

การพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV)
ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)
Development of Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP)
Technique for the Detection of *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV)

ธัญญาพร เหล่าคงถาวร^{1,2} สุพัฒน์ อรรถธรรม³ วิชัย โสสิตรัตน์^{1,2,3} และสุจินต์ ภัทรภูวadol^{1,2,3*}
 Tanyaporn Lhaokongthawon^{1,2}, Supat Attathom³, Wichai Kositratana^{1,2,3} and Sujin Patarapuwadol^{1,2,3*}

บทคัดย่อ

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) เป็นเชื้อสาเหตุของโรคที่สำคัญของพืชวงศ์แตง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อ ZYMV ด้วยเทคนิค reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสชนิดนี้ โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ coat protein (CP) gene ของ ZYMV พบว่าสามารถตรวจเชื้อได้ภายใน 1 ชั่วโมง โดยสังเกตผลผลิตกันท์ของ CP gene ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยตาเปล่าโดยการเติมสาร SYBR Green I และตรวจไม่พบในตัวอย่างที่เป็น *Papaya ringspot virus* (PRSV) และใบพืชทองปกติ จากการตรวจสอบ CP gene ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอหลายขนาดมีลักษณะคล้ายขั้นบันไดและเมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยืนยันว่าเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CP gene ของเชื้อ ZYMV ประสิทธิภาพของการตรวจเชื้อ ZYMV ด้วยเทคนิค RT-LAMP เมื่อเทียบกับเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่าเทคนิค RT-LAMP มีประสิทธิภาพสูงกว่า โดยตรวจพบเชื้อ ZYMV ได้ในปริมาณที่น้อยกว่าเทคนิค RT-PCR ถึง 10 เท่า ดังนั้น เทคนิค RT-LAMP จึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ ZYMV ได้สะดวกรวดเร็วและถูกต้อง

คำสำคัญ: เทคนิค reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) เชื้อ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) พืชวงศ์แตง

Abstract

Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) is one of the major viruses that cause disease in cucurbits. The objective of this study was to develop a reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technique for the detection of ZYMV in infected cucurbits that uses primers that are specific to the nucleotide sequences of the ZYMV coat protein gene (CP) gene. The RT-LAMP assay took only an hour to detect ZYMV. The RT-LAMP product of the tested samples was able to be visualized by staining directly in the tube with SYBR Green I, and no reaction was detected from the tissues of healthy plants and the tissues of the plants that were infected with *Papaya ringspot virus* (PRSV). The RT-LAMP products were analyzed by agarose gel electrophoresis, and ladder-like DNA fragments were observed in various sizes. The specificity of the RT-LAMP assay was assessed by sequencing of the RT-LAMP products. The result showed that the nucleotide sequences of the RT-LAMP products were those of the CP gene of ZYMV. The sensitivity of the RT-LAMP assay was higher than that of the reverse transcription-polymerase chain reaction technique (RT-PCR) by 10 fold serial dilution. The results showed that the RT-LAMP technique is a simple and accurate diagnostic method for the detection of ZYMV in cucurbits.

Keywords: reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), cucurbits

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

³ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*Corresponding author, Email: agrsujp@ku.ac.th

คำนำ

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงที่ใช้ทั้งบริโภคภายในประเทศและส่งออก จากข้อมูลของสำนักควบคุมพืชและวัสดุเกษตร กรมวิชาการเกษตร และสมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย พบการส่งออกเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงในปี พ.ศ. 2550 ถึงปี พ.ศ. 2559 จำนวน 6,913.50 ตัน คิดเป็นมูลค่ารวมทั้งสิ้น 8,061.64 ล้านบาท ขณะที่การนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตง ในปี พ.ศ. 2550 ถึงปี พ.ศ. 2559 มีจำนวน 598.50 ตัน คิดเป็นมูลค่ารวมทั้งสิ้น 920.93 ล้านบาท (สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย, 2559) สาเหตุโรคพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของพืชวงศ์แตงคือ โรคไวรัสที่เกิดจากเชื้อ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) มีรายงานพบ ZYMV ในพืชวงศ์แตงครั้งแรกที่อิตาลีปี ค.ศ. 1973 (Lisa et al., 1981) และพบการเข้าทำลายพืชวงศ์แตงในอีกหลายประเทศทั่วโลก (Richard et al., 1993) สำหรับในประเทศไทย กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้ประกาศให้ ZYMV เป็นสิ่งต้องห้าม เนื่องจากเป็นศัตรูพืชกักกันตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2550 (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2550)

