



รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาคีตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและ
ชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

Research and Development of Pest Detection by Serology
and Molecular Biology technique for the Import and
Export of Agricultural Products

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางณัฐธิมา ไชยิตเจริญกุล

(Mrs. Nuttima Kositcharoenkul)

ปี พ.ศ. 2565



รายงานโครงการวิจัย

วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและ
ชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

Research and Development of Pest Detection by Serology
and Molecular Biology technique for the Import and
Export of Agricultural Products

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย

นางณัฐิมา โขจิตเจริญกุล

(Mrs. Nuttima Kositcharoenkul)

ปี พ.ศ. 2565

คำปรารภ (Foreword หรือ Preface)

..

กรมวิชาการเกษตร

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
คณะผู้วิจัย	2
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	3
บทนำ	4
บทคัดย่อ	12
1. กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้า เกษตร	16
2. กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศ เพื่อป้องกันกำจัดและการส่งออก	101
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	284
บรรณานุกรม	286

กรมวิชาการเกษตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร เป็นโครงการที่มุ่งเน้นพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ วิธีทางด้านเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล นำมาปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น PCR และ Real time PCR และ ทางเซรุ่มวิทยา เช่น การผลิตแอนติบอดีของไวรัสสาเหตุโรคพืชโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย การพัฒนาชุดตรวจสอบศัตรูพืช Immuno strip และ lateral flow test strip เพื่อใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืช ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัด และการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูงเพิ่มขึ้น เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย และพัฒนาให้รวดเร็วยิ่งขึ้น สามารถย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

คณะผู้วิจัย

ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล

กาญจนา วาระวิชนี

พรพิมล อธิปัญญาคม

รุ่งนภา ทองเครื่อง

สิทธิศักดิ์ แสนไพศาล

ทิพวรรณ กันหาญาติ

วาสนา รุ่งสว่าง

ภูวนารถ มณีโชติ

ยุวรินทร์ บุญทบ

ไตรเดช ข่ายทอง

ชนินทร์ ดวงสะอาด

ภูวนารถ มณีโชติ

แสนชัย คำหล้า

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

ปัจจุบันศัตรูพืชมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการค้าระหว่างประเทศเนื่องจากการนำเข้ามาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตรแทนมาตรการกีดกันด้านภาษีศุลกากร ตั้งแต่มีการจัดตั้งองค์การการค้าโลก (World Trade Organization; WTO) เพื่อสนับสนุนการเปิดการค้าเสรี โดยอยู่บนพื้นฐานของการแข่งขันที่เป็นธรรม ทำให้มาตรการกีดกันด้านภาษีศุลกากรลดลง แต่ในขณะเดียวกันมาตรการกีดกันทางการค้าที่ไม่ใช่ภาษีศุลกากร (non tariff barrier, NTB) มีบทบาทเพิ่มขึ้น มาตรการที่สำคัญคือการจัดทำข้อตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) เป็นมาตรการที่ใช้ในการจำกัดการนำเข้าสินค้าเกษตรเพื่อปกป้องและคุ้มครองชีวิตและสุขภาพของมนุษย์พืช สัตว์ ภายในประเทศของตนเอง ในด้านที่เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการบริโภคหรือเสี่ยงต่อโรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตที่ติดมากับพืช สัตว์และผลิตภัณฑ์รวมทั้งสารเจือปนในอาหาร สารพิษหรือจุลินทรีย์ที่เป็นพาหะของโรค ทั้งนี้การกำหนดระดับความปลอดภัยและการตรวจสอบมาตรฐานสินค้านำเข้าจะต้องสอดคล้องกับมาตรฐานระหว่างประเทศและตั้งอยู่บนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เชื่อถือได้ โดยมาตรฐานระหว่างประเทศด้านพืชที่ใช้อ้างอิงคือ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention, IPPC) โดยให้แต่ละประเทศจัดตั้งองค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) ของตนเองเพื่อดำเนินการตามข้อกำหนดของอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชได้ถูกนำมาใช้ในการค้าระหว่างประเทศ โดยประเทศคู่ค้ามักนำมาตราการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชมาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตร โดยอ้างการตรวจพบเชื้อโรคพืชแมลง และอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์ทางการค้าของประเทศ และการออกกฎระเบียบใหม่ใช้ศัตรูพืชกักกันมาเป็นเงื่อนไขในการนำเข้าสินค้าเกษตร ประเทศไทยมีพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551ซึ่งเป็นกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร โดยมีกรมวิชาการเกษตรในฐานะ องค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของประเทศไทย ทำหน้าที่กำกับดูแล ต้องทำหน้าที่ในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศไทย และยังคงทำหน้าที่ในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรในการส่งออก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชที่รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรเพื่อป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศไทย และต้องพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ทันสมัย ทันต่อสถานการณ์ มีประสิทธิภาพในการตรวจหาศัตรูพืช และต้องเป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้า ศัตรูพืชโดยเฉพาะเชื้อสาเหตุโรคพืชมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดและสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้ คือ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไวรอยด์ และไฟโตพลาสมา แต่ละกลุ่มของเชื้อก็ยังจำแนกออกเป็นสายพันธุ์ของเชื้อ (races หรือ strains) แต่ละชนิดของเชื้อโรคนั้นต้องใช้

