

การเพิ่มประสิทธิภาพการใช้เทคนิค Co-PCR ในการตรวจหาเชื้อ *Acidovorax citrulli*
สาเหตุโรคผลเน่าในเมล็ดแตงโม

Enhancement of a Co-PCR Technology for Detection of Bacterial Fruit
Blotch Pathogen, *Acidovorax citrulli*, in Watermelon Seed

ศุภนันท์ญา จันทร์ศรี^{1,2} กาญจนพร สว่างใจธรรม^{1,2} ธัญญาลักษณ์ ไทยแท้^{1,2} จุฑาทพ วัชรไชยคุปต์^{1,2*}
Supananya Chansri^{1,2}, Kanchanaphorn Sawangchaitham^{1,2}, Thanyaluk Thaitae^{1,2},
Jutatape Watcharachaiyakup^{1,2}

Received 29 Sept. 2022/Revised/ 8 Nov. 2022/Accepted 9 Dec. 2022

ABSTRACT

Enhancement of Co-PCR technology for the detection of *Acidovorax citrulli* (Ac) using the 521 primer set was developed in this study. The four primers comprised AC-ORF12F and AC-ORF1F4 at 0.4 μ M, and primers AC-ORF13R and AC-ORF3F3 at 0.2 μ M with the specificity of annealing temperature at 72 °C were employed. Results revealed that detection limit of the target DNA detection was 1 pg. The detection limit of this method in the 0.01% contamination seed lot was 37 colony forming unit (CFU). By comparison, the standard ISHI-Veg protocol was unable to detect Ac at the same level of contamination.

Keywords: seed certification, watermelon, cucurbit, bacterial fruit blotch

^{1/} ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

^{1/} Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

^{2/} ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม กรุงเทพฯ 10900

^{2/} Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/MHESI), Bangkok 10900

* Corresponding author: jutatape.w@ku.th

บทคัดย่อ

การตรวจหาเชื้อ *Acidovorax citrulli* (Ac) ด้วยเทคนิค Co-PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ 521 ที่พัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการศึกษานี้ ประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 เส้น ได้แก่ AC-ORF12F และ AC-ORF1F4 ที่ความเข้มข้น 0.4 μ M และไพรเมอร์ AC-ORF13R และ AC-ORF3F3 ที่ความเข้มข้น 0.2 μ M ที่อุณหภูมิ annealing 72°C. ทำให้มีความจำเพาะ และความไวในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายได้ต่ำสุด 1 pg การตรวจหาเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ พบว่า มีความไวในการตรวจเชื้อในกองเมล็ดที่อัตราปนเปื้อน 0.01% มีการปนเปื้อนเชื้อเริ่มต้น 37 colony forming unit (CFU) โดยที่อัตราการปนเปื้อนเดียวกันนี้ ตรวจหาเชื้อ Ac ไม่พบตามวิธีการมาตรฐานสากลของ ISHI-Veg

คำสำคัญ: การรับรองเมล็ดพันธุ์แดงโม, พืชตระกูลแตง, ผลเน่าแตงโม

บทนำ

เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคผลเน่าในพืชตระกูลแตง *Acidovorax citrulli* (Ac) สามารถถ่ายทอดและแพร่กระจายผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ในอัตราสูง จากรายงานของ Dutta *et al.* (2012) พบเมล็ดแตงโมที่ได้จากการปลูกเชื้อ 10 CFU จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารสามารถถ่ายทอดโรคสู่ต้นกล้าที่ปลูกในสภาพโรงเรือนอัตราสูงถึง 16.7% และเชื้อ Ac จัดเป็นศัตรูพืชกักกัน (quarantine pest) ระหว่างประเทศในพืชตระกูลแตง โดย European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) จัดเชื้อนี้อยู่ในกลุ่ม A1 ที่มีความเสี่ยงสูง (EPPO, 2021) การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อ Ac ที่มีความแม่นยำ และมีความไวในการตรวจสูง จึงเป็นวิธีการช่วยคัดกรองเมล็ดพันธุ์ที่ปลอดภัย เพื่อควบคุมป้องกันการแพร่กระจายของโรคนี้

เทคนิค Co-operational PCR (Co-PCR) พัฒนาขึ้นโดย Olmos *et al.* (2002) เป็นเทคนิคที่มีหลักการการใช้ไพรเมอร์ 3-4 เส้น โดยไพรเมอร์ คู่ที่ 1 จะสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาดใหญ่และไพรเมอร์ คู่ที่ 2 จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบในตำแหน่งด้านในของผลผลิต PCR ของคู่ที่ 1 คล้ายหลักการทำงานของเทคนิค nested-PCR ที่ไพรเมอร์คู่แรก และคู่ที่สองจะทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (Kositcharoenkul *et al.*, 2011) แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมของการจับของไพรเมอร์ (annealing temperature) ของเทคนิค Co-PCR ทุกเส้นจะเป็นอุณหภูมิเดียวกัน อยู่ภายในปฏิกิริยาหลอดเดียวกัน ซึ่งในกรณีที่ใช้ไพรเมอร์ 3 เส้น จะเป็นการใช้ไพรเมอร์เส้น forward หรือ reverse ร่วมกัน ดังนั้นในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในแต่ละรอบด้วยเทคนิค Co-PCR จะมีจำนวนผลผลิตของดีเอ็นเอเป้าหมายที่มากกว่าการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค จึงทำให้มีความไวในการตรวจหาเชื้อได้ดีกว่า ลดโอกาสการปนเปื้อนจากการเปิดปิดหลอดปฏิกิริยา และการดูดดีเอ็นเอจากหลอดปฏิกิริยาแรกไปสู่หลอดปฏิกิริยาที่สองในการทำปฏิกิริยา 2 รอบของเทคนิค nested-PCR และยังคงใช้เครื่อง PCR แบบดั้งเดิม จึงมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างต่ำกว่าเทคนิค real-time PCR (qPCR)

Korakngam *et al.* (2018) ได้พัฒนาเทคนิค Co-PCR มาใช้ตรวจหาเชื้อ Ac ในเมล็ดแตงโมด้วยชุดไพรเมอร์ Ac-ORF12F, Ac-ORF13R และ Ac-ORF21R ที่ใช้ตรวจเชื้อ Ac จากเทคนิค nested-PCR (Kim *et al.*, 2015) ซึ่งเทคนิค Co-PCR มีความจำเพาะต่อเชื้อ Ac มีประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อในเมล็ดที่มีปริมาณเชื้อได้ต่ำสุด 10^3 CFU/เมล็ด ที่อัตราการติดเชื้อ 0.05% ขนาดกองเมล็ดพันธุ์ 2,000 เมล็ด/กอง และอัตราการติดเชื้อ 0.01% (1/10,000) ที่แบ่งเป็นกองย่อย 2,000 เมล็ด/กอง และสามารถตรวจได้ 3/3 ซ้ำ (100%) การตรวจหาเชื้อ Ac โดยวิธีการมาตรฐาน

สากล พัฒนาโดย International Seed Federation Initiative Crops for Vegetable (ISHI-Veg) ใช้เทคนิค Seed extract qPCR (SE-qPCR) โดย การนำเมล็ดขนาดกองย่อยสูงสุด 5,000 เมล็ด/กอง แช่ในสารละลาย PBS อัตรา 2 มล./ก. เมล็ด ที่มีการใส่เชื้อ Ac ลงไป 3,000 เซลล์ และเขย่าเมล็ด ด้วยความเร็วรอบ 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 1-2 ชม. นำสารเขย่าเมล็ดบางส่วน (45 มล.) ไปปั่น ตกตะกอน และนำตะกอนที่ได้มาสกัดดีเอ็นเอ แล้วนำไปตรวจด้วยเทคนิค TaqMan qPCR พบว่า มีประสิทธิภาพในการตรวจได้ 100% จาก 3 ซ้ำ (ISHI-Veg, 2021)

ในการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อเพิ่ม ประสิทธิภาพของการตรวจหาเชื้อ Ac ด้วยเทคนิค Co-PCR โดยมีการพัฒนาชุดไพรเมอร์ใหม่สำหรับ เทคนิค Co-PCR ร่วมกับกระบวนการเพิ่มปริมาณ เชื้อจากน้ำกรองเมล็ดแตงโมก่อนนำไปสกัด ดีเอ็นเอและตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค Co-PCR โดยเปรียบเทียบผลการตรวจหาเชื้อ Ac กับวิธี ตรวจตามมาตรฐานสากล ISHI-Veg (2021)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรียทดสอบและการสกัดดีเอ็นเอ ของเชื้อ

แหล่งของเชื้อแบคทีเรียในการทดลองนี้ ประกอบด้วย เชื้อ Ac จำนวน 36 ไอโซเลท เชื้อไม่ก่อโรค 7 ไอโซเลท ที่แยกได้จากใบแตงโม และ เชื้อที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับเชื้อ Ac อีก 3 ไอโซเลท ได้แก่ *A. cattaleya*, *Pseudomonas* sp. และ *Burkholderia gladioli* รวมทั้งหมด 46 ไอโซเลท (Korakngam *et al.*, 2018) นำมา สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อ โดยการเลี้ยงเชื้อ Ac บนอาหาร nutrient broth (NB) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชม. และนำเชื้อแบคทีเรียมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Presto™ Mini

gDNA Bacteria Kit (Geneaid, Taiwan) ตาม วิธีการที่บริษัทแนะนำ วัดความเข้มข้นดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer Nanodrop™ 8000 (Thermo scientific, USA) และตรวจดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel ที่ละลายใน 0.5 % TBE buffer ใช้ ความต่างศักย์คงที่ 100 V. เป็นเวลา 40 นาที ย้อมด้วย สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 0.5 ไมโครกรัม/มล. และตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

2. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเทคนิค Co-PCR ให้มีความจำเพาะต่อเชื้อ Ac

ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อ เชื้อ Ac โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล NCBI Accession no. CP000512.1 ช่วงตำแหน่ง ของลำดับนิวคลีโอไทด์ 3609100-3609900 เป็นต้นแบบ และออกแบบเพิ่มเติมจากชุดไพรเมอร์ ของ Korakngam *et al.* (2018) ได้แก่ AC-ORF12F (5'-GCATCTTGTTTCAGCCACGAC-3'), AC-ORF13R (5'-ATTGGCAATCACCAAGACGC-3') ขนาด 569 bp และ AC-ORF21R (5'-TTATTCTGGGCGTCACCGTC-3') ขนาด 357 bp ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปในการ ออกแบบไพรเมอร์ Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) โดยกำหนดพารามิเตอร์ ดังนี้ ขนาดของผลิตภัณฑ์ (product size ranges) อยู่ระหว่าง 100 – 600 bp ขนาดของไพรเมอร์ (primer size) 18 – 30 คู่เบส primer Tm (melting temperature) กำหนดให้อยู่ระหว่าง 60-72 °ซ. และเบส GC อยู่ระหว่าง 45-60% เมื่อออกแบบไพรเมอร์ได้แล้วจะนำลำดับเบส ของไพรเมอร์ที่ได้ไปวิเคราะห์ความเหมือนกับ นิวคลีโอไทด์ของเชื้อ Ac ด้วยโปรแกรม BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อยืนยันความถูกต้องอีกครั้งหนึ่ง

3. การทดสอบสภาพที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาด้วยชุดไพรเมอร์

นำไพรเมอร์มาทดสอบการเข้าคู่ที่เหมาะสมของแต่ละชุดไพรเมอร์ โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยา PCR ได้แก่ 1x Phire plant direct PCR master mix (Thermo Scientific, USA), ทดสอบหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมดังแสดงใน Table 1 และดีเอ็นเอต้นแบบ 1 นาโนกรัม ปริมาตรรวมเป็น 10 ไมโครลิตร/ปฏิกิริยาทำปฏิกิริยา

ด้วยโปรแกรมการทำปฏิกิริยาดังนี้ ใช้อุณหภูมิ 98°ซ. เป็นเวลา 5 นาที ในการเริ่มปฏิกิริยา ตามด้วยขั้นตอน Denaturing ที่ 98°ซ. เป็นเวลา 10 วินาที annealing 64°ซ. เป็นเวลา 15 วินาที และ extension ที่ 72°ซ. เป็นเวลา 15 วินาที ทำซ้ำจากขั้น Denaturing จนถึงขั้น extension จำนวน 35 รอบ และ final extension ที่ 72°ซ. เป็นเวลา 2 นาที ตรวจสอบผลผลิต Co-PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1

Table 1 Concentration of each primer used in each treatment

Treatment	Concentration (μM)			
	AC-ORF12F	AC-ORF13R	AC-ORF3F3	AC-ORF1F4
1	0.4	0.2	0.2	0.4
2	0.4	0.2	0.2	0.3
3	0.4	0.2	0.2	0.2
4	0.3	0.2	0.2	0.4
5	0.3	0.2	0.2	0.3
6	0.3	0.2	0.2	0.2
7	0.4	0.2	0.2	-
8	0.4	0.2	0.3	-

4. ทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมของชุดไพรเมอร์

ทดสอบหาอุณหภูมิขั้นตอน annealing ที่เหมาะสมของชุดไพรเมอร์ ทำปฏิกิริยา Co-PCR โดยมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา และโปรแกรมการทำปฏิกิริยาตามวิธีการในข้อ 3 ทดสอบอุณหภูมิขั้นตอน annealing ในช่วง 64 -75°ซ. ตรวจสอบผลผลิต Co-PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1

ใช้องค์ประกอบปฏิกิริยาที่เหมาะสมจากข้อ 3 และ 4 และตรวจสอบผลผลิต Co-PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 1

5. ทดสอบความจำเพาะของชุดไพรเมอร์ต่อเชื้อ Ac

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 1 มาทดสอบการตรวจหาเชื้อ Ac ด้วยชุดไพรเมอร์

6. การเตรียมเมล็ดติดเชื้อ

ปลูกเชื้อแบคทีเรีย Ac ลงในเมล็ด โดยการตัดปลายเมล็ดแดงมัดด้านป้านเล็กน้อยฉีดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียเข้าไปในเมล็ดแต่ละเมล็ดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตร 2 ไมโครลิตร/เมล็ด และตากเมล็ดให้แห้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที โดยการตรวจสอบความไวในการตรวจหาเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์ใช้ความเข้มข้นเชื้อ 10⁴-10⁵ หน่วยโคโลนี/มล. ในปริมาตร 2 ไมโครลิตร/เมล็ด

นำเมล็ดปลอดเชื้อจำนวน 10,000 เมล็ด/กองเมล็ด เติมเมล็ดที่ปลูกเชื้อที่ความเข้มข้นต่างๆกัน จำนวน 1 เมล็ด คิดเป็นอัตราติดเชื้อ 0.01% (1/10,000 เมล็ด) ต่อซ้ำ แบ่งเมล็ดเป็นกองย่อย (sub-sample) จำนวน 5 กองย่อย ๆ ละ 2,000 เมล็ด สำหรับทดสอบด้วยวิธีการ Co-PCR (Korakngam *et al.*, 2018) และ 2 กองย่อย ๆ ละ 5,000 เมล็ด สำหรับทดสอบด้วยเทคนิค TaqMan qPCR (ISHI-Veg, 2021) ทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น