เชื้อ ZYMV จัดอยู่ในสกุล *Potyvirus* มีลักษณะเป็นท่อนยาวคดขนาด 750 นาโนเมตร สามารถถ่ายทอดโรคได้โดยวิธีกลและเพลี้ยอ่อน (Lisa and Lecoq, 1984) และ ZYMV ยังสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ (Coutts, 2006) Schrijnwerkers et al. (1991) ตรวจพบเชื้อ ZYMV ในเมล็ด (*Cucurbita pepo* cv. Black Beauty) 0.3% และพบที่บริเวณเปลือกหุ้มเมล็ดเท่านั้น นอกจากนี้ Davis and Mizuki (1986) และ Tobias et al. (2008) ยังตรวจพบเชื้อ ZYMV ที่ติดไปกับเมล็ดที่ 18.9% และ 1.4% ตามลำดับ เชื้อ ZYMV ที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงทำให้น้ำหนักและคุณภาพของผลผลิต รวมถึงอายุการเก็บรักษาลดลง ทำให้ผลผลิตเสียหาย 70-95% (Coutts, 2006) ซึ่งในพื้นที่เพาะปลูกตามสภาพธรรมชาติ พืชวงศ์แตงจะถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายมากกว่า 1 ชนิด ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสจากอาการที่พบบนใบพืชได้

เทคนิคที่นำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ ZYMV มีหลายเทคนิค เช่น เทคนิคด้านเซรุ่มวิทยาอย่างเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดย Noda et al. (1993) และ Plapung and Smitamana (2014) ได้นำเทคนิค ELISA มาใช้ในการตรวจเชื้อ ZYMV ในประเทศไทย แต่เทคนิคดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่ เช่น มีขั้นตอนที่ซับซ้อน ยุ่งยาก และใช้เวลานานในการตรวจสอบ (Almasi and Dehabadi, 2013) นอกจากนี้ยังมีเทคนิคด้านโมเลกุลอย่างเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ที่มีความไวและความจำเพาะสูง ซึ่งต้องตรวจสอบภายในห้องปฏิบัติการและใช้เครื่องมือเฉพาะบางชนิด เช่น เครื่อง thermocycler เพื่อเป็นการลดปัญหาและเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อไวรัส จึงได้มีการนำเทคนิค loop mediated isothermal amplification (LAMP) มาใช้ โดยที่เทคนิค LAMP สามารถเพิ่มปริมาณยีนโดยใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ที่ออกแบบให้มีจำเพาะต่อยีนเป้าหมายถึง 6 ตำแหน่ง จึงมีความจำเพาะสูง การสังเคราะห์ดีเอ็นเออาศัยเอนไซม์ *Bst* DNA polymerase เทคนิคนี้ใช้อุณหภูมิคงที่ประมาณ 60-65°C ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ในขั้นตอนเดียว โดยการสังเกตการตกตะกอนที่เกิดขึ้นหลังสิ้นสุดการทำปฏิกิริยาได้ด้วยตาเปล่า ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิค electrophoresis ในการตรวจสอบ (Mori et al., 2001) นอกจากนี้เทคนิค LAMP ยังสามารถพัฒนาเพื่อตรวจอาร์เอ็นเอไวรัสได้ด้วย Kuan et al. (2014) ใช้เทคนิค reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) ตรวจสอบเชื้อ ZYMV ใน squash (*Cucurbita pepo* L.) และเมลอน (*Cucumis melo* L.) ที่พบในประเทศไทยได้หวั่น ซึ่งพบว่า เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบเชื้อ ZYMV ได้อย่างจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพดีกว่าเทคนิค RT-PCR การทดลองนี้จึงได้นำเทคนิค RT-LAMP มาพัฒนาและปรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ ZYMV ที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงที่พบในประเทศไทย

