception of *Columnea latent viroid* (CLVd) in Imported Tomato Seed

กรมวิชาการเกษตร

เรื่อง การคัดเลือกพันธุ์มะละกอต้านทานไวรัสจุดวงแหวน *Papaya ringspot virus* ในสภาพเรือนทดลอง

Screening Papaya Varieties for Resistant to *Papaya ringspot virus* under Greenhouse Condition

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[1] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1]
กาญจนา วาระวิชะนี[1] ธวัชชัย นิ่มกิ่งรัตน์[2]

กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[1]
ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ[2]

บทคัดย่อ

เชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของมะละกอ ทำให้เกิดโรคด่างวงแหวน สร้างความเสียหายกับการผลิตมะละกอ ทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งมะละกอสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดหลายสายพันธุ์ เช่น แขกดำ มีความอ่อนแอต่อโรคนี้มาก ปัจจุบันมีการดัดแปลงตัดต่อสารพันธุกรรมให้พืชมีความสามารถในการต้านทานโรคด่างวงแหวนได้ แต่พบว่ากลับไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เนื่องจากการความกังวลของผู้บริโภคต่อความปลอดภัยในการบริโภคและความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ วิธีการคัดเลือกพันธุ์แบบดั้งเดิมเป็นหนึ่งในวิธีการแก้ไขปัญหาดังกล่าว ให้พืชมีคุณสมบัติในการการต้านทานต่อโรค โดยทดสอบพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อ PRSV จากผลการทดลองพบว่ามะละกอทั้ง 29 สายพันธุ์ คือ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, Maradol, MIR, SEW 58, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HO, HOS no.1, HOS no.2, HOS no.3, KD-Si, KK 80, KN (SR), MI, SK 001, SK 002, SK 003, SK 004 และ เบอร์ 12 พบว่าทั้ง 29 สายพันธุ์ไม่ต้านทานต่อเชื้อ PRSV แต่พบว่ามี 4 พันธุ์ที่แสดงลักษณะการทนทานต่อโรคได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือ พันธุ์ ปากช่อง, MI, SK 003 และ SK 004 ซึ่งอาจมีศักยภาพนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะละกอทนทานต่อโรคได้

รหัสการทดลอง 01-23-54-01-00-00-11-54

คำนำ

มะละกอ: (*Carica papaya* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ *Carecaceae* ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว 5-9 แฉก เกาะกลุ่มอยู่ด้านบนสุดของลำต้น ภายในก้านใบและใบมียางเหนียวสีขาวอยู่ มะละกอบางต้นอาจมีดอกเพียงเพศเดียว แต่บางต้นอาจมีดอกได้ทั้งสองเพศก็ได้ (CAB international, 2007) มะละกอเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ทั้งการทานผลไม้สด การนำมาทำอาหารคาว และการนำมาแปรรูปในเชิงอุตสาหกรรม สำหรับประเทศไทยโดยเฉพาะเกษตรกรภาคตะวันออกเฉียงเหนือปลูกมะละกอไว้เพื่อรับประทานในครัวเรือน ส่วนที่เหลือจากรับประทานก็จำหน่ายเป็นรายได้เสริม พื้นที่ปลูกเพื่อการค้าขนาดใหญ่จะอยู่ในภาคกลาง ตะวันออก และภาคอื่นๆ พื้นที่ปลูกมะละกอทั้งประเทศ ระหว่างปี 2540-2545 เฉลี่ยปีละ 165,297 ไร่ ผลผลิตเฉลี่ย 461,178.6 ตันหรือประมาณ 2.8 ตัน/ไร่ ซึ่งถือว่าต่ำมาก พื้นที่ปลูกในภาคอีสานเท่ากับ 46% ของพื้นที่ปลูกทั่วประเทศแต่ผลผลิตออกมาน้อยมาก ปริมาณไม่เพียงพอต่อผู้บริโภค จนต้องนำมะละกอจากภาคอื่นๆ เข้ามาจำหน่าย (วิไล และ เมธินี, 2549)

