

**การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และ
Pepper chat fruit viroid (PCFVd) ในพืชวงศ์ Solanaceae
Detection of *Columnea latent viroid* (CLVd) and
Pepper chat fruit viroid (PCFVd) for Plants in Family Solanaceae**

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์^{1/}
Parichate Tangkanchanapas^{1/}

คณินนิตย์ เทรียสุวรรณกร^{2/}
Kanungnit Reanwarakorn^{2/}

วิภา เกิดพิพัฒน์^{3/}
Wipa Kirdpipat^{3/}

ABSTRACT

Columnea latent viroid (CLVd) and *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) are plant pathogens in viroid group causing serious damage in the Solanaceae, such as tomato, potato and pepper. CLVd and PCFVd can cause high yield losses in potato crop production by causing spindle-shape and elongated tuber. These viroids cause very serious damage in tomato and pepper crop, such as stunting of stems, and reduction in fruit size and leaning of seeds. In addition, these viroids can be very easily transmitted through contaminated agricultural tools and equipments. Moreover, any symptoms are not shown in some plant species throughout the plant life (latent symptom) that makes difficult to completely eliminate (eradication), which causes viroids, are interesting and emphasized for plant quarantine agencies in developing countries for present. Nonetheless, identification of these two viroids by symptoms in the economic crops can not be done, since the similarity. For these reasons, the development of standard detection methods for these two viroid species is necessary to prevent viroid from being contaminated from foreign countries, and to meet the export condition. The results

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

^{1/} Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

^{2/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

^{2/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasertsart University, Kamphaeng Saen district, Nakhon Pathom province 73140

^{3/} กลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม. 10900

^{3/} Plant Quarantine Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

showed that the bolo maka plant (*Solanum stramonifolium*) can be used as biological indexing plant for primary viroid identification and differentiation between CLVd and PCFVd. In addition, the NAD primers (Nad2.1a: GGACTCCTGACGTATAC GAAGGATC / Nad2.2b: AGCAATGAGATT CCCCAATATCAT) can be used as internal control, by RT-PCR detecting on plant *NdhB* gene and showed amplification band clearly at 188 base pairs. The PC-2 primers (cPC2: TGTTTCWRC DGGGAT TACTCCTG / hPC2: GGGTTTTACCC TTCCTTTC) and the PCFVd primers (cPCFVd: AGTTGTATCCACCGGGTAG / hPCFVd: GACAGAGGTGCTTTTTCTTC) can be used for CLVd and PCFVd diagnosis specifically, and displayed amplification band clearly around 370 and 350 base pairs, respectively. Finally, duplex RT-PCR also can be used effectively when uses PC-2 or PCFVd primers concentration for 0.2 μ M and NAD primers concentration for 0.1 μ M for each reaction.

Key-words: *Columnea latent viroid* (CLVd), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), Solanaceae, biological indexing plants, internal control and duplex RT-PCR

บทคัดย่อ

เชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) เป็นเชื้อสาเหตุโรคในกลุ่มไวรอยด์ ที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรงกับพืชในวงศ์ Solanaceae เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่งและพริก เชื้อ CLVd และ PCFVd สามารถสร้างความเสียหายกับการผลิตมันฝรั่งได้รุนแรง โดยทำให้เกิดอาการหัวมันฝรั่งบิดยาวแหลมและไม่สามารถจำหน่ายได้ เชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิดนี้ยังสามารถทำความเสียหายอย่างรุนแรงกับมะเขือเทศและพริกได้ โดยทำให้เกิดอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ผลที่ได้มีขนาดเล็ก และทำให้เมล็ดลีบหรือไม่สร้างเมล็ด เชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคผ่านการปนเปื้อนทางเครื่องมือวัสดุเกษตรได้โดยง่าย อีกทั้งยังไม่แสดงอาการผิดปกติของโรคในพืชอาศัยบางชนิดตลอดช่วงอายุพืช (latent symptom) ซึ่งยากต่อการกำจัดเชื้อให้หมดสิ้น (eradication) ทำให้เชื้อไวรอยด์เป็นศัตรูพืชที่หน่วยงานกักกันพืชของประเทศที่พัฒนาแล้วในปัจจุบันให้ความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้การจำแนกเชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิดออกจากกันโดยอาศัยลักษณะอาการผิดปกติที่ปรากฏบนพืชเศรษฐกิจดังกล่าวไม่สามารถทำได้ เนื่องจากมีความคล้ายคลึงกันมาก ด้วยเหตุนี้การพัฒนาวีธีการในการตรวจสอบที่ได้มาตรฐานของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ จึงมีความจำเป็นต่อการตรวจป้องกัน การปนเปื้อนจากต่างประเทศและเพื่อให้เป็นไปตามเงื่อนไขการส่งออก ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสามารถใช้มะเขือ (*Solanum*