วิธีการศึกษา

แหล่งที่มาของเชื้อไวรัสและการเตรียมตัวอย่างพืชที่มีเชื้อ *Zucchini yellow mosaic virus*

เชื้อ ZYMV ไอโซเลต Cu161 (GenBank accession MF124605) ที่แยกเชื้อได้จากตัวอย่างแตงโมที่มีอาการใบด่าง ใบด่างเหลือง เส้นใบเปลี่ยนสี ใบลดรูป ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง เส้นใบใส อาการด่างสีเขียวเข้มบริเวณเส้นใบ จากแหล่งปลูกในจังหวัดขอนแก่นที่ตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค ELISA นำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี single lesion isolation จึงนำเพิ่มปริมาณเชื้อในพืชทอง และตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ZYMV ตามวิธีการของ Tobias et al. (2008) จากนั้นนำมาเป็นตัวอย่างที่ให้ผลบวก นำมาใช้ในการพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อ ZYMV ด้วยเทคนิค RT-LAMP โดยนำมาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ RAeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) วัดความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอไวรัสด้วยเครื่อง Nanodrop 2000™ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

การพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ ZYMV ด้วยเทคนิค RT-LAMP

ทำการออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจเชื้อ ZYMV จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ CP gene ของเชื้อ ZYMV ไชเลต Taiwan ที่มีรายงานการในฐานข้อมูล NCBI (NC003224.1 และ AF127929.2) ซึ่งเป็นไอโซเลตเดียวกันที่ Kuan et al. (2014) ใช้ออกแบบไพรเมอร์ เพื่อตรวจด้วยเทคนิค RT-LAMP และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ ZYMV ไชเลต Cu161 (MF124605) ด้วยโปรแกรม Primer Explorer V3 (<http://primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html>) โดยไพรเมอร์ที่ออกแบบได้จำนวน 4 ชุด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดัง Table 1

Table 1 RT-LAMP primer sets designed for the detection of ZYMV.

Set	Primer name	Sequence (5'-3')	Target gene	GenBank accession
1	ZYMV-FIP-Taiwan	CGCGGGCTCTTTCAGGAGTTGAGTTTGGCTCGATACGCT	CP	NC003224.1
	ZYMV-BIP-Taiwan	GTTGCGCAGATGAAAGCAGCATAGTGGTGGCAACATTCCA		
	ZYMV-F3-Taiwan	ACATGCCGAGGTATGGTTTG		
	ZYMV-B3-Taiwan	GTGTGCCGTTTCAGTGTCTT		
2	ZYMV-FIP-Taiwan	CGCGGGCTCTTTCAGGAGTTGAGTTTGGCTCGATACGCT	CP	NC003224.1
	ZYMV-BIP-Taiwan	GCTGTTGCGCAGATGAAAGCAAGTGGTGGCAACATTCCA		
	ZYMV-F3-Taiwan	ACATGCCGAGGTATGGTTTG		
	ZYMV-B3-Taiwan	GTGTGCCGTTTCAGTGTCTT		
3	ZYMV-FIP-Taiwan	CCAGCAAATGATCGATATCGAGTATAAGATCACAAAGAAGATGT CACT	CP	AF127929.2
	ZYMV-BIP-Taiwan	ATAAGCCGGATCAAATTGAGTTGTGTTCTAACTTGATTAAACCA GGA		
	ZYMV-F3-Taiwan	AAAATTGTGCCGCGTCTT		
	ZYMV-B3-Taiwan	CCCATCTGTTGCTCATTCA		
4	ZYMV-FIP-Thailand	CTGTGATACTCGATGTTGATCATCTCTTGTGTTATACAATTG ATCT	CP	MF124605
	ZYMV-BIP-Thailand	TGC CTC TGA CTC TAG GTA ACG ACC GTA AAT GCT GGT TCT CAT G		
	ZYMV-F3-Thailand	AAG CAA ATT GCT GGT GAG		
	ZYMV-B3-Thailand	ACC AGC TAA GAA AGA CAA AGA		