ศัตรูพืชที่สำคัญอย่างหนึ่งของมะละกอคือเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) ซึ่งทำให้เกิดโรคด่างวงแหวน เชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำความเสียหายกับการผลิตมะละกอ โดยทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพที่ได้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งมะละกอสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดหลายสายพันธุ์ เช่น แขกดำ และขอนแก่น 1, 2 มีความอ่อนแอต่อโรคนี้มาก การสร้างความทนทานโรคโดยวิธีการปลูกเชื้อ PRSV สายพันธุ์ mild strain ลงในต้นกล้ามะละกอ (Cross Protection) (รัชดาภรณ์ และ กิตติพันธ์, 2549) และการคัดเลือกพันธุ์ตามธรรมชาติยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการดัดแปลงตัดต่อสารพันธุกรรมให้พืชมีความสามารถในการต้านทานโรคด่างวงแหวนได้ แต่พบว่ากลับไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเนื่องจากการความกังวลของผู้บริโภคต่อความปลอดภัยในการบริโภคและความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น การผสมกับพันธุ์พื้นเมือง เป็นต้น และยังส่งผลทางด้านการกีดกันทางการค้า นอกจากนี้ยังพบว่ามะละกอดัดต่อสารพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นมาหลายสายพันธุ์มีช่วงความต้านทานที่แคบ คือแสดงความต้านทานได้เฉพาะเชื้อ PRSV สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการดัดแปลงพันธุกรรมพืชแต่ไม่สามารถต้านทานเชื้อ PRSV สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันได้ (Tripathi *et al.*, 2008) ด้วยเหตุผลเหล่านี้ ทำให้ปัญหาโรคด่างวงแหวนในมะละกอที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ PRSV ยังคงเป็นปัญหาสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตมะละกอต่อไป

PRSV เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในมะละกอ ทำให้ใบมีอาการผิดรูป เหลือง ด่างจุด มีอาการด่างจุดวงแหวนที่ผล ลำต้นและก้านใบแคระแกร็น ผลที่ได้มีขนาดและปริมาณน้อยลง ผิวผลมีอาการเป็นจุดวงแหวน เมื่ออาการรุนแรงจะบิดเบี้ยว ผลดิบเนื้อแข็งกระด้าง ผลสุกเนื้อจะเป็นไต มีรสขม ผลผลิตลดลงมากและคุณภาพเสียหายจนเก็บเกี่ยวไม่ได้ (วิไล และ เมธินี, 2549) และอาการจะทวีความรุนแรงในช่วงอากาศหนาว เชื้อ PRSV จัดจำแนกอยู่ในวงศ์ Potyviridae สกุล *Potyvirus*

ถ่ายทอดโรคผ่านทางแมลงพาหะ เพลี้ยอ่อนสองชนิด (*Myzus persicae* และ *Aphis gossypii*) โดยมีการถ่ายทอดโรคแบบ non-persistent (Tripathi *et al.*, 2008) ไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคได้ด้วยวิธีกล แต่ไม่สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ เชื้อ PRSV สามารถจำแนกออกได้เป็น 2 สายพันธุ์ใหญ่ ๆ คือ P strain และ W strain ซึ่งสายพันธุ์ P สามารถเข้าทำลายได้ทั้งมะละกอ (Conover, 1964a) และพืชในกลุ่ม cucurbits (Conover, 1964b) ในขณะที่สายพันธุ์ W จะเข้าทำลายเฉพาะพืชในกลุ่ม cucurbits เท่านั้น (Tripathi *et al.*, 2008) เชื้อ PRSV เป็นสาเหตุปัญหาสำคัญกับทั้งการผลิตมะละกอและพืชในกลุ่ม cucurbits โดยเฉพาะในมะละกอจะทำให้ผลผลิตลดลงอย่างรุนแรง รวมถึงทำให้ระดับน้ำตาลในผลลดลงได้มากถึง 50 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า (Tripathi *et al.*, 2008) เชื้อ PRSV พบการระบายได้ทั่วโลก โดยมีรายงานการระบาดของโรคนี้ครั้งแรกที่ฮาวายปี พ.ศ. 2488 (Jensen, 1949) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการระบาดของโรคจุดวงแหวนครั้งแรกในปี 2518 ที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ถวิล, 2518) ปัจจุบันโรคนี้ระบาดทุกจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยมีความรุนแรง 100% (วิไล และคณะ, 2546) เชื้อ PRSV ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงกับการผลิตมะละกอในทุก ๆ พื้นที่ ซึ่งในบางพื้นที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการลดลงของอุตสาหกรรมมะละกอ ในไต้หวัน PRSV ได้เข้าทำลายพื้นที่ผลิตมะละกอส่วนใหญ่ในบริเวณชายฝั่งตะวันตกในระยะเวลาเพียง 4 ปีเท่านั้น โดยทำให้ผลผลิตลดลงจาก 41,595 ตัน ในปี 1974 เหลือเพียง 18,950 ตัน ในปี 1977 (Yeh *et al.*, 1988) ในตอนใต้ของเกาะตากาลอก ประเทศฟิลิปปินส์ ไวรัสได้เข้าทำลายการผลิตมะละกอจากเดิม 36,000 ตัน ในปี 1981 เหลือเพียง 10,000 ตัน ในปี 1987 (Bayot *et al.*, 1990)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
2. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
3. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
4. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)