เทคนิคในการตรวจหาที่มีความเฉพาะเจาะจงแตกต่างกันไป การที่จะเลือกวิธีการตรวจหาให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อโรคศัตรูพืชและชนิดของพืชและผลิตผลพืชนั้นๆ จึงนับเป็นปัญหาหลักในการตรวจหาเชื้อโรคศัตรูพืช เพราะถ้าหากเลือกใช้วิธีการตรวจหาที่ไม่เหมาะสมหรือไม่มีประสิทธิภาพแล้ว จะก่อให้เกิดความเสียหายต่องานการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและงานด้านกักกันพืช โดยเฉพาะงานกักกันพืช การตรวจหาศัตรูพืชจากผลิตผลทางการเกษตรที่ส่งออกและนำเข้า หากวิธีการตรวจหาศัตรูพืชไม่มีประสิทธิภาพ ผลิตผลที่ส่งออกจากประเทศไทยอาจถูกตีกลับมาจากประเทศปลายทางเนื่องจากตรวจพบศัตรูพืชตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ทำให้เสียภาพลักษณ์ของประเทศไทย นอกจากนี้อาจทำให้ศัตรูพืชร้ายแรงหรือศัตรูกักกันจากต่างประเทศติดเข้ามาที่สินค้านำเข้า ทำให้เกิดการระบาดทำความเสียหายต่อการเพาะปลูกพืชของไทย ที่สำคัญประเทศไทยยังเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญโดยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์และส่วนขยายพันธุ์เพื่อการบริโภคภายในประเทศและใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม สำหรับใช้ในประเทศและส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ทำให้มีความเสี่ยงที่เป็นเส้นทาง (pathway) ของศัตรูพืชร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันที่สำคัญที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ ทำให้มีศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงเข้ามาในประเทศไทย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืช ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และต้องพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ทันสมัย ทันทต่อสถานการณ์ มีประสิทธิภาพในการตรวจหาศัตรูพืช และต้องเป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้า เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า

นอกจากนี้ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการผลิตสินค้าทางการเกษตรที่มีศักยภาพในการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศหลายชนิดแต่ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญคือปัญหาด้านศัตรูพืช เป็นปัญหาสำคัญทำให้เกิดความเสียหายแก่ขบวนการผลิตพืช ทำให้ผลิตผลไม่มีคุณภาพหรือมีการปนเปื้อนไม่สามารถส่งออกได้จำเป็นต้องหาวิธีการที่จะป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้ผลิตผลที่ดี การป้องกันกำจัดให้ได้ผลดีต้องมีวิธีการตรวจหาศัตรูพืชอย่างรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ วิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ใช้โดยทั่วไปใช้เวลาในการตรวจนานไม่ทันต่อสถานการณ์ วิธีการตรวจหาที่รวดเร็วจะทำให้แก้ไขหรือป้องกันกำจัดได้ทันสถานการณ์ ทำให้สามารถส่งออกสินค้าเกษตรไปยังต่างประเทศได้

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ พัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ วิธีทางด้านเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล นำมาปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น PCR และ Real time PCR และ ทางเซรุ่มวิทยา เช่น การผลิตแอนติบอดีของไวรัสสาเหตุโรคพืชโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย การพัฒนาชุดตรวจสอบศัตรูพืช Immuno strip และ lateral flow test strip เพื่อใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืช ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัด และการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้า

ระหว่างประเทศให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูงเพิ่มขึ้น เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย และพัฒนาให้รวดเร็วยิ่งขึ้น สามารถย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตร

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืช กักกันเข้ามาในประเทศ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไข ของประเทศคู่ค้า