ตรวจสอบเชื้อไวรัส ZYMV ด้วยเทคนิค RT-LAMP และ Visual LAMP ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Kuan et al. (2014) โดยนำ cDNA ของพืชที่มีเชื้อ ZYMV พืชที่มีเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) และพืชปลอดโรคมาใช้ในการทดสอบ โดยมีน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ มีองค์ประกอบสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ดังนี้ 6.4 μ M Primer FIP-ZYMV, 6.4 μ M Primer BIP-ZYMV, 0.4 μ M Primer F3-ZYMV, 0.4 μ M Primer B3-ZYMV, 1x Thermopol Reaction Buffer (4.5 mM $MgSO_4$, 20 mM Tris-HCl pH 8.8, 10 mM KCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0.1% Triton X-100), 4 mM $MgSO_4$, 1.4 mM dNTPs, และ Bst DNA polymerase (8 unit/ μ l) จากนั้นนำหลอดตัวอย่างไปต้มใน heating box ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ ที่อุณหภูมิ 55°C, 60°C และ 65°C เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่ 80°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจผลบน 1.5% agarose gel electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที และสังเกตผลด้วยตาเปล่า โดยเติมสาร SYBR[®] Green I (Invitrogen, USA) (1:10) 1 μ l สังเกตการเปลี่ยนสีของสาร SYBR Green I จากสีส้มเป็นสีเขียวเรืองแสงได้ในหลอดที่เกิดปฏิกิริยา

คัดเลือกไพรเมอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสม นำมาตรวจสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา RT-LAMP โดยนำ cDNA ของพืชที่มีเชื้อ ZYMV พืชที่มีเชื้อ PRSV และพืชปลอดโรคมาใช้ในการทดสอบ โดยมีน้ำกลั่นหนึ่งข่าเชื้อซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมลบมาทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที

ตรวจสอผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis ยืนยันความถูกต้องของสารพันธุกรรมที่ได้จาก RT-LAMP โดยส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (First Base Laboratories Sdn. Bhd., Selangor, Malaysia)

การทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา LAMP เปรียบเทียบกับการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำ cDNA ของพื้กทองที่มีเชื้อ ZYMV ที่ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอเริ่มต้น 1,065 ng/ μ l มาเจือจางเป็น 10 เท่า ตั้งแต่ 10^{-1} จนถึง 10^{-5} เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา RT-LAMP และ RT-PCR โดยการตรวจเชื้อด้วย RT-PCR ตามวิธีการของ Tobias et al. (2008) จากนั้นวิเคราะห์ผลด้วย 1.5% agarose gel electrophoresis

ผลการศึกษาและวิจารณ์

แหล่งที่มาของเชื้อไวรัสและการเตรียมตัวอย่างพืชที่มีเชื้อ *Zucchini yellow mosaic virus*

การเก็บตัวอย่างใบพืชวงศ์แตงที่แสดงอาการของโรคจากจังหวัดขอนแก่น พบใบแตงโมที่แสดงอาการ (Figure 1A) เมื่อทำการตรวจเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ ZYMV จำนวน 30 ตัวอย่าง พบเชื้อ ZYMV ในใบแตงโมจำนวน 2 ตัวอย่าง นำตัวอย่างที่ให้ผลบวกไปแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี single lesion isolation บนพืชทดสอบ *Chenopodium amaranticolor* ภายหลังเมื่อนำแผลจุดเฉพาะที่ในครั้งที่ 3 มาปลูกเพิ่มปริมาณเชื้อ ZYMV ในพื้กทอง หลังการปลูกเชื้อประมาณ 1 สัปดาห์ พบพื้กทองแสดงอาการต่างหลังการปลูกเชื้อ เมื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่าทั้ง 2 ตัวอย่างให้ผลบวก (Figure 1B) เมื่อนำ cDNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างใบพื้กทองที่เป็นโรคและเพิ่มปริมาณเชื้อ ZYMV ไว้ 2 ไส้หลอด คือ Cu161 และ Cu162 มาเพิ่มปริมาณ *CP* gene ด้วยเทคนิค RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 871 bp ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tobias et al. (2008) ที่นำ *CP* gene ที่เพิ่มปริมาณได้ มาศึกษาความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ทั้ง 2 ไส้หลอด Cu161 และ Cu162 มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 99% และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ ZYMV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล NCBI พบว่า *CP* gene ของทั้ง 2 ไส้หลอด มีความเหมือน *CP* gene ของ ZYMV ที่มีรายงานจากประเทศจีน (AY074808.1) มากที่สุด คือ 94% จากนั้นได้ส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ ZYMV ไส้หลอด Cu161 เก็บในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) ได้รับ accession number คือ MF124605 ซึ่งเชื้อที่แยกและตรวจสอบได้ในครั้งนี้นำมาใช้ในการศึกษาพัฒนาเทคนิค RT-LAMP