7. ทดสอบความไวของการตรวจหาเชื้อ Ac ในเมล็ดด้วยเทคนิค Co-PCR

ตรวจสอบเมล็ดแดงโมปลอดเชื้อดัดแปลงวิธีการของ Korakngam *et al.* (2018) โดยเมล็ดแดงโมได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท เอชเอ็ม.โคลส (ประเทศไทย) จำกัด ใช้เมล็ดแดงโมทดสอบ (sampling size) จำนวน 10,000 เมล็ด แบ่งเมล็ดเป็น 5 กองย่อย ๆ ละ 2,000 เมล็ด นำตัวอย่างเมล็ดที่ติดเชื้อไปแช่ในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 150 มล. ที่มี benomyl 1.5 มก./มล. และ ampicillin 15 ไมโครกรัม/มล. ดัดแปลงวิธีการในขั้นตอนนี้โดยการแช่เมล็ดในสภาพสุญญากาศ เป็นเวลา 10 นาที แทนวิธีการเดิมที่แช่เมล็ดที่ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นกรองเมล็ดออกและนำน้ำกรองเมล็ดไปเขย่าต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 - 8 ชม. เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ กรองน้ำเขย่าเมล็ดผ่านกระดาษกรอง (Whatman™#1, USA) ที่มีขนาดรูกรอง 11 ไมโครเมตร นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบ/นาที เวลา 20 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง Refrigerated high speed centrifuge model 7930 (Kubota Co., Japan) เทส่วนใสทิ้ง นำตะกอนไปสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Presto™ Mini gDNA

Bacteria Kit (Geneaid, Taiwan) ตามวิธีการที่บริษัทแนะนำ วัดความเข้มข้นด้วยเครื่อง spectrophotometer Nanodrop™ 8000 (Thermo scientific, USA) และนำไปทดสอบด้วยปฏิกิริยา Co-PCR

ชุดควบคุมการทดลองประกอบด้วย

- 1). เมล็ดปลอดเชื้อ 2,000 เมล็ด + 1 เมล็ดที่ฉีดเชื้อ Ac ที่มีค่า O.D. = 0.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
- 2). เมล็ดปลอดเชื้อ 2,000 เมล็ด + เซลล์แขวนลอยเชื้อ Ac ที่มีค่า O.D. = 0.2 ปริมาตร 1 มล.
- 3). เมล็ดปลอดเชื้อ 2,000 เมล็ด + 1 เมล็ดที่ฉีดเชื้อ *A. cattleyae* ที่มีค่า O.D. = 0.2 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร
- 4). เมล็ดปลอดเชื้อ 2,000 เมล็ด + เซลล์แขวนลอยของเชื้อ *A. cattleyae* ที่มีค่า O.D. = 0.2 ปริมาตร 1 มล.

ตรวจสอบหาเชื้อ Ac ในกองเมล็ดพันธุ์ทดสอบ โดยการสกัดดีเอ็นเอจากกองเมล็ดพันธุ์ตามวิธีการข้างต้น และตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค Co-PCR ด้วยคูโพรเมอร์และสภาพที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาที่พัฒนาขึ้นในการศึกษานี้ และใช้การทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคูโพรเมอร์สำหรับส่วน 16S rDNA Fd2/rP1 (Weisburg *et al.*, 1991) เป็นชุดควบคุมภายใน เปรียบเทียบกับชุดโพรเมอร์ 53 ตามวิธีการ Korakngam *et al.* (2018)

8. การตรวจหาเชื้อ Ac ด้วยวิธีตามมาตรฐานสากล

ตัวอย่างทดสอบเป็นตัวอย่างเมล็ดแดงโมที่ได้จากการปลูกเชื้อจากข้อ 6 โดยแบ่งกองเมล็ดตรวจออกเป็น 2 กองย่อย ๆ ละ 5,000 เมล็ด การเตรียมเมล็ด การสกัดดีเอ็นเอจากเมล็ด และการทำปฏิกิริยา real-time PCR โดยการนำเมล็ดแต่ละกองย่อยแช่ในสารละลาย PBS อัตรา 2 มล./เมล็ด 1 ก. บ่มเมล็ดโดยการเขย่าเมล็ดอัตรา

150 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 ชม. นำส่วนสารละลาย แซ่เมล็ดปริมาณ 45 มล. ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 1,000 g เป็นเวลา 5 นาที และย้ายสารละลาย ลงไปในขวดใหม่และปั่นเหวี่ยงที่ 3,200 g เป็น เวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอด้วย ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Macherey-Nagel Nucleospin® Plant II ด้วยการเติมสารละลาย PL1 ที่เติม proteinase K 0.8 มก./มล. บ่มที่อุณหภูมิ ห้องเป็นเวลา 3 ชม. ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g เป็น เวลา 5 นาที ย้ายส่วนใสไปใส่ใน DNA binding column ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 g เป็นเวลา 1 นาที และล้าง column ด้วยสารละลาย PW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง และปั่นเหวี่ยง DNA binding column ให้แห้ง และละลาย ดีเอ็นเอ ด้วยสารละลาย PE ที่บ่มที่อุณหภูมิ 70°C. ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำปฏิกิริยา single-plex TaqMan qPCR ด้วยชุดไพรเมอร์และโพรบ สำหรับ Contig 21 และ Contig 22 สำหรับตรวจ หาเชื้อ Ac องค์ประกอบของปฏิกิริยา และรอบการ ทำปฏิกิริยาตามวิธีการของ ISHI-Veg (2021) ด้วย ชุด Multiplex qPCR ToughMix (Quantabio, USA) ด้วยเครื่อง Real-time Model PCRCFX-96™, C1000 Touch™ (Biorad, USA)

ชุดปฏิกิริยาคอมประกอบด้วย ปฏิกิริยา ที่ใช้น้ำแทนดีเอ็นเอในปฏิกิริยา (NTC), ปฏิกิริยาที่ เติมดีเอ็นเอของเชื้อ Ac (10 pg) (PAC), ปฏิกิริยา ที่เติมดีเอ็นเอของเชื้อ *A. cattleyae* (10 pg) (IAC), ปฏิกิริยาที่มีดีเอ็นเอสกัดจากเมล็ดไม่มีเชื้อ Ac (NPC), ปฏิกิริยาที่สกัดจากเมล็ดที่ปลูกเชื้อ Ac ที่มีค่า O.D.600 = 0.1 เจือจาง 1,000 เท่า ปริมาตร 4 มล./1,000 มล. extraction buffer (คาดว่า มี ปริมาณเซลล์แบคทีเรียประมาณ 12,000 เซลล์) (PEC), ปฏิกิริยาที่สกัดจากเมล็ดที่ปลูกเชื้อ *A. cattleyae* ที่มีค่า O.D. 600 = 0.1 เจือจาง 50 เท่า

ปริมาณ 200 ไมโครลิตร/1,000 มล. extraction buffer (PPC)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การออกแบบไพรเมอร์ Co-PCR และการ หาสภาพที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา

จากการออกแบบไพรเมอร์ โดยใช้ร่วมกับ ไพรเมอร์บางส่วนจากชุดไพรเมอร์ของ Korakngam *et al.* (2018) ประกอบด้วยชุดไพรเมอร์ 52 ได้แก่ AC-ORF12F, AC-ORF13R และ AC-ORF3F3 ให้ผลผลิต Co-PCR ขนาด 569 และ 256 bp และ 521 ประกอบด้วยไพรเมอร์ AC-ORF12F, AC-ORF13R AC-ORF3F3 และ AC-ORF1F4 ให้ผลผลิต Co-PCR ขนาด 569, 256 bp และ 137 bp โดยมีตำแหน่งของไพรเมอร์ดังแสดงใน Figure 1 และรายละเอียดดังใน Table 2

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ แต่ละไพรเมอร์ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความเหมือนของ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ Ac ที่ค่า max score 42.1 ค่า total score 42.1 ค่า E value 0.18 ค่า percent identity 100% ในทั้งสองไพรเมอร์ ที่ออกแบบเพิ่มในการศึกษานี้