กรมวิชาการเกษตร

วิธีการวิจัย

การตรวจหาคัสโตรูพีซจำเป็นต้องมีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำเพิ่มมากขึ้น และที่สำคัญต้องมีการพัฒนาให้รวดเร็วขึ้น เพื่อสามารถนำไปใช้ในการตรวจหาคัสโตรูพีซอย่างมีประสิทธิภาพเนื่องจากการวินิจฉัยและตรวจหาคัสโตรูพีซเป็นหัวใจสำคัญในการรักษาพีซ เมื่อมีการตรวจหาคัสโตรูพีซอย่างถูกต้องแม่นยำ ประกอบกับการตรวจที่รวดเร็ว ทำให้สามารถหาแนวทางการป้องกันกำจัดคัสโตรูพีซได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ควบคุมการระบาดของคัสโตรูพีซได้ทันสถานการณ์ นอกจากนี้แล้วการพัฒนาวิธีการตรวจสอบคัสโตรูพีซจึงมีความจำเป็นอย่างมากเพื่อนำมาใช้ในงานกักกันพีซ เพื่อป้องกันไม่ให้คัสโตรูพีซต่างถิ่นร้ายแรงหรือคัสโตรูพีซกักกันพีซเข้ามาในประเทศไทย และเพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกเทคนิคที่ใช้เพื่อตรวจสอบ คัสโตรูพีซในห้องปฏิบัติการมีหลายวิธี เช่น การทดสอบทางฟิสิกส์และชีวเคมี การจำแนกเชื้อด้วยระบบ Biolog® การใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) และเทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งเทคนิคดังกล่าว แต่ละเทคนิคมีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียได้ในระดับที่แตกต่างกันและมีข้อจำกัด เช่นวิธีตรวจสอบโดยการทดสอบการทดสอบทางฟิสิกส์และชีวเคมี การจำแนกเชื้อด้วยระบบ Biolog® จำเป็นต้องมีการแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหาร ทำให้ใช้ระยะเวลาในการตรวจผลนาน ไม่ทันต่อสถานการณ์ บางครั้งอาจเกิดการระบาดของโรคไปแล้วถ้ามีวิธีการตรวจหาที่รวดเร็วจะทำให้แก้ไขหรือป้องกันกำจัดได้ทันสถานการณ์ ซึ่งวิธีการตรวจหาคัสโตรูพีซโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ วิธีทางด้านเซรุ่มวิทยาและอณูชีววิทยาเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ มีความเฉพาะเจาะจง รวดเร็ว และแม่นยำ

เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา เป็นวิธีการที่ใช้แอนติบอดีของเชื้อสาเหตุโรคที่ได้จากกระต่ายทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของคัสโตรูพีซ ซึ่งปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีเป็นปฏิกิริยาที่มีความเฉพาะเจาะจง วิธีการทางเซรุ่มวิทยาที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคมียังมีหลายวิธี ได้แก่ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Dot Immunobinding Assay (DIBA) และ Immunofluorescence (IF) เป็นต้น กลุ่มวิจัยโรคพีซได้มีการผลิตแอนติซีรัมของแบคทีเรีย และไวรัสสาเหตุโรคพีซที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด แอนติซีรัมเหล่านี้ได้ถูกนำมาพัฒนาเป็นชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (Test Kit เช่น ELISA test kit, DIBA test kit GLIFT kit และ Immuno strip) ซึ่งสามารถนำไปใช้ตรวจสอบในภาคสนามได้ และเป็นการประหยัดงบประมาณในการสั่งซื้อแอนติซีรัมจากต่างประเทศ และเป็นศูนย์ผลิตและเก็บรักษาแอนติซีรัมของไวรัส ไฟโตพลาสมา และแบคทีเรียสาเหตุโรคพีซแห่งประเทศไทย และเป็นแหล่งผลิตชุดตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพีซในประเทศไทย

การผลิตแอนติบอดีของเชื้อไวรัสหรือเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคพีซมีข้อจำกัดเรื่องการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ออกจากพีซเพื่อนำมาใช้เป็นแอนติเจนมักพบปัญหาเรื่องการปะปนของโปรตีนพีซอยู่เสมอส่งผลให้แอนติบอดีที่ผลิตได้คุณภาพไม่ดีเมื่อนำมาใช้ตรวจทำให้การวิเคราะห์ผลคลาดเคลื่อน ดังนั้นปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคโนโลยี ชีวภาพมาใช้เพื่อผลิตโปรตีนจากยีนที่มีความเฉพาะเจาะจงโดยการโคลนยีนมาเพิ่มปริมาณในเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* ให้ได้ปริมาณมากได้เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีความบริสุทธิ์สูง เป็นการเพิ่มปริมาณแอนติเจนเพื่อนำไปผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลองต่อไป