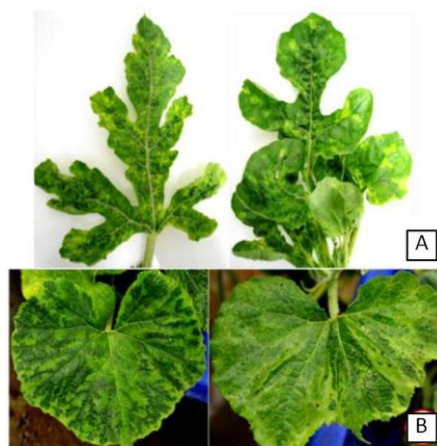


Figure1 Leaf symptoms of ZYMV. A) Symptoms of ZYMV on watermelon leaf collected from field in Khon Kaen province. B) Symptoms of ZYMV after inoculation in pumpkin.

การพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ ZYMV ด้วยเทคนิค RT-LAMP

ในการตรวจสอบเชื้อ ZYMV โดยการออกแบบไพรเมอร์จำนวน 4 ชุด จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CP* gene ของเชื้อ ZYMV ไส้หลอด Taiwan (NC003224.1 และ AF127929.2) จำนวน 3 ชุด (Table 1, set 1-3) และลำดับนิวคลีโอไทด์ *CP* gene ของเชื้อ ZYMV ไส้หลอด Cu161 (MF124605) จำนวน 1 ชุด (Table 1, set 4) ถึงแม้ว่าบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ *CP* gene ของเชื้อ ZYMV ทั้ง 2 ไส้หลอด จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงกัน แต่ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CP* gene ของเชื้อ ZYMV ไส้หลอด Taiwan ทั้ง 3 ชุด ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ ZYMV ไส้หลอด Cu161 และ Cu162 ได้ (Figure 2 A-C) มีเพียงไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ *CP* gene ของเชื้อ ZYMV ไส้หลอด Cu161 ที่สามารถตรวจสอบเชื้อ ZYMV

ไอโซเลต Cu161 และ Cu162 ได้ (Figure 2D) จากนั้นทำการตรวจสอบเชื้อ ZYMV โดยใช้ไพรเมอร์ชุดที่ 4 ที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 55°C, 60°C และ 65°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาพบว่า ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อ ZYMV (Figure 3)

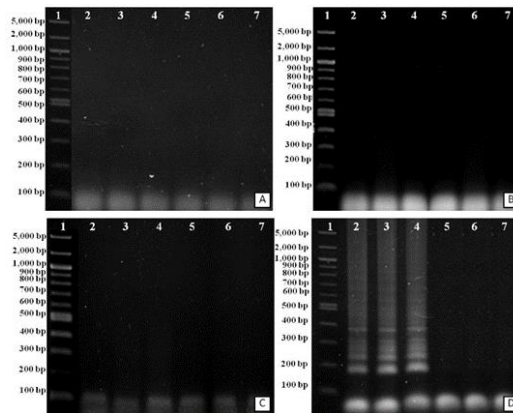


Figure 2 Validation of primer sets for RT-LAMP assay of ZYMV. Gel electrophoresis of RT-LAMP products. A)-C) Using 1st, 2nd and 3rd primer set (derived from CP gene Taiwan isolates), respectively. D) 4th Primer set (derived from CP gene ZYMV-Cu161 Thailand isolate). Lane 1: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Ontario, Canada), lane 2: positive control (ZYMV), lane 3: ZYMV-Cu161, lane 4: ZYMV-Cu162 and lane 5-7: healthy plant, PRSV and water, respectively.