สารเคมี

1. ชุดตรวจสอบเชื้อ PRSV reagent set (Agdia)
2. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการปลูกเชื้อบนพืชด้วยวิธีกล
3. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค ELISA
4. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

กรมวิชาการเกษตร

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลทางชีววิทยา วิธีการตรวจวินิจฉัย และการถ่ายทอดโรคของเชื้อ *Papaya ringspot virus* และวางแผนการทดลอง

ตรวจเอกสารข้อมูลต่าง ๆ ของเชื้อ PRSV เช่น วิธีการตรวจสอบ (เซรุ่มวิทยาและอณูชีวโมเลกุล) วิธีการถ่ายทอดโรค ลักษณะอาการที่สำคัญของโรค และอาการของโรคชนิดอื่นในมะละกอ รวมถึงความผิดปกติของมะละกอที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ PRSV

2. สำรวจและเก็บรวบรวมไอโซเลทของเชื้อ *Papaya ringspot virus* จากแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง รวมถึงปลูกเชื้อบนมะละกอพันธุ์แขกดำ เพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อในการทดลอง

เตรียมโรงเรือนมุ้งขนาด 4 X 6 เมตร พร้อมอุปกรณ์เกษตรต่าง ๆ และเตรียมต้นกล้ามะละกอพันธุ์แขกดำเพื่อปลูกเชื้อ นำตัวอย่างเชื้อ PRSV ที่ได้ปลูกเชื้อลงบนมะละกอพันธุ์แขกดำด้วยวิธีกล โดยบดใบพืชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.0 โรยผง celite ลงบนใบมะละกอพันธุ์แขกดำและทาด้วยน้ำคั้นจากพืชที่เป็นโรค โดยบัฟเฟอร์มีกรรมวิธีในการเตรียมดังนี้

เริ่มต้นจากการเตรียมสารละลาย 2 ชนิดที่เป็นส่วนประกอบสำคัญ คือ

a. 0.2 M $NaH_2PO_4.H_2O$ (molecular weight = 27.6 กรัม)

b. 0.2 M $Na_2HPO_4.12H_2O$ (molecular weight = 71.7 กรัม)

ในการเตรียม Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทำโดย

1. เตรียมสารละลาย a. ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร $NaH_2PO_4.H_2O$ ปริมาตร 0.0276 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 5.0 มิลลิลิตร

2. จากนั้นเตรียมสารละลาย b. ปริมาตร 150.0 มิลลิลิตร โดยชั่งสาร $Na_2HPO_4.12H_2O$ ปริมาตร 2.151 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 150.0 มิลลิลิตร

3. ตวงสารละลาย b. ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตรใส่บีกเกอร์ จากนั้นเติมสารละลาย a. ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 7.0 โดยการใช้สารละลาย a. และ b. ที่เหลือ (ใช้สารละลาย a.ปรับ pH ให้ลดลง และสารละลาย b.ปรับ pH ให้เพิ่มขึ้น)

4. ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ

สังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏ โดยอาการของโรคจะแสดงในระยะเวลาตั้งแต่ 2 อาทิตย์ ถึง 1 เดือน หลังจากปลูกเชื้อ

3. ทดสอบความต้านทาน/ทนทานต่อโรคต่างจุดวงแหวนด้วยวิธีการปลูกเชื้อวิธีกลในโรงเรือนทดลอง

3.1 วางแผนการทดลองแบบ CRD กรรมวิธีประกอบด้วย มะละกอจำนวน 31 สายพันธุ์ (KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, Maradol, MIR, SEW 58, SKLD, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HN, HO, HOS no.1, HOS no.2, HOS no.3, KD-Si, KK 80, KN (SR), MI, SK 001, SK 002, SK 003, SK 004 และ เบอร์ 12) ทดสอบสายพันธุ์ละ 30 ต้น โดยใช้พันธุ์แขกดำซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมการทดสอบ

3.2 ปลูกเชื้อ PRSV ลงบนต้นกล้ามะละกอพันธุ์ต่าง ๆ ในระยะแตกใบจริงคู่แรกถึงคู่ที่ 2 ด้วยวิธีกลโดยบดใบพืชด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.0 โรยผง celite ลงบนใบมะละกอ โดยใช้มะละกอพันธุ์แขกดำเป็นตัวควบคุม สังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏ โดยอาการของโรคจะแสดงในระยะเวลาตั้งแต่ 4 ถึง 6 อาทิตย์ หลังจากปลูกเชื้อ จากนั้นบันทึกลักษณะอาการ ความรุนแรงที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับมะละกอพันธุ์แขกดำ ในกรณีที่พันธุ์ใดมีการแสดงอาการของโรคไม่ชัดเจน จะทำการปลูกเชื้อซ้ำ

4. ตรวจสอบเชื้อ PRSV บนต้นมะละกอแต่ละพันธุ์ด้วยวิธี ELISA (ในกรณีที่ปลูกเชื้อซ้ำ 2 ครั้งแล้วพืชยังไม่แสดงอาการผิดปกติ และยืนยันผลซ้ำด้วยเทคนิค RT-PCR)

ในกรณีที่ปลูกเชื้อซ้ำ 2 ครั้ง และพืชไม่แสดงอาการของโรคที่ชัดเจน จะยืนยันผล โดยการตรวจหาเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค ELISA และ RT-PCR ตามลำดับ โดยในขั้นที่ตรวจไม่พบเชื้อ PRSV จะทำการปลูกเชื้อซ้ำอีกครั้งเพื่อยืนยันผล จากนั้นส่งต้นดังกล่าวกลับไปยังศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษเพื่อดำเนินการต่อไป

4.1 สำหรับวิธีการตรวจโดย ELISA มีวิธีการดังนี้

1. ลงรายละเอียดของตัวอย่างและ control ต่าง ๆ บนแผนผังการตรวจ (loading diagram)
2. เติม "Capture Antibody" (เจือจาง Capture Antibody ด้วย "Carbonate Coating buffer" ความเข้มข้น 1X ในอัตราส่วนตามที่ระบุข้างหลอด (1:200) ผสมให้เข้ากัน) ลงใน ELISA plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อ well
3. บ่มในกล่องชื้นที่ 37°C นาน 4 ชั่วโมง หรือที่ 4°C ข้ามคืน
4. ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBST buffer 4 - 8 ครั้ง อย่างรวดเร็ว
5. บดตัวอย่างพืชด้วย "General Extract buffer" ในอัตราส่วน 1:10 (weight : volume General Extract buffer)
6. เติมตัวอย่างพืช positive และ negative control ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน ELISA plate จากนั้นบ่มในกล่องชื้นที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง หรือที่ 4°C ข้ามคืน
7. ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBST buffer 4 - 8 ครั้ง อย่างรวดเร็ว

8. เตรียม "Enzyme Conjugate" (เจือจาง Enzyme Conjugate ด้วย "ECI buffer" ความเข้มข้น 1X ในอัตราส่วนตามที่ระบุข้างหลอด (1:200) ก่อนใช้งาน 10 นาที) จากนั้นเติม enzyme conjugate ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน ELISA plate

9. บ่มในกล่องชื้นที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง

10. ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBST buffer 4 - 8 ครั้ง อย่างรวดเร็ว

11. เติมสารละลาย "PNP substrate buffer" ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน ลงใน ELISA plate จากนั้นบ่มในกล่องชื้นที่ 37°C นาน 30 - 60 นาที

12. ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยดูสีเปรียบเทียบระหว่าง control ทั้ง 3 คือ buffer, negative และ positive กับ ตัวอย่าง หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ 405 nm หยุดปฏิกิริยาด้วย 3M sodium hydroxide ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ประมาณ 1หยด)

<u>โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยมีดังนี้</u>

1. Carbonate Coating buffer (1X) (1,000 มิลลิลิตร)

- Sodium carbonate (anhydrous)	1.59 กรัม
- Sodium bicarbonate	2.93 กรัม
- Sodium azide	0.2 กรัม
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 9.6 จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บที่ 4°C