stramonifolium) เป็นพืชทดสอบเพื่อจำแนกแยกชนิดของเชื้อไวรัส CLVd และ PCFVd ออกจากกันได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้การใช้ไพรเมอร์ NAD (Nad2.1a: GGACTCCTG ACGTATACGAAGGATC / Nad2.2b: AGC AATGAGATTCCCCAATATCAT) มาเป็นตัวตรวจควบคุมภายใน (internal control) โดยการตรวจติดตามยีน *NdhB* ของพืช ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 188 เบสที่ชัดเจนด้วยเทคนิค RT-PCR โดยไพรเมอร์ PC-2 (cPC2: TGTTTCWRCD GGGATTACTCCTG / hPC2: GGGTTTTCACC CTTCCCTT TC) และ PCFVd (cPCFVd: AGTTGTATCCACC GGGTAG / hPCFVd: GACAGAGGTGCTTTTTCT TC) สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ CLVd และ PCFVd ได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนขนาดประมาณ 370 และ 350 เบส นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไพรเมอร์ NAD ความเข้มข้น 0.1 μ M ร่วมกับไพรเมอร์ PC-2 หรือ PCFVd ความเข้มข้น 0.2 μ M ในการตรวจด้วยเทคนิค duplex RT-PCR ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คำหลัก: *Columnea latent viroid* (CLVd), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), Solanaceae พืชทดสอบ ตัวควบคุมภายใน และ duplex RT-PCR

คำนำ

ไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืช มีลักษณะ

เป็นวงอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวปิด ขนาดตั้งแต่ 246 - 463 นิวคลีโอไทด์ ไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม และไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ (Diener, 1987) ไวรัสหลายชนิดสร้างปัญหาให้กับพืชในวงศ์ Solanaceae เช่น มะเขือเทศ มันฝรั่งและพริกอย่างรุนแรง โดยเฉพาะไวรัสในสกุล *Pospiviroid* เช่นเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) สร้างความเสียหายกับการผลิตมันฝรั่งโดยทำให้เกิดอาการหัวมันฝรั่งบิดยาวแหลมสูงถึง 64% (Pfannenstiel and Slack, 1980) และทำความเสียหายกับมะเขือเทศได้อย่างรุนแรง โดยทำให้เกิดอาการใบหงิกงอน ลดรูปและมีอาการใบเหลืองและม่วง ก้านใบหดลดขนาด เกิดอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อน้ำอาหารพืชและต้นเตี้ยแคระแกร็น (Fernow et al., 1969) และทำให้ผลมีขนาดเล็กลง เมล็ดมีเปอร์เซ็นต์ความงอกลดลง 24 - 48% (Benson and Singh, 1964) ในขณะที่เชื้อ CLVd ก่อให้เกิดความเสียหายกับมะเขือเทศอย่างรุนแรงมาก ทำให้ต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบเหลืองบิดม้วนและมีอาการเซลล์ตายที่เส้นใบ ก้านใบและกิ่ง ดอกร่วง ผลที่ได้มีขนาดเล็ก มีผลให้ผลผลิตลดลงถึง 49% (ศศิประภา, 2551) เชื้อทำให้เมล็ดลีบ เป็นหมันหรือไม่มีการสร้างเมล็ด (ปริเชษฐ์, 2548) และยังสามารถสร้างความเสียหายในมันฝรั่งได้รุนแรงไม่ต่างจากเชื้อ PSTVd นอกจากนี้มีรายงานการค้นพบเชื้อไวรัสชนิดใหม่ PCFVd ในปี พ.ศ. 2552 เชื้อชนิดนี้สร้างความเสียหายกับพริกหวาน sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) โดยแสดงอาการผลลดขนาดลง

มากกว่า 50% เชื่อทำให้มันฝรั่งมีอาการหัวเล็ก บิดยาวคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อ PSTVd และส่งผลให้มะเขือเทศมีอาการต้นเตี้ยแคระแกร็นอย่างรุนแรง โดยมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ (vein necrosis) (Verhoeven *et al.*, 2009) เชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิดสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางวิธีกลได้ง่าย นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ (ศศิประภา, 2551; Verhoeven *et al.*, 2009) แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบความสามารถในการถ่ายทอดโรคผ่านทางละอองเกสรและแมลงพาหะ เชื้อไวรอยด์จะมีการเพิ่มปริมาณและพัฒนาอาการของโรคได้ดีในสภาพแวดล้อมในเขตร้อนชื้นคือ มีอุณหภูมิและความชื้นสูงและแสงแดดจัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออุณหภูมิสูงเกินกว่า 25°C.