เทคนิค Immuno strip เป็นวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการวินิจฉัยโรค วิธีการนี้มีหลักการ คือ การนำแอนติบอดีมาติดฉลากกับอนุภาคสารที่มีสีเพื่อให้แอนติบอดีที่ติดฉลากทำปฏิกิริยากับแอนติเจนที่จำเพาะแล้วจะเกิดเป็น antigen-antibody complex โดย complex ดังกล่าวจะเคลื่อนที่ด้วยแรง capillary flow จนไปถึงตำแหน่งบน solid support ที่ถูกเคลือบด้วยแอนติบอดีอีกชนิดที่จำเพาะต่อแอนติเจนบริเวณนี้ เรียกว่า test line ซึ่ง complex ข้างต้นจะถูกจับอยู่ที่ test line เกิดให้เห็นเป็นแถบสี ซึ่งสามารถยืนยันความถูกต้องของการตรวจสอบได้จาก complex ที่จะเคลื่อนต่อไปบน solid support จนไปถึงบริเวณที่เคลือบแอนติบอดีอีกชนิด (secondary antibody) เรียกบริเวณนี้ว่า control line ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากแอนติบอดีตัวแรกและแอนติบอดีที่ control line นี้จะทำให้เกิดแถบสีอีกแถบหนึ่ง (Garland *et al.*, 1986; Borque *et al.*, 1995) ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้ใช้เวลาในการตรวจสอบเพียง 5-10 นาที วิธีการนี้จึงเหมาะสมที่จะพัฒนาเพื่อใช้ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพิษ

เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการ DNA Replication ซึ่งเป็นการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอสายใหม่ จาก ดีเอ็นเอต้นแบบในหลอดทดลองภายในระยะเวลาอันสั้นและได้ดีเอ็นเอสายใหม่เกิดขึ้นเป็นล้านเท่า เทคนิคนี้พัฒนาขึ้นเมื่อปี พ.ศ. 2528 โดย Kary Mullis และคณะแห่งบริษัท Cetus Corporation จุดเด่นของเทคนิค PCR คือ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้อย่างเฉพาะเจาะจงโดยมีขั้นตอนการทำงานน้อยและใช้เวลาน้อย จนถึงปัจจุบันนี้เทคนิค PCR ได้รับการปรับปรุงและพัฒนาในหลาย ๆ ด้านจนกระทั่งได้รับการยอมรับว่าเป็นเทคโนโลยีที่สำคัญ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทั้งกับงานวิจัยทางชีวโมเลกุลและพันธุวิศวกรรม เช่น การเพิ่มปริมาณยีน (gene cloning) การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน (gene sequencing) การสร้าง ดีเอ็นเอ ติดตาม (DNA probe) และการวิจัยประยุกต์ เช่น การศึกษาการแสดงออกของยีนจาก mRNA การสร้างยีนกลายพันธุ์ (in vitro mutagenesis) การบ่งชี้ตำแหน่งกลายพันธุ์บนยีน (point mutations and deletions) เป็นต้น