2. General Extract buffer (1X) (1,000 มิลลิลิตร)

- Sodium sulfite (anhydrous)	1.3 กรัม
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20.0 กรัม
- Sodium azide	0.2 กรัม
- Powdered egg (chicken) albumin, Grade II	2.0 กรัม
- Tween-20	20.0 กรัม
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

เติมน้ำ 20 มิลลิลิตร ลงใน Buffer powder ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 9.8 ด้วย HCl จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและเติม Tween-20 ลงไป ผสมจนเข้ากัน เก็บที่ 4 °C

3. 1X ECI buffer (1X) (1,000 มิลลิลิตร)

- Bovine serum albumin (BSA)	2.0 กรัม
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW 24-40,000	20.0 กรัม
- Sodium azide	0.2 กรัม
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บที่ 4°C

4. PBST buffer (1X) (Wash Buffer) (1,000 มิลลิลิตร)

- Sodium chloride	8.0 กรัม
- Sodium phosphate, dibasic (anhydrous)	1.15 กรัม
- Potassium phosphate, monobasic (anhydrous)	0.2 กรัม
- Potassium chloride	0.2 กรัม
- Tween-20	0.5 กรัม
- น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บที่ 4°C (หรือเจือจางจาก stock 10X PBST buffer (ซอง))

5. PNP substrate buffer (1X) (1,000 มิลลิลิตร)

- Magnesium chloride hexahydrate	0.1 กรัม
- Sodium azide	0.2 กรัม
- Diethanolamine	97.0 มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	800 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 9.8 จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บที่ 4°C

ก่อนใช้งาน ละลาย PNP tablet 1 เม็ด ด้วย PNP solution (1X) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ในภาชนะทึบแสง โดยเตรียมก่อนการใช้งาน 15 นาที

6. Stop reaction solution

3 M sodium hydroxide

4.2 สำหรับวิธีการตรวจโดย RT-PCR มีวิธีการดังนี้

4.2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการ CTAB (Jeffries and Tina, n.d.)

เก็บใบมะละกอ 100 มิลลิกรัม บดด้วยสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40 เติมก่อนใช้งาน) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย) และ isopropanol แช่เย็น ปริมาตร 600 ไมโครลิตร (1 เท่าของปริมาตรสารละลาย) ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส บ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที นาน 4 นาที ตากตะกอนนิวคลีอิกให้แห้งสนิทและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจหาเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR ในขั้นต่อไป

4.2.2 การตรวจเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR

นำตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีการ CTAB (ตามหัวข้อ 4.2.1) มาตรวจสอบหาเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR (one-step) โดยการใช้ ไพรเมอร์ PRSV-F และ PRSV-R (Sreenivasulu and Sai Gopal, 2010) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

PRSV-F	5' ATC ACA ATG TAT TAC GC 3'	17 base
PRSV-R	5' CTC TCA TTC TAA GAG GCT C 3'	19 base

ขั้นตอนของปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

2X one-step buffer	10.0 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	4.5 ไมโครลิตร
2 μM ไพรเมอร์ สาย PRSV-F	2.0 ไมโครลิตร
2 μM ไพรเมอร์ สาย PRSV-R	2.0 ไมโครลิตร
Superscript RT/Platinum Taq polymerase	0.5 ไมโครลิตร
อาร์เอ็นเอตัวอย่าง	1.0 ไมโครลิตร
รวม	20.0 ไมโครลิตร

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

ขั้นที่ 1	48 องศาเซลเซียส	นาน 50 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2	94 องศาเซลเซียส	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 3	94 องศาเซลเซียส	นาน 30 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 4	55 องศาเซลเซียส	นาน 45 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 5	72 องศาเซลเซียส	นาน 1 นาที	1 รอบ
	โดยในขั้นที่ 3 ถึง 5 จะซ้ำอีก 34 รอบ		
ขั้นที่ 6	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 7	20 องศาเซลเซียส	นาน 15 นาที	1 รอบ

4.2.3 ตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้

ด้วยวิธีการอีเล็คโตรโฟริซิสโดยการใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้ จะมีขนาด 1,715 base pair

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม 2553 ถึงกันยายน 2555 รวม 2 ปี