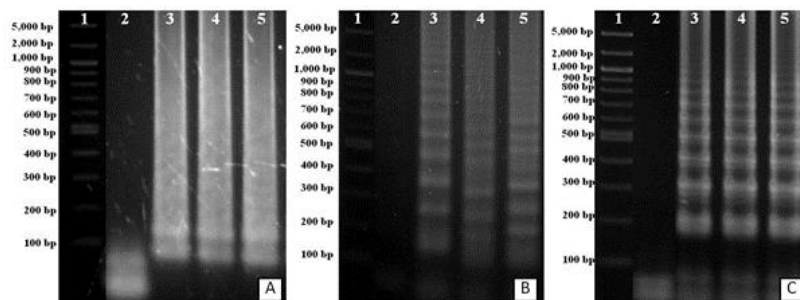


Figure 3 Optimization of RT-LAMP reaction conditions for the detection of ZYMV using CP gene-ZYMV-Cu161 primers. A) The RT-LAMP at 55°C. B) The RT-LAMP at 60°C. C) The RT-LAMP at 65°C. Lane 1: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Ontario, Canada), lane 2: dH₂O, lane 3: ZYMV-Cu161, lane 4: ZYMV-Cu162 and lane 5: positive control (ZYMV).

ทำการทดสอบความจำเพาะของเทคนิค RT-LAMP โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ CP gene ของเชื้อ ZYMV นำมาตรวจ cDNA จากตัวอย่างพืชที่ติดเชื้อ ZYMV พืชที่มีเชื้อ PRSV พืชปลอดโรคและน้ำกลั่น จากผลการทดสอบพบว่า ชุดไพรเมอร์ที่ออกแบบสามารถตรวจเชื้อ ZYMV ได้ในพืชที่เป็นตัวอย่างควบคุมบวก และไม่เกิดปฏิกิริยากับพืชที่ติดเชื้อ PRSV พืชปลอดโรคและน้ำกลั่นที่เป็นตัวอย่างควบคุมลบจากผลการวิเคราะห์ RT-LAMP product ด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบดีเอ็นเอลักษณะคล้ายขั้วบันไดในตัวอย่างที่พบเชื้อ ZYMV และพืชที่มีเชื้อ ZYMV (Figure 4A) และเมื่อเติมสาร SYBR Green I ในหลอดที่มี LAMP product จะพบการเรืองแสงสีเขียวที่สามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า (Figure 4B) โดยการตรวจสอบผลทั้ง 2 วิธีให้ผลที่สอดคล้องกัน จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อยืนยันความถูกต้องของ RT-LAMP product ของเชื้อ ZYMV ไอโซเลต Cu161 พบว่า ดีเอ็นเอที่ได้จากเทคนิค RT-LAMP มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ 91% และ 90% กับเชื้อ ZYMV สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย (AY074808.1 และ AF513552.1) ตามลำดับ โดยไม่พบความเหมือนกันกับเชื้อ PRSV ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล NCBI ดังนั้นไพรเมอร์ชุดนี้จึงมีความจำเพาะกับเชื้อ ZYMV ที่ต้องการตรวจสอบ โดยสามารถตรวจสอบโรคที่เกิดจากเชื้อ ZYMV ที่พบในประเทศไทยได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพ

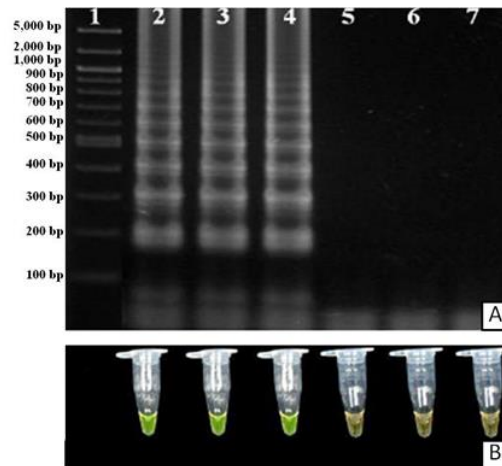


Figure 4 Specificity of RT-LAMP for ZYMV detection based on amplification of *CP* gene. A) RT-LAMP product analysis, using 1.5% agarose gel electrophoresis. B) Visual inspection by SYBR Green I. Lane 1: 100 bp DNA ladder (Fermentas, Ontario, Canada), lane 2: positive control (ZYMV), lane 3: ZYMV-12 Cu161, lane 4: ZYMV-Cu162, lane 5: water, lane 6: healthy plants and lane 7: PRSV.

การตรวจสอบความไวของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจเชื้อ ZYMV โดยใช้ดีเอ็นเอตั้งต้นที่มีความเข้มข้น 1,065 ng/ μ l แล้วนำมาเจือจางเป็น 10 เท่า การทดลองครั้งนี้พบว่าเทคนิค RT-LAMP สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่ค่าการเจือจาง 10^{-4} หรือที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอประมาณ 0.106 ng/ μ l ในเวลา 1 ชั่วโมง และสามารถตรวจสอบผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis (Figure 5A) และตรวจสอบได้ด้วยตาเปล่า หลังจากเติมสารเรืองแสง SYBR Green I (Figure 5B) โดยการตรวจสอบผลทั้ง 2 วิธี ให้ผลที่สอดคล้องกัน ส่วนวิธี RT-PCR สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ถึงค่าการเจือจางของดีเอ็นเอที่ 10^{-3} หรือที่ความเข้มข้นต่ำสุด 106 ng/ μ l ที่เวลา 2 ชั่วโมง (Figure 5C) สอดคล้องกับการรายงานของ Kuan et al. (2014) ซึ่งรายงานว่เทคนิค RT-LAMP มีความไวในการเกิดปฏิกิริยามากกว่าเทคนิค RT-PCR ถึง 10 เท่า

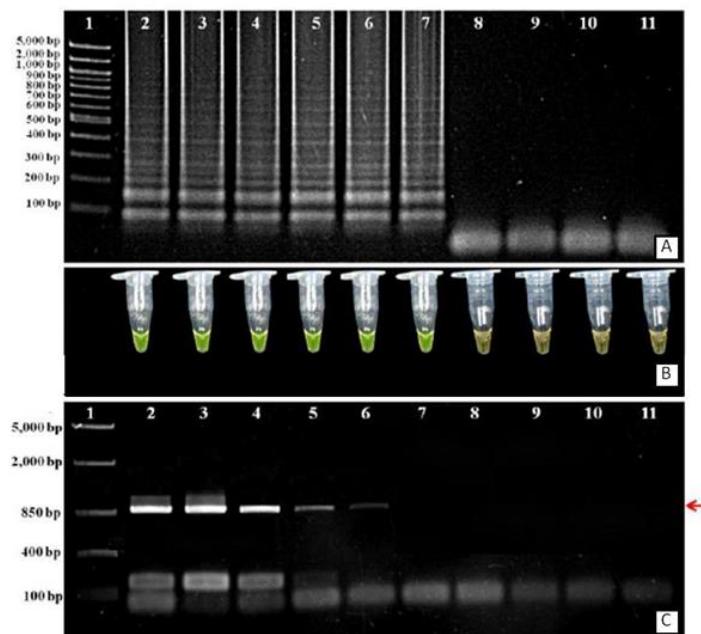


Figure 5 Sensitivity comparison of RT-LAMP and RT-PCR for the detection of ZYMV. A) RT-LAMP assay result by agarose gel electrophoresis. B) Visual inspection by SYBR Green I. C). RT-PCR assay result. Lane 1: 100 bp DNA ladder, lane 2: positive control (ZYMV), lane 3-8: 1.0, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} and 10^{-5} μ g, respectively and lane 9-11: negative control (healthy plant, PRSV and water, respectively).