ปัจจุบันงานกักกันพืชของประเทศที่พัฒนาแล้วหลายประเทศ ให้ความสนใจและตื่นตัวต่อเชื้อไวรอยด์มากขึ้น โดยจะเห็นได้จากรายงานการตรวจสกัดหลังการนำเข้าที่ด่านตรวจพืช (interception) ในหลายประเทศว่าพบเชื้อไวรอยด์หลายชนิดติดปนเปื้อนเข้ามาพร้อมกับส่วนขยายพันธุ์พืชต่าง ๆ ที่นำเข้าเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้เนื่องจากคุณสมบัติเฉพาะตัวที่แตกต่างจากโรคพืชชนิดอื่น ๆ เช่น ความสามารถในการถ่ายทอดโรคผ่านทางการบินของเครื่องมือวัสดุเกษตรได้ง่าย และถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์และละอองเกสรได้ในอัตราที่สูง ตลอดจนความรุนแรงของโรคในพืชอาศัยชนิดต่าง ๆ ที่หลากหลายตั้งแต่ไม่แสดงอาการจนถึงทำให้พืช

ตาย ตลอดจนอัตราในการกลายพันธุ์ (mutation) ที่สูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ (Gago *et al.*, 2009) อีกทั้งเชื้อชนิดนี้ยังตรวจวินิจฉัยได้ยาก เนื่องจากต้องใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biology) เช่น RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) ในการตรวจสอบ นอกจากนี้เชื้อไวรอยด์หลายชนิดยังมีคุณลักษณะในการไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ ของโรค (latent) ในพืชอาศัยเลยตลอดช่วงอายุพืช ซึ่งแตกต่างจากเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดอื่น จึงทำให้การทำการกำจัดเชื้อไวรอยด์ให้หมดไป (eradication) ทำได้ยาก ด้วยเหตุนี้จึงทำให้งานกักกันพืชให้ความสำคัญกับเชื้อกลุ่มนี้มาก สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรอยด์ที่เข้าทำลายพืชในวงศ์ Solanaceae แล้ว 3 ชนิดได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd) พบในมะเขือเทศ (อภิเดชและคณะ, 2546), CLVd พบในมะเขือเทศ (ปริเชษฐ์, 2548) และมะอึก (*Solanum stramonifolium* Jack.) (ปริเชษฐ์, 2551) และ PCFVd พบในมะเขือเทศ (Reanwarakorn *et al.*, 2011) ซึ่งนอกจากจะส่งผลโดยตรงกับการผลิตพืชเพื่อใช้เองภายในประเทศ ยังมีผลกระทบต่อ การส่งออกอีกด้วย ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพให้เป็นมาตรฐานสากล จึงมีความจำเป็นทั้งแก่การสกัดกั้นเชื้อที่อาจปนเปื้อนจากต่างประเทศ และตรวจรับรองการปลอดโรคเพื่อให้เป็นไปตามเงื่อนไขการส่งออกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

การดำเนินการทดลองประกอบด้วย 6 ขั้นตอน

1. การตรวจสอบอาการบนพืชทดสอบ (Biological indexing plants)

นำเชื้อ CLVd สายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์ที่แสดงอาการรุนแรงในมะอึ๊ก (CLVd-bolo maka) (Tangkanchanapas *et al.*, 2012) และเชื้อ PCFVd มาปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ มะเขือเทศพันธุ์ Rutgers (*Solanum lycopersicum*, Rutgers) และมะอึ๊ก (bolo maka, *Solanum stramonifolium*) ในระยะสร้างใบจริง 2 คู่ ด้วยวิธีกล โดยบดใบพืชที่เป็นโรคให้ละเอียดในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 ความเข้มข้น 0.1 M ในอัตราส่วนใบพืชต่อ buffer 1:5 ผสมด้วยผง carborundum จากนั้น ทาลงบนใบพืชทดสอบ ตรวจสอบสังเกตอาการโรคหลังปลูกเชื้อไปแล้วประมาณ 4 สัปดาห์

2. การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอจากใบพืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และมะอึ๊กที่ปลูกเชื้อด้วยวิธี CTAB method (ปริเชษฐ, 2548) โดยบดตัวอย่างพืช 100 มก. เติม CTAB extraction buffer (2 % CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0 % Na₂SO₃ และ 2.0 % PVP-40 โดย Na₂SO₃ และ PVP-40 เดิมก่อนใช้) ปริมาตร 1 มล. บ่มที่ 65 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม

chloroform:isoamyl acetate (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำของเหลวส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl acetate (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำของเหลวส่วนบน เติม 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตรหนึ่งเท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ -20 °ซ. ซ้ำมคืน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE buffer ที่มี 1 % SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol ที่แช่เย็น 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ไม่มี nuclease ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3. การตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการควบคุมภายใน (Internal control)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีการควบคุมภายใน โดยการตรวจติดตามยีน *NdhB* ซึ่งเป็น housekeeping gene