สถานที่วิจัย : กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดสอบมะละกอทั้ง 31 สายพันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, Maradol, MIR, SEW 58, SKLD, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HN, HO, HOS no.1, HOS no.2, HOS no.3, KD-Si, KK 80, KN (SR), MI, SK 001, SK 002, SK 003, SK 004 และ เบอร์ 12 ซึ่งใช้พันธุ์แขกดำซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมการทดสอบ โดยแบ่งการประเมินความรุนแรงของโรคออกเป็น 5 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 – ไม่แสดงอาการผิดปกติ มีความต้านทานต่อโรค

ระดับที่ 2 – แสดงอาการโรคไม่รุนแรง ใบด่างเล็กน้อยและไม่ลดรูป ค่อนข้างต้านทานต่อโรค

ระดับที่ 3 – แสดงอาการโรครุนแรงปานกลาง ใบด่างชัดเจนแต่ไม่ลดรูป

ระดับที่ 4 – แสดงอาการโรคค่อนข้างรุนแรง ใบด่างและมีอาการหดลดรูปชัดเจน

ระดับที่ 5 – แสดงอาการโรครุนแรง ใบด่างรุนแรงและมีอาการหดลดรูปชัดเจน

ผลการทดสอบ พบว่า

1. มะละกอ 21 สายพันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, HO, HOS no.1, HOS no.2, ท่าพระ 3, สีทอง, KD-Si, KK 80, Maradol, MIR, SEW 58, Taiwan, KN (SR), SK 001, SK 002 และ เบอร์ 12 แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนและรุนแรงโดยมีอาการใบด่างและหงิกม้วนผิดรูป ซึ่งเป็นความรุนแรงของโรคในระดับที่ 5 (ภาพที่ 1)

2. มะละกอ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ลูกผสมออสเตรเลีย, ครั่ง และฮาวาย แสดงอาการใบด่างชัดเจน แต่ไม่มีอาการใบลดรูป ซึ่งเป็นความรุนแรงของโรคในระดับที่ 3 (ภาพที่ 2)

3. มะละกอสายพันธุ์ HOS no.3 แสดงอาการใบหดลดรูปชัดเจนแต่ไม่มีอาการด่างร่วม ซึ่งเป็นความรุนแรงของโรคในระดับที่ 4

4. มะละกอ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ปากช่อง, MI, SK 003 และ SK 004 จะแสดงอาการโรคที่ไม่รุนแรง มีความทนทานต่อโรคได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ ซึ่งเป็นความรุนแรงของโรคในระดับที่ 2 (ภาพที่ 3)

5. มะละกอสายพันธุ์ SKLD และ HN เมล็ดไม่งอก ทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบได้

และเมื่อนำใบจากพันธุ์มะละกอที่แสดงอาการของโรคไม่ชัดเจนมาตรวจสอบเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค ELISA พบว่าให้ผลเป็นบวก จากผลที่ได้ดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่ามะละกอทั้ง 29 สายพันธุ์ ไม่มีความต้านทานต่อโรคด่างวงแหวนจุดมะละกอ แต่พันธุ์ปากช่อง, MI, SK 003 และ SK 004 มีความทนทานต่อโรคดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ 1)

ภาพที่ 1 ลักษณะอาการใบด่างและใบหดลดรูปอย่างรุนแรง เนื่องจากเชื้อ PRSV

ภาพที่ 2 ลักษณะอาการอาการใบด่างชัดเจน แต่ไม่มีอาการใบลดรูป เนื่องจากเชื้อ PRSV

ภาพที่ 3 ลักษณะอาการใบด่างที่ไม่รุนแรง และไม่มีอาการใบลดรูป เนื่องจากเชื้อ PRSV

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบความต้านทานโรคด่างวงแหวนของมะละกอสายพันธุ์ต่าง ๆ