สรุปผลการศึกษา

เทคนิค RT-LAMP สามารถตรวจสอบเชื้อ ZYMV ได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากลำดับนิวคลีโอไทด์ CP gene เชื้อ ZYMV ไชโยเลต Cu161 (MF124605) ที่แยกได้จากแตงโมในจังหวัดขอนแก่น และไพรเมอร์นี้ไม่สามารถตรวจเชื้อไวรัส PRSV ได้ ซึ่งเป็น *Potyvirus* ที่เข้าทำลายแตงเหมือนกัน และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการตรวจเชื้อ ZYMV ระหว่างเทคนิค RT-PCR กับ RT-LAMP โดยพบว่าเทคนิค RT-LAMP มีประสิทธิภาพในการตรวจเชื้อ ZYMV ที่มีปริมาณเชื้อไวรัสได้น้อยกว่าเทคนิค RT-PCR ถึง 10 เท่า เทคนิค RT-LAMP เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ ZYMV ได้อย่างจำเพาะและมีความไวสูง อย่างไรก็ตามเทคนิคนี้ยังจำเป็นต้องมีการพัฒนาให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในภาคสนาม หรือในแปลงปลูกของเกษตรกรเพื่อใช้ตรวจเชื้อ ZYMV ในประเทศไทยได้สะดวกและรวดเร็ว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการพัฒนาเทคนิคแลมป์ในการตรวจโรคในพืชวงศ์แตง ประจำปีงบประมาณ 2555 ที่ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย. 2559. Statistics import-export control seeds. <http://www.thasta.com/statistics.asp> (22 กรกฎาคม 2559).
- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2550. ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืช เป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 7) พ.ศ. 2550. กรมวิชาการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. <http://www.doa.go.th/ard/wp-content/uploads/2019/.pdf> (19 กรกฎาคม 2559).
- Almasi, M. A., and Dehabadi, S. H. 2013. Colorimetric immunocapture reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the *Potato virus*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 4: 1-6.
- Coutts, B. 2006. Virus diseases of cucurbit crops. <http://www.appsnet.org/publications/potm/Feb10%20POTM.pdf> (21 March 2013).
- Davis, R. F., and Mizuki, M. K. 1986. Seed transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) in *Cucurbita pepo*. In *Proceedings of the Workshop on Epidemiology of Plant Virus Diseases*. pp. 6-7. Orlando: n.p.
- Kuan, C. P., Deng, T. C., Huang, H. C., Chi, H. H., and Lu, Y. L. 2014. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Journal of Phytopathology* 162: 238-244.
- Lisa, V., Boccardo, G., Agostino, G. D., Dellavalle, G., and Aquillo, M. D. 1981. Characterization of a *Potyvirus* that causes *Zucchini yellow mosaic virus*. *Phytopathology* 1: 667-672.
- Lisa, V., and Lecoq, H. 1984. *Zucchini yellow mosaic virus*. Description of Plant Viruses. Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=282> (13 March 2016).
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita N., and Notomi, T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289: 150-154.
- Noda, C., Kittipakorn, K., Inchan, P., Wanapee, L., and Deema, N. 1993. Distribution of cucurbit viruses and reactions of some cucurbit species to certain viruses. In *Proceedings of the 31st Kasetsart University Annual Conference*. pp. 341-347. Bangkok: Ministry of University Affairs.
- Plapung, P., and Smitamana, P. 2014. Incidence of cucumber viruses in Northern Thailand. *International Journal of Agricultural Technology* 10: 167-176.
- Richard, W. R., Provvidenti, R., and Shail, J. W. 1993. Tests for seed-borne transmission of *Zucchini Yellow Mosaic Virus*. *Hort Science* 28(7): 694-696.
- Schrijnwerkers, C. C. F. M., Huijberts, N., and Bos, L. 1991. *Zucchini yellow mosaic virus*: Two outbreaks in the Netherlands and seed transmissibility. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 97: 1-7.
- Tobias, I., Szabo, K., Salanki, L., Sari, L., Kuhlmann, H. and Palkovics, L. 2008. Seedborne transmission of *Zucchini yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus* in Styrian Hulleless group of *Cucurbita pepo*. In *Cucurbitaceae 2008, Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on the genetics and breeding of Cucurbitaceae*. Pitrat, M., ed. pp. 189-197. Avignon: INRA.

วันรับบทความ (Received date) : 11 ก.ค. 60

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 24 เม.ย. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 31 ก.ค. 60