ในพีช (Thompson *et al.*, 2003) เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาเรื่องการให้ผลลบเทียมเวลาตรวจ (false negative) โดยยีน *NdhB* มีขนาด 2,237 เบส ประกอบด้วย 2 exon คือ exon 1 และ 2 ที่มีขนาด 777 และ 756 เบสตามลำดับ โดยมี intron ขนาด 704 เบสคั่นกลาง (Figure 1)

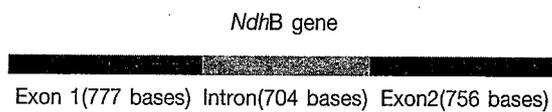


Figure 1. Gene organization of *NdhB* gene

ด้วยการออกแบบให้ forward ไพรมเมอร์ จับบริเวณส่วนท้ายสุดของ exon 1 โดยมีเบส 2 ตัวท้ายด้านปลาย 3' OH group สามารถจับได้กับเบส 2 ตัวแรกของ exon 2 ทำให้ forward ไพรมเมอร์จะเกิดปฏิกิริยากับเฉพาะยีน *NdhB* ที่เป็น mRNA เท่านั้น แต่จะไม่จับกับยีน *NdhB* ในสภาพ genomic DNA (Figure 2) (เนื่องจากกระบวนการสร้างสาย mRNA ของยีนมีกลไกการตัดส่วน intron ออกเพื่อเชื่อม exon แต่ละ exon เข้าหากัน ซึ่งเรียกกลไกนี้ว่า RNA splicing โดยไพรมเมอร์ NAD มีลำดับเบสดังนี้

Nad2.1a: GGA-CTC-CTG-ACG-TAT-ACG-AAG-GAT-C

Nad2.2b: AGC-AAT-GAG-ATT-CCC-CAA-TAT-CAT

จากนั้นตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) ในขั้นตอนต่อไป โดยส่วนผสมของ

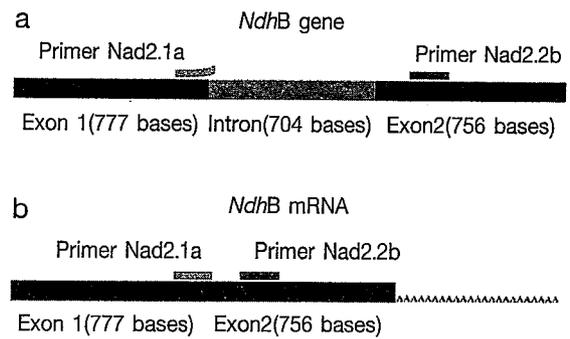


Figure 2. Annealing simulation of primers
a: No PCR reaction when primers bind to *NdhB* gene (genomic DNA)
b: PCR reaction occur when primers bind to *NdhB* mRNA

ปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้: 1X one-step buffer, 0.2 M ไพรมเมอร์ Nad2.1a และ Nad2.2b โดยเติม Superscript RT/platinum taq polymerase (invitrogen) ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร และอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้: อุณหภูมิ 48 °ซ. เป็นเวลา 50 นาที จำนวน 1 รอบ 94 °ซ. เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94 °ซ. เป็นเวลา 30 วินาที annealing temperature 56 °ซ. เป็นเวลา 30 วินาที extension temperature 72 °ซ. เป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้ 7 ไมโครลิตร ตรวจสอบแถบผลผลิตปฏิกิริยาด้วยวิธีการอีเล็กโตรโฟรีซิส ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใช้

agarose gel เข้มข้น 2.0 % ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และย้อม gel ด้วย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ NAD มีขนาด 188 base pair