ลำดับ	สายพันธุ์	ลักษณะอาการ/ความรุนแรงโรค	% ติดโรค	ความต้านทานโรค
1	แขกดำ (control)	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
2	KDDNS	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
3	KDLS1	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
4	KDLS2	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
5	KNLS1	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
6	LN	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
7	MA	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
8	Maradol	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
9	MIR	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
10	SEW 58	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
11	SKLD	เมล็ดไม่งอก	-	-
12	Taiwan	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
13	ครั่ง	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่าง	100%	ไม่ต้านทานโรค
14	ท่าพระ 3	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
15	ปากช่อง	แสดงอาการไม่รุนแรง	97%	ทนทานต่อโรค
16	ลูกผสมออสเตรเลีย	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่าง	100%	ไม่ต้านทานโรค
17	สีทอง	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างเหลือง	100%	ไม่ต้านทานโรค
18	ฮาวาย	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่าง	100%	ไม่ต้านทานโรค
19	HN	เมล็ดไม่งอก	-	-
20	HO	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
21	HOS no.1	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
22	HOS no.2	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
23	HOS no.3	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
24	KD-Si	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
25	KK 80	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
26	KN (SR)	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
27	MI	แสดงอาการไม่รุนแรง	93%	ทนทานต่อโรค
28	SK 001	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
29	SK 002	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค
30	SK 003	แสดงอาการไม่รุนแรง	93%	ทนทานต่อโรค
31	SK 004	แสดงอาการไม่รุนแรง	97%	ทนทานต่อโรค
32	เบอร์ 12	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	100%	ไม่ต้านทานโรค

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองพบว่ามะละกอทั้ง 29 สายพันธุ์ คือ KDDNS, KDLS1, KDLS2, KNLS1, LN, MA, Maradol, MIR, SEW 58, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ 3, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HO, HOS no.1, HOS no.2, HOS no.3, KD-Si, KK 80, KN (SR), MI, SK 001, SK 002, SK 003, SK 004 และ เบอร์ 12 ไม่ต้านทานต่อเชื้อ *Papaya ringspot virus* โดยมีพันธุ์มะละกอจำนวน 4 พันธุ์ คือ ปากช่อง, MI, SK 003 และ SK 004 มีความทนทานต่อโรคดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ จึงอาจนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

รัชดาภรณ์ จันทาศรี และ กิตติพันธ์ จันทาศรี. 2549. การเปรียบเทียบสายพันธุ์มะละกอและความทนทานต่อโรคใบด่างวงแหวน. วารสารวิชาการ ม.อบ. 1: 8-19.

ถวิล ศรีสมชัย. 2518. การศึกษาโรคใบด่างมะละกอ. หน้า 228-232. *ใน* รายงานประจำปี 2518. สำนักงานภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัด ขอนแก่น.

วิไล ปราสาทศรี. 2546. โรคจุดวงแหวนมะละกอและการป้องกันกำจัด. เอกสารทางวิชาการสถานีทดลองพืชสวนขอนแก่น ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ สถาบันวิจัยพืชสวน กรมวิชาการเกษตร. 43 หน้า

Bayot, R.G., V.N. Villegas, P.M. Magdalita, M.D. Jovellana, T.M. Espino and S.B. Exconde. 1990. Seed transmissibility of *Papaya ringspot virus*. **Philippine Journal of Crop Science**. 15(2): 107-111.

CAB international. 2007. **Crop Protection Compendium 2003 Edition**. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

Conover, R.A. 1964a. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 77: 440-444.

Conover, R.A. 1964b. Mild mosaic and faint mottle ringspot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 77:444-448.

Jeffries, C. and J. Tina. n.d. **PROTOCOL FOR THE DIAGNOSIS OF QUARANTINE ORGANISM: Potato spindle tuber viroid (PSTVd)**. Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, EH 12 8NJ, United Kingdom. Available Source: http://www.csl.gov.uk/science/organ/ph/diagpro/PSTVd.pdf, August 20, 2004.

Jensen, D.D. 1949. Papaya virus disease with special reference to papaya ringspot. **Phytopathology**. 39: 191-211.

Sreenivasulu, M. and D.V.R. Sai Gopal. 2010. Development of Recombinant Coat Protein Antibody Based IC-RT-PCR and Comparison of Its Sensitivity with Other Immunoassays for the Detection of *Papaya ringspot virus* Isolates from India. **Plant Pathol. J.** 26(1): 25-31.

Tripathi, S., J.Y. Suzuki, S.A. Ferreira and D. Gonsalves. 2008. *Papaya ringspot virus*-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. **Mol Plant Pathol**. 9(3): 269 –280.

Yeh, S.D., D. Gonsalves, H.L. Wang, R. Namba and R.J. Chiu. 1988. Control of *Papaya ringspot virus* by cross protection. **Plant Disease**. 72(5): 375-380.

กรมวิชาการเกษตร