2. สภาพที่เหมาะสมของการทำปฏิกิริยาด้วยชุด ไพรเมอร์

การหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสม ในการเกิดปฏิกิริยา พบว่า สำหรับชุดไพรเมอร์ 521 ในทริตเมนต์ที่ไพรเมอร์ forward (AC-ORF12F) ความเข้มข้น 0.4 μ M (ทริตเมนต์ 1 2 และ 3) ให้ผลการเกิดปฏิกิริยาดีกว่าเมื่อเปรียบ เทียบกับทริตเมนต์ที่ความเข้มข้นไพรเมอร์เป็น 0.3 μ M (ทริตเมนต์ 4 5 และ 6) และจากการ เปรียบเทียบในทุกทริตเมนต์ พบว่า ทริตเมนต์ ที่ 1 ที่มีความเข้มข้นของไพรเมอร์ AC-ORF12F

>CP000512.1:3609000-3609999 *Acidovorax citrulli* AAC00-1, complete genome

TCGAAAATACCATCAGAGCCATCCTGGCAAATACCTCCTTTGGCAAGTATTGGACAGGCACCTTCAGCCCAATG
AC-ORF13R--->

CGTCTCAGCCTTGGGTGGGACCCGGCCGACAAAGTGCCAAACGATGTATTGGCAATCACCAGACGCTGAATGCCA
 TTGGAATTGCGGGGATAACAAGCTACGTCAAAAACACGGCTAGCGGCTCGTATATTATTATCAAAGGATATGCTG
 CTCACCGCAGTGGTGCATTGACTGGGACAAGATACCTTGCCACCAATCCCTTGATGTTGAAATTTGGCCTTGGAG
Ac-ORF21R --->

TTCAAAGCCTGAAGGGCATTGCAATCGGCGGCTTTATTCTGGGCGTCACCGTCTCGACCGGAATCGAGGTCATGG
AC-ORF3F3 --->

ATTTCAATTTTCAATAATGAAAAGACAATGTATGATCTCGTAGGAGGCATCGGGGTCGAGGCTGTCAAGGGAGGAT
TAGGTGGGCTTGTGGCTTATGGTATGGGTGTTGCCGTTGGCAGCTTCACGGCAGTGGCGGTAGCACCACCTGTCA
AC-ORF1F4--->

CCATGGCATTTTTGCATTCTGGTCCGGCGCAGGCTTGAATTATGCTGATGAACAATACCAATAAAATCAAGAG
 TCATATCAGCATTAAAATCCTTGCCAGAAAACACGAAACAGGGCTTATACAGAATAAATGAGAATCCGAGTCGT
 <-----**Ac-ORF12F**

GGCTGAACAAGATGCAAAAGTCGCGTGCAAAGCAGCGCCGAAAGACAGGTCAGAGTTGGCGGATTTGGCTCTGCC
 CCATATGTAGGAGATACTAATGCCCCGAACATATTGATCGACAGGAATTGCTGAAAATCCGGAAGGCAATGGTCA
 TTGGACTCCCTTCGATAGTTTTTGTGATTTTTCTCTGTGCTTTTTTGTGTTTGGCGGAAGTTTCAGATCGATAA
 ACGATCTACTGAATGACTCTCCTGTGTCAGAATCTCTGTAGCTGGATCTCCGTTTTTTTTTGCACCTCCATTGG
 CTTTGATCATGCTTGTGCTTGCCG

Figure 1 Position of primer (the character with bold and underline) in DNA of *Acidovorax citrulli* accession no. CP000512.1 at the position of 3609100-3609900, primer name is above the primer position, primer type with --> is a forward primer and with <-- is reverse primer. The yellow highlight primers were designed in this study

Table 2 List of primer name, type of primer and primer sequences

Primer name	Type of primer	Primer sequence (5'-3')	Source
AC-ORF12F	forward	GCATCTTGTTCCAGCCACGAC-3'	Korakngam <i>et al.</i> (2018), Kim <i>et al.</i> , (2015)
AC-ORF13R	reverse	ATTGGCAATCACCAGACGC	
AC-ORF21R	reverse	TTATTCTGGGCGTCACCGTC	
AC-ORF3F3	reverse	GCTGTCAAGGGAGGATTAGGT	This study
AC-ORF1F4	reverse	CGCAGGCTTGAATTATGCTGA	This study

และ AC-ORF1F4 เป็น 0.4 μ M และไพรเมอร์ AC-ORF13R AC-ORF3F3 มีความเข้มข้นของไพรเมอร์ เป็น 0.2 μ M ให้แถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งสามแถบชัดเจนที่สุด และทริตเมนต์ที่ 2 เป็นลำดับรองลงมา และชุดไพรเมอร์ 52 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ AC-ORF12F AC-ORF13R และ AC-ORF3F3 เป็น 0.4 0.2 และ 0.3 ตามลำดับ ให้ประสิทธิภาพผล Co-PCR ดีที่สุดของชุดไพรเมอร์นี้ อย่างไรก็ตาม พบว่า ในปฏิกิริยาควบคุมที่ไม่เติมดีเอ็นเอต้นแบบของทั้งสองชุดไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดเดียวกับแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ขนาด 256 bp และ 137 bp เช่นกัน ได้แก่ ทริตเมนต์ที่ 2 3 และ 5 (Figure 2)

และจากการทดสอบซ้ำ ของทั้งสองชุดไพรเมอร์ พบว่า พบชุดปฏิกิริยาควบคุมลบที่ไม่เติมดีเอ็นเอต้นแบบให้ผลบวกปลอม (false positive) แบบมีความไม่สม่ำเสมอ (ไม่ได้แสดงผล) จึงได้นำไปทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาต่อไป

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมของชุดไพรเมอร์

การทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยไม่ทำให้เกิดผลบวกปลอมในปฏิกิริยาที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ (no template control) โดยการปรับอุณหภูมิขั้นตอน annealing พบว่า ไม่พบแถบดีเอ็นเอของผลบวกปลอม เมื่อ

มีอุณหภูมิ annealing ตั้งแต่ 72°C. ขึ้นไปสำหรับ ชุดไพรเมอร์ 521 และ 73°C. ขึ้นไป สำหรับชุดไพรเมอร์ 52 อย่างไรก็ตามพบว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการเกิดปฏิกิริยาก็ลดลงเช่นกัน แสดงให้เห็นจากแถบดีเอ็นเอเป้าหมายที่จางลงของชุดไพรเมอร์ 521 ที่อุณหภูมิ 74°C. และ 75°C. และชุดไพรเมอร์ 52 ที่อุณหภูมิ 75°C. (Figure 3) ซึ่งในการทดสอบนี้จะใช้อุณหภูมิ 72°C. สำหรับไพรเมอร์ชุด 521 และ 73°C. สำหรับชุดไพรเมอร์ 52 ไปใช้ในการทดสอบต่อไป

4. ความไวของชุดไพรเมอร์

ความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบดีเอ็นเอของชุดไพรเมอร์ 52 และ 521 เปรียบเทียบกับชุดไพรเมอร์ 53 ของ Korakngam *et al.* (2018) พบว่า ไพรเมอร์ชุด 521 มีความไวในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อ *Ac* มากที่สุด สามารถตรวจดีเอ็นเอของเชื้อได้ต่ำสุดที่ 1 pg ในขณะที่ความไวของการตรวจด้วยชุดไพรเมอร์ 52 และ 53

ที่ระดับ 10 pg แต่พบว่า ชุดไพรเมอร์ 52 มีความเข้มของแถบดีเอ็นเอมากกว่า (Figure 4) จากผลการทดลองนี้จึงได้นำชุดไพรเมอร์ 521 ไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

5. ความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ต่อเชื้อ *Ac* ด้วยชุดไพรเมอร์ 521

เมื่อทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ชุด 521 โดยการทำปฏิกิริยา Co-PCR พบว่าให้ผลเป็นบวกที่สามารถสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอทั้งสามขนาด ได้แก่ 137 bp และหรือขนาด 256 bp และ 569 bp กับเชื้อแบคทีเรีย *Ac* ทั้ง 36 ไอโซเลท และให้ผลเป็นลบ ซึ่งไม่พบแถบดีเอ็นเอที่ตำแหน่งดังกล่าวกับเชื้อแบคทีเรียใกล้เคียง *A. cattleyae*, *Pseudomonas* sp. และ *Burkholderia gladioli* และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียไม่ก่อโรค 7 ไอโซเลท โดยดีเอ็นเอทดสอบทุกตัวอย่างสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 1,500 bp ของส่วน 16S rDNA จากการ

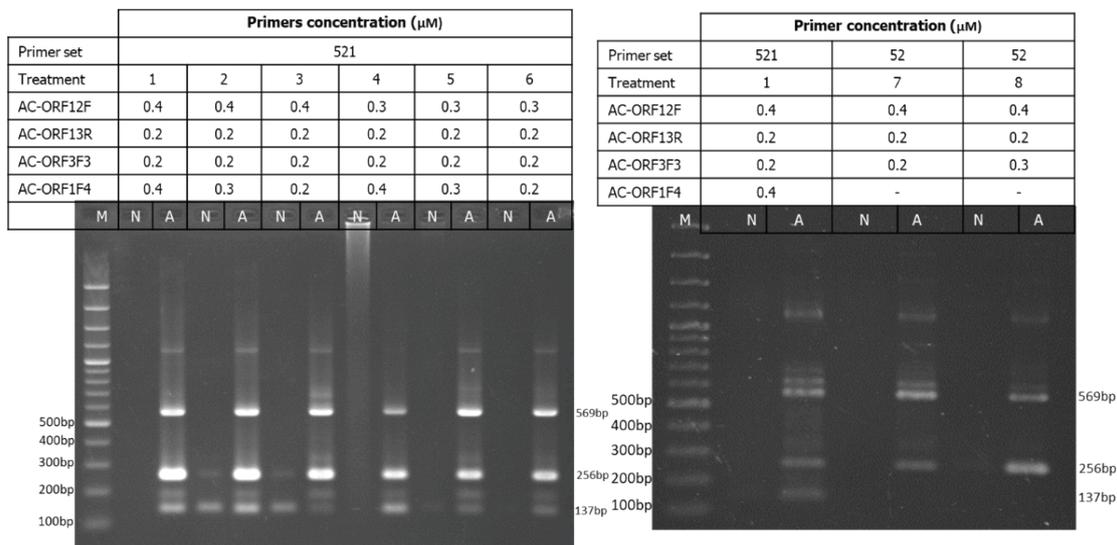


Figure 2 Co-PCR optimization of primer concentration variation results of primer set 521 and 52 amplified with DNA of *Acidovorax citrulli*. Treatments 1-8 are set of primer concentration variations related to Table 1, M = DNA Marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA), N = no template control A = DNA of *Acidovorax citrulli*

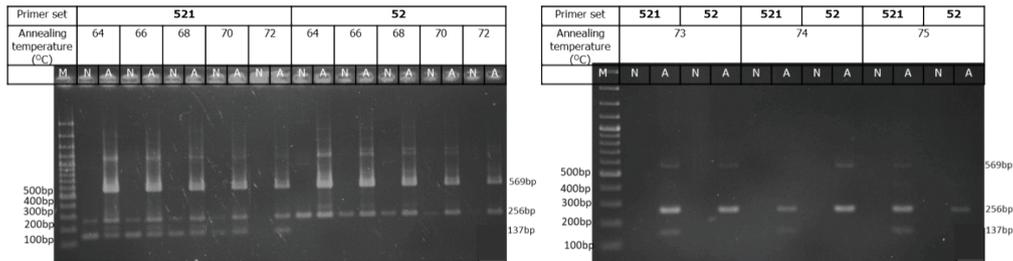


Figure 3 Co-PCR optimization of annealing temperature results of primer sets 521 and 52 amplified with DNA of *Acidovorax citrulli* with various annealing temperature from 64 °C to 75 °C. M = DNA Marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA), N = no template control A = DNA of *Acidovorax citrulli*

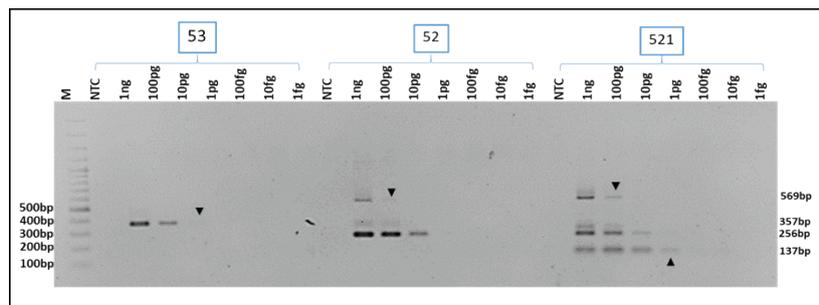


Figure 4 Co-PCR Sensitivity results of primer sets 53, 52 and 521 amplified with DNA of *Acidovorax citrulli* with various amounts of DNA from 1 ng – 1 fg. M = DNA Marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA), NTC = no template control, black triangle is indicated faint DNA band

ทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเป็นชุดควบคุมปฏิกิริยา ภายใน (Figure 5) แสดงว่าชุดไพรเมอร์ 521 มีความจำเพาะต่อเชื้อ Ac

6. ผลการทดสอบหาเชื้อ Ac ในกองเมล็ดพันธุ์ และเปรียบเทียบความไวของการตรวจเปรียบเทียบชุดไพรเมอร์ 53

การทดสอบความปลอดเชื้อ Ac ในเมล็ด ก่อนนำมาทำการทดลอง ด้วยการตรวจหาเชื้อตามวิธีการของ Korakngam *et al.* (2018) พบว่า เมล็ดที่นำมาใช้ไม่พบเชื้อ Ac (ไม่ได้แสดงผล) และเมื่อนำการตรวจสอบการหาเชื้อในกองเมล็ด พบว่า ที่อัตราการติดเชื้อในเมล็ด 0.01% (1/10,000 เมล็ด) ปลูกเชื้อที่ความเข้มข้น 1.87×10^5 หน่วยโคโลนี/มล.

และ 1.87×10^4 CFU/มล. มีปริมาณเชื้อ เมื่อฉีดเชื้อเข้าในเมล็ด 2 ไมโครลิตร เท่ากับ 374 และ 37 หน่วยโคโลนี/กองเมล็ด ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบต่อส่วน 16S rDNA พบว่า ให้ผลเป็นบวกในทุก ตัวอย่าง ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 1,500 bp ทั้งสองความเข้มข้นทดสอบ (Figure 6 C, F) และที่การปนเปื้อนเชื้อ 374 หน่วยโคโลนี/กองเมล็ด ให้ผลเป็นบวกเมื่อทดสอบกับทั้งสองชุดไพรเมอร์ 521 และ 53 ในตัวอย่างทั้ง 3 ซ้ำ โดยพบเป็นแถบ ดีเอ็นเอขนาด 137 bp (Figure 6B) และ 357 bp (Figure 6C) ในขณะที่ปริมาณเชื้อที่ติดเมล็ดลดลง เป็น 37 หน่วยโคโลนี/กองเมล็ด ในอัตราติดเมล็ดที่ 0.01% เท่าเดิม พบว่า ให้ผลบวกเฉพาะเมื่อทดสอบกับ ไพรเมอร์ชุด 521 (Figure 6D และ E) แสดงให้