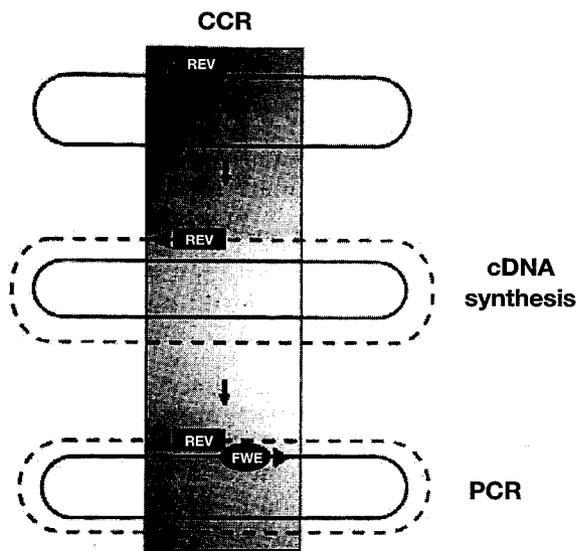


Figure 3. Full length amplification of viroid by RT-PCR source (Hadidi *et al.*, 2003)

4. การออกแบบไพรเมอร์สำหรับเชื้อ CLVd และ PCFVd

การใช้ชีวสารสนเทศ (bioinformatics) และฐานข้อมูลจาก GenBank มาช่วยในการออกแบบไพรเมอร์ได้ เนื่องจากจีโนมของไวรอยด์มีขนาดเล็ก (246 - 463 นิวคลีโอไทด์) จึงสามารถสังเคราะห์ RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณได้แบบครบทั้งจีโนม อีกทั้งมีจีโนมเป็นวงปิด ทำให้มีวิธีการในการออกแบบไพรเมอร์ที่แตกต่างจากเชื้อชนิดอื่น (Figure 3) ปัจจุบันการยืนยันผล

การตรวจวินิจฉัยไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR จำเป็นต้องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย เช่น การยืนยันการตรวจพบในขั้นตอน interception รวมถึงการวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกชนิดของไวรอยด์ด้วย

สำหรับการตรวจเชื้อ CLVd ใช้ไพรเมอร์ PC-2 (ปริเชษฐและคณะ, 2548) ซึ่งมีวิธีการในการออกแบบตาม Figure 4 และมีลำดับเบสดังนี้

cPC2: TGT-TTC-WRC-DGG-GAT-TAC-TCC-TG

hPC2: GGG-TTT-TCA-CCC-TTC-CTT-TC

W = เบส A หรือ T, R = เบส A หรือ G และ D = เบส A หรือ G หรือ T

สำหรับการตรวจเชื้อ PCFVd ใช้ไพรเมอร์ PCFVd (หรือใช้ไพรเมอร์ PC-2 แทนได้) ซึ่งมีวิธีการในการออกแบบตาม Figure 5 และมีลำดับเบสดังนี้

cPCFVd: AGT-TGT-ATC-CAC-CGG-GTA-G

hPCFVd: GAC-AGA-GGT-GCT-TTT-TCT-TC

5. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ CLVd และ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR

ตรวจสอบเชื้อ CLVd และ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยส่วนผสมของปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้: 1X one-step buffer 0.2 M ไพรเมอร์สาย c และสาย h โดยเติม Superscript RT/platinum taq

Table 1. Composition of duplex RT-PCR testing reaction

Chemical composition	Reaction 1 (µl)	Reaction 2 (µl)	Reaction 3 (µl)	Reaction 4 (µl)
Double distilled water	1.5	2.5	3.5	4.1
2X RT-PCR buffer	10.0	10.0	10.0	10.0
2 <u>M</u> c- viroid primer	2.0	2.0	2.0	2.0
2 <u>M</u> h- viroid primer	2.0	2.0	2.0	2.0
2 <u>M</u> Nad2.2b primer	1.5	1.0	0.5	0.2
2 <u>M</u> Nad2.1a primer	1.5	1.0	0.5	0.2
Superscript RT/platinum Taq polymerase	0.5	0.5	0.5	0.5
RNA template	1.0	1.0	1.0	1.0
Total volume	20.0	20.0	20.0	20.0

UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้จาก CLVd และ PCFVd จะมีขนาดประมาณ 370 และ 350 base pair

เหมาะสมที่สุด โดยปรับอุณหภูมิ 58° 56° 54° และ 52 °ซ. ตามลำดับ

6. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ CLVd และ PCFVd ร่วมกับไพรเมอร์ NAD ด้วยเทคนิค duplex RT-PCR

การพัฒนาการตรวจสอบเชื้อ CLVd และ PCFVd ร่วมกับการตรวจ internal control (ไพรเมอร์ NAD) ใช้การเทคนิค duplex RT-PCR ซึ่งมีสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาตาม (Table 1) ดังนี้

เลือกปฏิกิริยาที่ให้แถบดีเอ็นเอสองแถบ (188 เบสของ internal control รวมกับ 350 หรือ 370 เบสของไวรอยด์) ที่ชัดเจนที่สุด นำมาทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยาต่อไป ทำการปรับอุณหภูมิ annealing temperature ที่

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจสอบอาการบนพืชทดสอบ (Biological indexing plants)

เชื้อ CLVd และ PCFVd แสดงอาการผิดปกติบนมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ที่คล้ายคลึงกันคือ ลำต้นแคระแกร็นอย่างรุนแรง ก้านใบและยอดหดสั้น ใบหดครู่และบิดม้วนเสียรูปทรง (Figure 6) และมีลักษณะอาการเซลล์ตาย (necrosis) ที่บริเวณเส้นใบ กิ่งและก้านใบ (Figure 7) แตกต่างจากอาการบนมะเขือเทศที่เชื้อ CLVd สายพันธุ์ดั้งเดิม (original) ไม่แสดงอาการผิดปกติ (latent) (Figure 8) ในขณะที่สายพันธุ์ CLVd-bolo maka แสดงอาการรุนแรงต้นเตี้ยแคระแกร็น ยอดและใบหดครู่



Figure 6. Stem stunting with rugosity and chlorosis of leaves appearing on infected tomato var Rutgers after mechanical transmission of viroids



Figure 7. Necrosis of leaf veins and petioles appearing on infected tomato var Rutgers after mechanical transmission of viroids



Figure 8. Latent symptom appearing on infected bolo maka after mechanical transmission of CLVd-original isolate



Figure 9. Symptom on bolo maka: severe stunting, rugosity and small lateral leaves

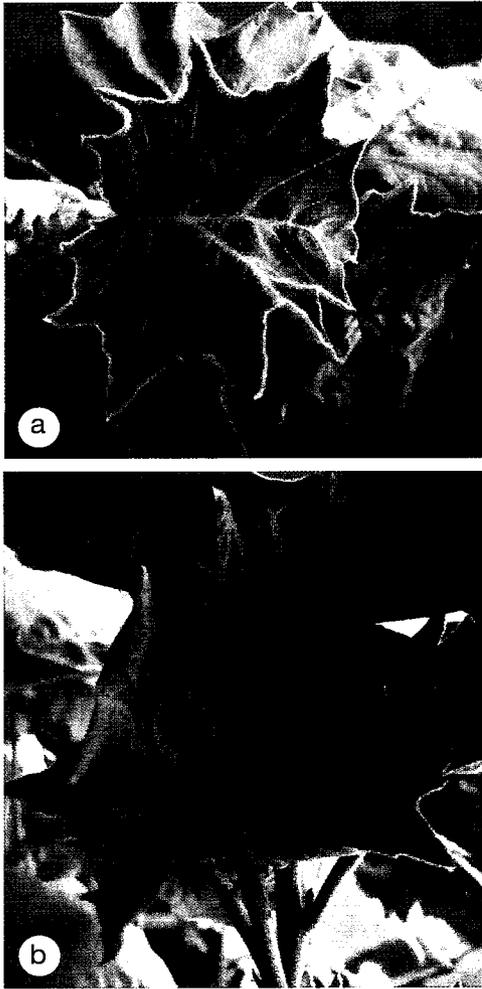


Figure 10. Symptom of infected bolo maka after CLVd-bolo maka inoculation : a) upper infected leaf showing rugosity and chlorosis, b) lower infected leaf showing vein necrosis

(Figure 9) ใบมีอาการต่าง เนื้อใบหดย่น และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ (Figure 10) ส่วนเชื้อ PCFVd แสดงอาการใบหดลดรูป เนื้อใบน้อยอย่างรุนแรง และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณท่อลำเลียงของพืชเล็กน้อย แต่ไม่มีอาการแคระแกร็น (Figure 11)



Figure 11. Symptom of infected bolo maka after PCFVd inoculation : a) symptom on infected plant, b) infected leaf showing severe rugosity

ผลการตรวจสอบอาการผิดปกติบนพืชทดสอบ พบว่าลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืชทดสอบจะมีลักษณะที่แตกต่างกันทำให้สามารถใช้พืชทดสอบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และมะอึ๊ก มาช่วยในการจำแนกโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์และสามารถจำแนกเชื้อ CLVd และ PCFVd ออกจากกันได้ (Table 2)

Table 2. Symptoms of CLVd-original, CLVd- bolo maka isolate and PCFVd on biological indexing plants, tomato (Rutgers) and bolo maka

Viroid species	Symptoms on	
	Tomato, Rutgers (<i>Solanum lycopersicum</i> , Rutgers)	Bolo maka (<i>Solanum stramonifolium</i>)
CLVd-original	Stem stunting, rugosity and chlorosis of leaves, necrosis of leaf veins and petioles	Latent or very mild symptom
CLVd- bolo maka	Stem stunting, rugosity and chlorosis of leaves, necrosis of leaf veins and petioles	Severe stem stunting, rugosity and chlorosis of leaves, severe necrosis of leaf veins and petioles
PCFVd	Stem stunting, rugosity and chlorosis of leaves, necrosis of leaf veins and petioles	Severe rugosity of leaves, slightly necrosis of leaf veins