เห็นว่า ชุดไพรเมอร์ 521 มีความไวในการตรวจเชื้อได้มากกว่าชุดไพรเมอร์ 53 ซึ่งโดยหลักการชุดไพรเมอร์ 521 มีไพรเมอร์ forward 1 เส้น แต่มีไพรเมอร์ reverse 3 เส้น ส่งผลให้การเกิดผลผลิต PCR ในแต่ละรอบมากกว่าชุดไพรเมอร์ 53 ที่มีไพรเมอร์ reverse 2 เส้น จึงส่งผลกระทบโดยตรงต่อความไวของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้น และในการทดสอบนี้มีขั้นตอนในการเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียจากขั้นตอนการแช่เมล็ดและเขย่าน้ำกรองเมล็ดเป็นเวลา 5 – 8 ชม. ก่อนที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ ทำให้ความไวในการตรวจหาเชื้อจากเมล็ดมีมากขึ้น

7. การตรวจหาเชื้อ Ac ด้วยเทคนิค TaqMan qPCR ตามวิธีการของ ISHI-Veg (2021)

จากการทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามวิธีการของ ISHI-Veg (2021) ด้วยชุดไพรเมอร์สำหรับ contig 21 และ Contig 22 โดยในชุด

ควบคุมตัวอย่างที่มีการเติมดีเอ็นเอ ของเชื้อ Ac (PAC) พบว่า ชุดไพรเมอร์ทั้งสองชุดสามารถตรวจหาเชื้อ Ac ได้ แต่ความไวในการตรวจแตกต่างกัน พบว่า ชุดไพรเมอร์ Contig 21 ตรวจได้ที่ค่า Ct 28.81 ในขณะที่ไพรเมอร์ Contig 22 ตรวจได้ที่ค่า Ct 35.18 ในการทดสอบนี้ตัวอย่างควบคุมเมล็ดที่ผสมกับเซลล์แขวนลอยเชื้อ Ac (PPC) ไม่สามารถตรวจหาเชื้อได้ และตัวอย่างเมล็ดทดสอบที่ความเข้มข้นเดียวกับการตรวจหาด้วยเทคนิค Co-PCR พบว่า ไม่สามารถตรวจหาเชื้อได้ในทุกความเข้มข้นทั้ง 3 ซ้ำ (Figure 7)

จากการทดสอบการตรวจหาเชื้อ Ac ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน พบว่า เทคนิค Co-PCR ด้วยไพรเมอร์ชุด 521 ที่พัฒนาขึ้นในการทดลองนี้มีประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาเชื้อได้ดีที่สุด (Table 3) ซึ่งประสิทธิภาพที่ด้อยกว่า เนื่องจากปัจจัยขนาดของเมล็ดที่ใช้เมล็ดมากกว่าที่ 5,000 เมล็ด/กองย่อย การแช่เมล็ดแต่ไม่มีการ

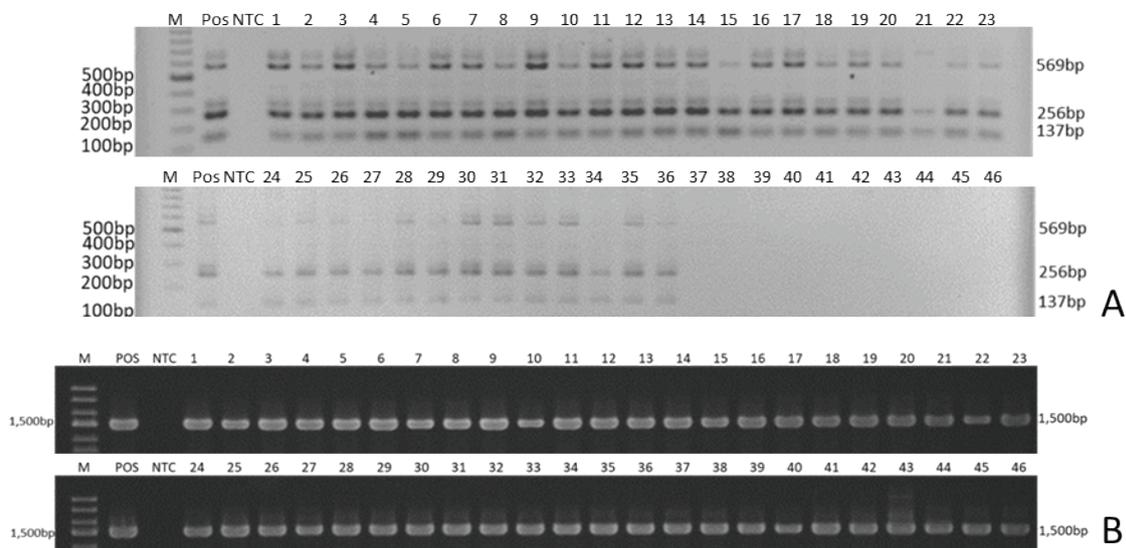


Figure 5 Specificity test of primer set 521 for Co-PCR amplified DNA of *Acidovorax citrulli* (Ac) (1-36) and related species *A. cattleyae* (37) *Burkholderia gladioli* (38) *Pseudomonas* sp. (39) and non-pathogenic bacteria isolated from watermelon leave (40-46) showing Co-PCR product size 137 bp and/or 256 and /or 569 bp (A) and PCR amplified of 16S rDNA with primer fd1 and rd2 as an internal control showing PCR product size 1500 bp (B). M = DNA Marker GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, USA), Pos = DNA of Ac and NTC = no template control

เลี้ยงเพิ่มปริมาณเชื้อ นำตัวแทนของสารแช่เมล็ด สกัดเพียง 45 มล. จากสารแช่เมล็ดทั้งหมด 1,000 มล. ทำให้เชื้อที่มีอยู่ไม่ได้นำมาใช้ตรวจทั้งหมด นอกจากนี้ วิธีการมาตรฐานสากล ISHI-Veg ตรวจหาเชื้อ Ac ไม่พบในชุดควบคุมบวกที่เติมเชื้อลงใน กองเมล็ด (PEC) ปริมาณเซลล์ทั้งหมดประมาณ 12,000 เซลล์/กองย่อย ในปริมาตรสารแช่เมล็ด ทั้งหมด 1,000 มล. เมื่อสุ่มสารแช่เมล็ดมาเพียง 45 มล. คาดว่าจะได้เซลล์มาเพียง 550 เซลล์

ซึ่งมีปริมาณเพียงพอในการตรวจหาด้วยเทคนิค Realtime PCR ได้ ซึ่งขัดแย้งกับผลที่ไม่สามารถ ตรวจเชื้อได้ แสดงให้เห็นว่า อาจมีการสูญเสียเชื้อที่เติมลงไปในการกองเมล็ดพันธุ์ในระหว่าง กระบวนการแยกเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ หรือกองเมล็ด พันธุ์ขนาดใหญ่จะส่งผลให้มีสารยับยั้งปฏิกิริยา PCR จากเมล็ดที่เพิ่มมากขึ้น ในแต่ละชุดปฏิกิริยา ที่ตรวจ