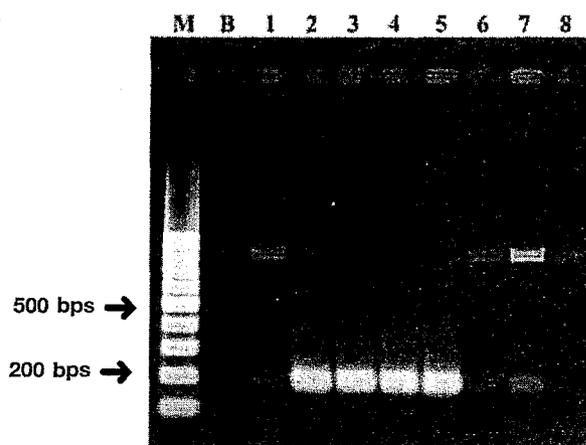


Figure 12. Electrophoretic analysis of DNA bands (188 base pairs), by RT-PCR of *NdhB* gene with NAD primers

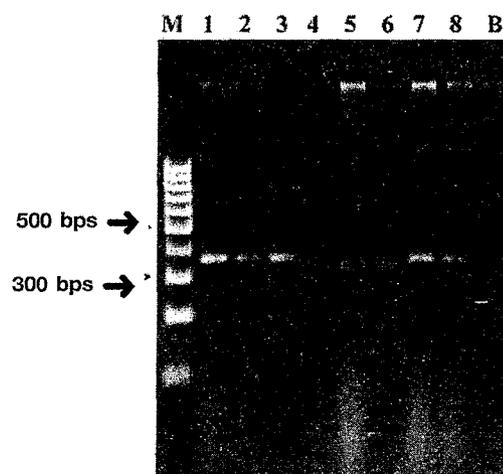


Figure 13. Electrophoretic analysis of DNA bands (around 370 and 350 base pairs), by RT-PCR of CLVd-original (lanes 1, 2 and 3), CLVd-bolo maka isolates (lanes 7 and 8) and PCFVd (lanes 4, 5 and 6) with PC-2 and PCFVd primers

2. การตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการควบคุมภายใน (Internal control)

ตรวจ internal control โดยใช้ไพรเมอร์ NAD ตรวจสอบติดตาม mRNA ของยีน *NdhB*

สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 188 base pair ได้อย่างชัดเจน (Figure 12)

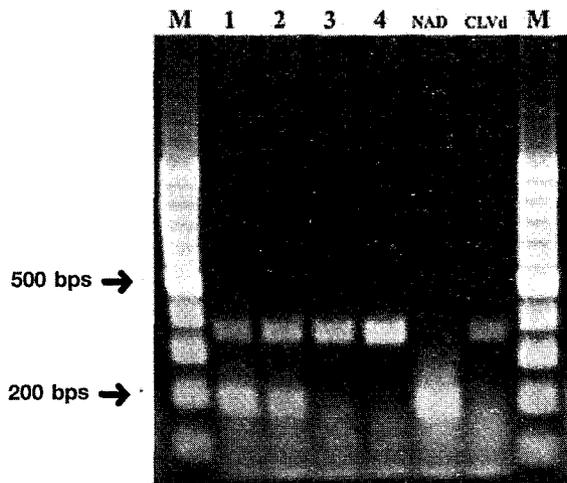


Figure 14. Electrophoretic analysis of DNA bands (around 370 and 188 base pairs), by duplex RT-PCR with PC-2 and NAD primers: lane 1 = RT-PCR reaction 1 (NAD primers 1.5 l per each), lane 2 = RT-PCR reaction 2 (NAD primers 1.0 l per each), lane 3 = RT-PCR reaction 3 (NAD primers 0.5 l per each), lane 4 = RT-PCR reaction 4 (NAD primers 0.2 l per each)

3. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ CLVd และ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR

การตรวจเชื้อ CLVd และ PCFVd โดยใช้ไพรเมอร์ PC-2 และ PCFVd ตรวจติดตามสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 base pair ของเชื้อ CLVd ทั้ง 2 isolate และตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 350 base pair ของเชื้อ PCFVd 350 ได้อย่างชัดเจน (Figure 13) แสดงว่าไพรเมอร์ PC-2

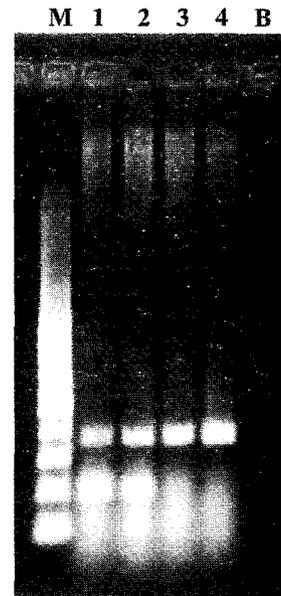


Figure 15. Electrophoretic analysis of DNA bands (around 370 and 188 base pairs), by duplex RT-PCR with PC-2 and NAD primers: lane 1 = annealing temperature at 58 °C, lane 2 = annealing temperature at 56 °C, lane 3 = annealing temperature at 54 °C, lane 4 = annealing temperature at 52 °C

และ PCFVd สามารถตรวจจำแนกเชื้อไวรอยด์ CLVd และ PCFVd ออกจากกันได้

4. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ CLVd และ PCFVd ร่วมกับไพรเมอร์ NAD ด้วยเทคนิค duplex RT-PCR

การทดสอบเทคนิค duplex RT-PCR โดยเติมไพรเมอร์ NAD ลงไปร่วมทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบไวรอยด์ (PC-2 หรือ

PCFVd) พบว่าปฏิกิริยาของ reaction ที่ 2 คือ ใช้ไพรเมอร์ตรวจไวรอยด์ปริมาณ 2.0 ไมโครลิตร ต่อเส้น ร่วมกับไพรเมอร์ NAD ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตรต่อเส้น ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนที่สุด (Figure 14)

การทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของ ปฏิกิริยา duplex RT-PCR โดยปรับหาอุณหภูมิ annealing temperature ที่เหมาะสมที่สุด พบ ว่าที่อุณหภูมิ 56 °ซ. ให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจน ที่สุด (Figure 15)

สรุปผลการทดลอง

มะเขือเทศพันธุ์ Rutgers สามารถใช้ในการจำแนกโรคพืชที่เกิดจากเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ออกจากโรคพืชชนิดอื่นได้ และสามารถใช้มะเขือเทศพันธุ์ CLVd-original isolate, CLVd-bolo maka isolate และ PCFVd ออกจากกันได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ ยีน *NdhB* ของพืชมาเป็น internal control (ตัวควบคุมภายใน) ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ ด้วยเทคนิค RT-PCR ได้ นอกจากนี้ไพรเมอร์ PC-2 สามารถตรวจเชื้อ CLVd ได้โดยให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 base pair และไพรเมอร์ PCFVd สามารถตรวจเชื้อ PCFVd ได้โดยให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 350 base pair อย่างชัดเจน และยังสามารถนำไพรเมอร์ NAD และไพรเมอร์ PC-2 หรือ PCFVd มาตรวจร่วมกันด้วย duplex RT-PCR ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภรณ์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภรณ์ คณินันต์ย เทริยวารการ เสริมศิริ จันท์เปรม และรัชณี สงประยูร. 2548. ไพรเมอร์สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศ 6 ชนิด ในกลุ่ม *Pospiviroid* ด้วยเทคนิค RT-PCR. วารสารโรคพืช 1-2: 13-21.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภรณ์. 2551. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์กับเมล็ดมะเขือเทศที่เหมาะสมในงานกักกันพืช. ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร. 35 หน้า.
- ศศิประภา มาราช. 2551. โคลนก่อโรคของเชื้อ *Columnea latent viroid* และผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.
- อภิเดช แสงดี พิศาล ศิริธร และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2546. เชื้อไวรอยด์ในมะเขือเทศ: รายงานครั้งแรกในประเทศไทย. เกษตร 31(4): 200-210.
- Benson, A.P. and R.P. Singh 1964. Seed transmission of *Potato spindle tuber virus* in tomato. *Am. Potato J.* 41: 294.

- Diener, T.O. 1987. *The Viroids*. Plenum Press, Inc., New York. 344 p.
- Fernow, K.H., L.C Peterson and R.L. Plaisted. 1969. The tomato test for eliminating spindle tuber from potato planting stock. *Am. Potato J.* 46: 424-429.
- Gago, S., S. F. Elena, R. Flores and R. Sanjun. 2009. Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Sci.* 323: 1308.
- Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. *Viroids*. Science Publishers, Inc., USA. 370 p.
- Pfannenstiel, M.A. and S.A. Slack. 1980. Response of potato cultivars to infection by the *Potato spindle tuber viroid*. *Phytopathology* 70(9): 922-926.
- 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.
- 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 7-10 February, 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. *J. 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.