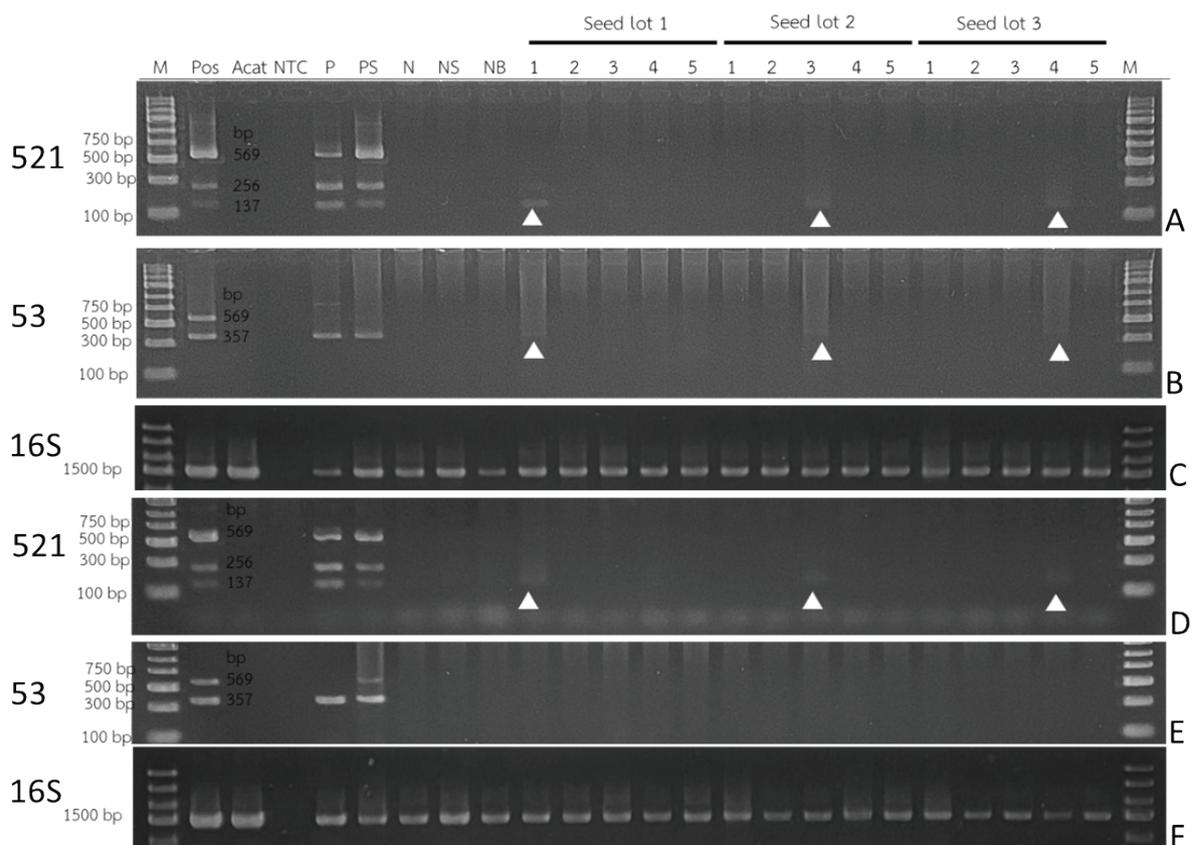
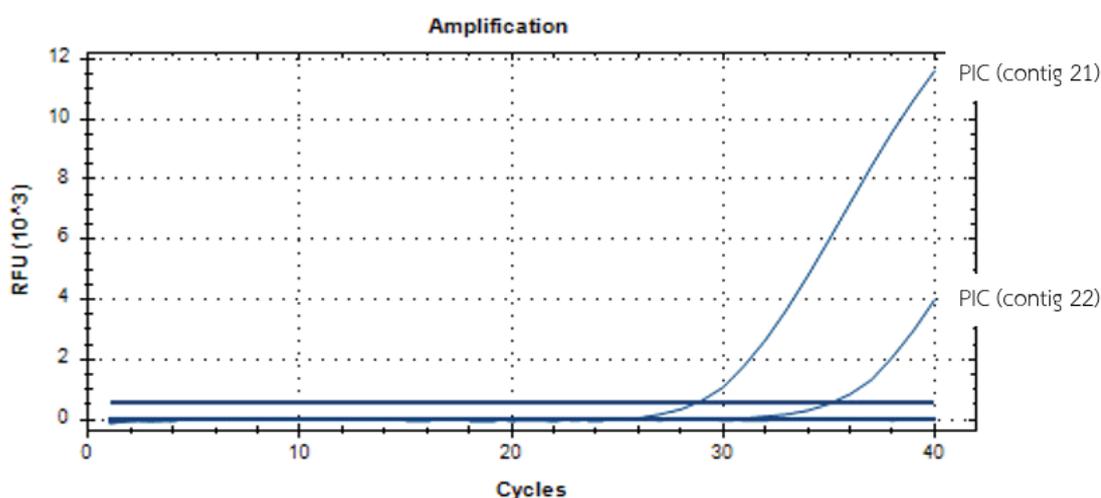


Figure 6 Sensitivity test of *Acidovorax citrulli* (Ac) detection in 0.01% (1/10,000 seed) contaminated seed with 100 (A, B) and 10 (D, E) CFU/seed lot by Co-PCR with 521 primers set (569, 256, 137 bp) (A, D) comparing with 53 primers set (569, 357 bp) (B, E) and PCR amplified of 16S rDNA as an internal control (1500 bp) (A, D), M = O'GeneRuler Express DNA Ladder (Thermo Scientific, USA), Pos = DNA of Ac, Neg = DNA of *A. cattleyae* (A.cat), NTC = no template control, P = 2,000 healthy watermelon seed + Ac cell suspension 1 ml, PS = 2,000 healthy watermelon seed + 1 Ac infected seed, N = 2,000 healthy watermelon seed + A.cat cell suspension 1 ml, NS = 2,000 healthy watermelon seed + 1 A.cat infected seed, NB = 2,000 healthy watermelon seed, 1-5 = subsample of tested seed lot. The white triangle indicated the target band

Table 3 Sensitivity of *Acidovorax citrulli* detection in watermelon seed with different methods

Techniques/primer set	Ac contaminated in 0.01% infection seed lot		Reference
	374 CFU/seed lot	37 CFU/seed lot	
Co-PCR/53	+	-	Korakngam <i>et al.</i> , 2018
Co-PCR/521	+	+	This study
TaqMan qPCR/contig 21	-	-	ISHI-Veg, 2021
TaqMan qPCR/contig 22	-	-	ISHI-Veg, 2021

Note: + = positive result, - = negative results

**Figure 7** TaqMan qPCR amplification results with contig 21 and contig 22 primer sets

จากรายงานของ Öztürk and Basim (2022) ตรวจเชื้อ Ac ด้วยเทคนิค real-time PCR ด้วย locked nucleic acid probe มีความไวในการตรวจเชื้อจากเมล็ดที่ปลูกเชื้อแบคทีเรียในกองเมล็ดพันธุ์ ขนาด 100 เมล็ด และเพิ่มปริมาณเซลล์จากตะกอนเขย่าเมล็ดในภายหลัง พบว่า สามารถตรวจเชื้อแบคทีเรียได้ต่ำสุด 8×10^6 CFU สำหรับ hrpB2 primer-probe set และ 5×10^6 CFU สำหรับ ITS primer-probe set และรายงานของ Lu *et al.* (2020) ตรวจเชื้อ Ac ในเมล็ดแตงโมด้วยเทคนิค droplet digital PCR ที่มีการติดเชื้อ 2.6×10^5 CFU ในเมล็ดที่มีอัตราติดเชื้อต่าง ๆ พบว่า ที่อัตราติดเชื้อ 1/500 เมล็ด สามารถตรวจเชื้อได้ 4 ใน 5 ซ้ำ และที่อัตราติดเชื้อ 1/1,000 เมล็ด ตรวจได้ 2 ใน 5 ซ้ำ จากสารละลายตะกอนเขย่าเมล็ด ซึ่งเปรียบเทียบวิธีการ real-time PCR

และวิธี droplet digital PCR ในการตรวจหาเชื้อ Ac จากเซลล์ดีเอ็นเอของเชื้อ และเมล็ดติดเชื้อที่มีความไวสูงกว่าวิธีการ PCR (Lu *et al.*, 2020) อย่างไรก็ตามเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจด้วยวิธีการ real-time PCR และ droplet digital PCR มีราคาสูงกว่าเครื่อง PCR และจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า วิธีการ Co-PCR มีประสิทธิภาพความไว ความจำเพาะสูง ค่าใช้จ่ายของสารเคมี และเครื่องมือต่ำกว่า ส่งผลให้มีค่าใช้จ่ายในการตรวจต่อตัวอย่างที่ต่ำกว่า

วิธีการสกัดเชื้อจากเมล็ดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความสำเร็จในการตรวจหาเชื้อจากเมล็ดจากรายงานของ Giovanardi *et al.* (2018) ได้นำเมล็ดแตงโมที่ติดเชื้อในคัพพะจากการติดเชื้อในธรรมชาติ และนำมาฆ่าเชื้อที่ผิวภายนอก เพื่อใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจหาเชื้อ Ac

ด้วยวิธีการสกัดเชื้อออกจากเมล็ดโดยการบดเมล็ด และแช่เมล็ด พบว่า วิธีการแช่เมล็ดมีประสิทธิภาพ ในการตรวจหาเชื้อด้วยวิธีการ real-time PCR ทั้ง ระบบโพรบ และ double-stranded DNA binding dye ได้ดีกว่าวิธีการบดเมล็ด และมีความไวในการ ตรวจหาเชื้อที่มีเมล็ดติดเชื้อ 10^4 เซลล์/ตัวอย่าง เนื่องจากวิธีการบดเมล็ดจะทำให้ปล่อยสารยับยั้ง ปฏิกริยา PCR ออกมามากกว่าวิธีการแช่เมล็ด สอดคล้องกับการทดลองนี้ที่มีวิธีการแยกเชื้อออก จากเมล็ดด้วยการแช่เมล็ดและหรือการนำเชื้อออก จากเมล็ด ด้วยวิธีการแทนที่อากาศในเมล็ดด้วย สารแช่เมล็ดในสภาพสุญญากาศส่งผลให้การ ปลดปล่อยสารยับยั้งปฏิกริยาจากเมล็ดได้ และ ด้วยวิธีการใช้สุญญากาศแทนที่อากาศด้วยอาหาร เลี้ยงเชื้อเพื่อชะล้างเซลล์ออกมาจากเมล็ดนี้ส่ง ผลต่อการลดปริมาณสารเมือก (mucilaginous substance) ที่ขับออกจากเมล็ด ซึ่งมักเกิดในเมล็ด พืชวงศ์แตงหลายชนิดในช่วงที่แช่เมล็ดในอาหาร ส่งผลต่อเนื่องไปยังกระบวนการสกัดดีเอ็นเอและ คุณภาพของดีเอ็นเอที่ได้รับ จึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เพิ่มความไวในการตรวจหาเชื้อนี้จากเมล็ด

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาไพรเมอร์ชุด 521 ในการตรวจ หาเชื้อ Ac ประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 เส้น เป็น ชนิด forward 3 เส้น ได้แก่ AC-ORF12F และ AC-ORF1F4 และ AC-ORF3F3 และ reverse 1 เส้น ได้แก่ AC-ORF13R ที่สภาพเหมาะสมใน การทำปฏิกริยาที่มีความจำเพาะ ที่ความเข้มข้น ของไพรเมอร์ เป็น 0.4, 0.4, 0.2 และ 0.2 μ M ตามลำดับ ทำปฏิกริยาที่อุณหภูมิ annealing และ extension ที่ 72° ซ. ไม่พบผลบวกปลอม มีความ ไวในการตรวจดีเอ็นเอของเชื้อเป้าหมายได้ต่ำสุด 1 pg การตรวจเชื้อในกองเมล็ดพันธุ์มาตรฐานที่มี อัตราการปนเปื้อน 0.01% (1/10,000) โดยแบ่ง เป็น 5 กองย่อย กองย่อยละ 2,000 เมล็ด พบว่า มีความไวในการตรวจเชื้อได้ต่ำสุดเมื่อมีเชื้อเริ่มต้น 37 CFU ในขณะที่วิธีการตรวจหาเชื้อตามวิธีการ ของ ISHI-Veg ครอบคลุมการใช้กองย่อยที่มี ปริมาณเมล็ดมากกว่า (5,000 เมล็ด) การแยกสกัด

เชื้อออกจากเมล็ด การสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจ หาดีเอ็นเอของเชื้อด้วยเทคนิค TaqMan qPCR ด้วยชุดไพรเมอร์ Contig 21 และ 22 ตรวจไม่พบ เชื้อ Ac ในอัตราการปนเปื้อนข้างต้น ดังนั้น เทคนิค Co-PCR ด้วยไพรเมอร์ชุด 521 นี้ จึงมีความไว ความจำเพาะในการตรวจเชื้อ Ac ที่สูง ใช้เครื่องมือ ที่ราคาไม่สูง ส่งผลต่อค่าใช้จ่ายต่ำกว่าในการตรวจ ตัวอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิค qPCR

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักงานปลัดกระทรวง กระทรวงการ อุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ในโครงการการศึกษาวิธีการมาตรฐานตรวจเชื้อ *Acidovorax citrulli* ในเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตง เพื่อการส่งออก รหัสโครงการ AG-BIO/63-003-005

เอกสารอ้างอิง

- Dutta, B., H. Scherm, R. D. Gitaitis and R. R. Walcott. 2012. *Acidovorax citrulli* seed inoculum load affects seedling transmission and spread of bacterial fruit blotch of watermelon under greenhouse conditions. *Plant Dis.* 96(5): 705-711.
- EPPO. 2021. EPPO A1 List of pests recommended for regulation as quarantine pests version 2021-09. Available at: https://www.eppo.int/ACTIVITIES/plantquarantine/A1_list. Accessed: 14 November 2021.
- Giovanardi, D., S. A. Sutton, E. Stefani, and R. R. Walcott. 2018. Factors influencing the detection of *Acidovorax citrulli* in naturally contaminated cucurbitaceous seeds by PCR-based assays. *Seed Sci. Technol.* 46(1): 93-106.
- ISHI-Veg. 2021. *Detection of Acidovorax citrulli in Cucurbit Seeds by SE-qPCR*. International Seed Federation (ISHI), Nyon, Switzerland.

- Kim, Y. T., K. S. Park, H. S. Kim, H. I. Lee and J. S. Cha. 2015. Development of nested-PCR assay to detect *Acidovorax citrulli*, a causal agent of bacterial fruit blotch at Cucurbitaceae. *Res. Plant Dis.* 21: 74-81.
- Korakngam, C., J. Watcharachaiyakup, S. Patarapuwadol, W. Kositratana. 2018. Detection of *Acidovorax citrulli* by co-operational polymerase chain reaction for seed health testing of watermelon seed. *Thai J. Agric. Sci* 36(3): 280-292.
- Kositcharoenkul, N., O. Chatchawankanphanich, A. Bhunchoth and W. Kositratana. 2011. Detection of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* from field samples using single tube nested PCR. *Plant Pathol.* 60(3): 436-442.
- Lu, Y., H. J. Zhang, Z. J. Zhao, C. L. Wen, W. U. Ping, S. H. Song, S. C. Yu, L. X. Luo and X. L. Xu. 2020. Application of droplet digital PCR in detection of seed-transmitted pathogen *Acidovorax citrulli*. *J Integr. Agric.* 19(2): 561-569.
- Olmos, A., E. Bertolini and M. Cambra. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *J. Virol. Methods* 106: 51-59.
- Öztürk, N. and H. Basim. 2022. A real-time PCR assay using locked nucleic acid probe for detection of *Acidovorax citrulli*. *J Plant Dis. Prot.* 129(2): 395-409.
- Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier and D. J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173(2): 697-703.