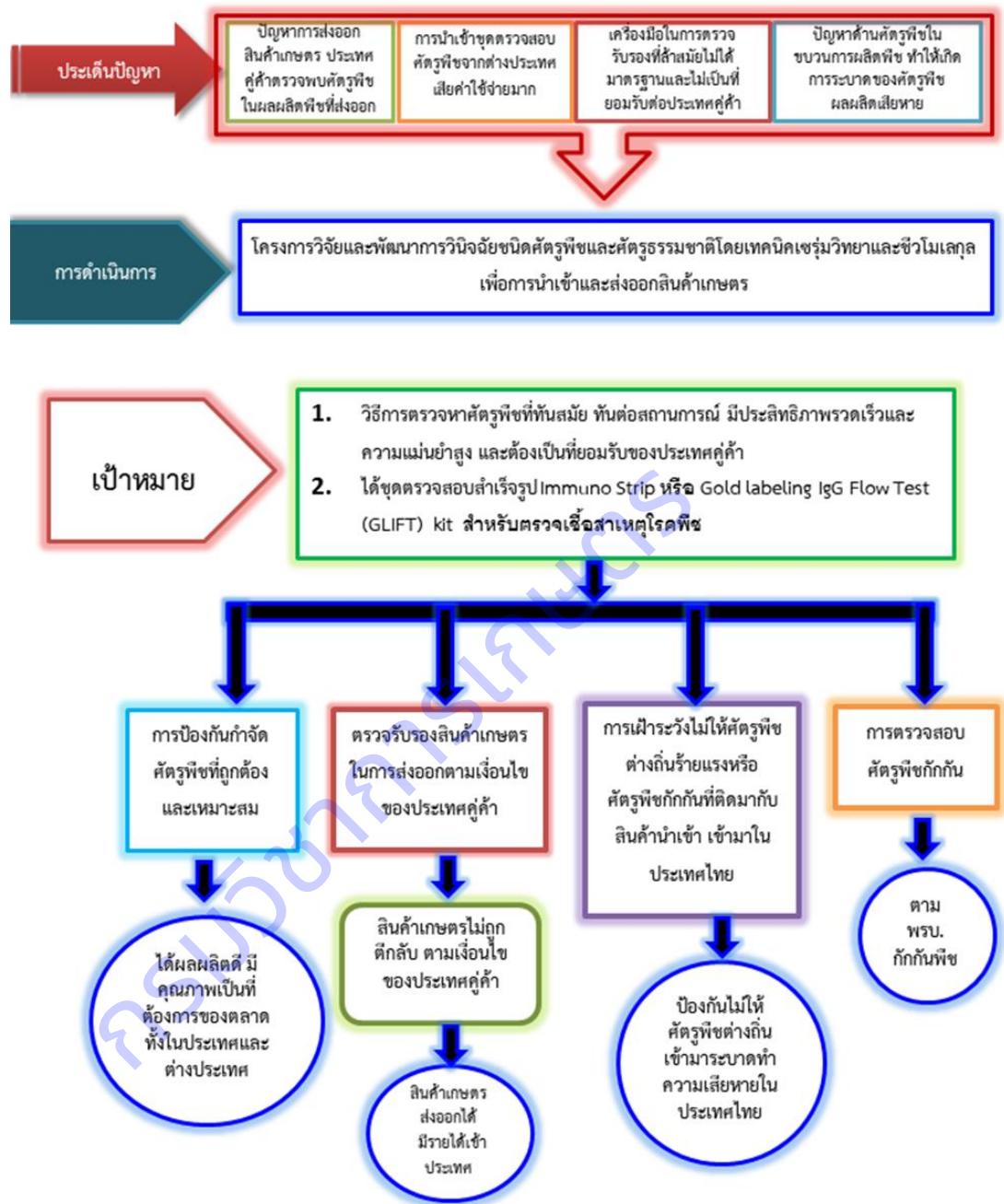
เทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) เป็นเทคนิคหนึ่งที่ถูกพัฒนามาจากเทคนิค PCR โดยเทคนิค RT-PCR เป็นเทคนิคพื้นฐานที่ใช้ในงานด้านชีวโมเลกุลเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอ (RNA) (Freeman *et al.*, 1999) เทคนิค RT-PCR และเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม (Traditional PCR) นั้นนำมาใช้งานเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายแต่ทั้งสองเทคนิคมีระบบการทำงานพื้นฐานที่แตกต่างกัน โดยที่เทคนิค PCR แบบดั้งเดิม ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจากลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ ส่วนเทคนิค RT-PCR ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยการสร้างสาย complement DNA (cDNA) โดยวิธี Reverse transcription ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase จากนั้นจึงนำ cDNA ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม ซึ่งเทคนิค RT-PCR คือการรวมขั้นตอนของการสังเคราะห์ cDNA จากสายอาร์เอ็นเอต้นแบบ (RNA template) เข้ากับการทำ PCR เพื่อให้เกิดความแม่นยำในการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของยีน (gene expression) และใช้เพื่อการตรวจสอบหรือตรวจหาปริมาณการแสดงออกของ messenger RNA (mRNA) จากการมีอยู่เพียงเล็กน้อยของอาร์เอ็นเอเป้าหมาย (Linderman *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004)

เทคนิค Real time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาจากข้อจำกัดของเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (Quantitative) เห็นผลได้แบบทันที (real time) บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ โดยใช้การติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท Fluorochrome ทำให้สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งส่งตรวจได้และวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้เกือบจะทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน และ Real-Time PCR ยังทำในระบบปิดทำให้สามารถป้องกันการปนเปื้อน (ทั้งจากกระบวนการ PCR และ Gel Electrophoresis) ซึ่งเป็นปัญหาหลักของการทำ PCR ได้ เทคนิค Real time PCR เป็นเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชที่มีประสิทธิภาพ โดยใช้ระยะเวลาเพียง 30 นาที ปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและวิธีการที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับจากประเทศคู่ค้า

เทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมแบบใหม่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Notomi และคณะ (2000) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ดีกว่าเทคนิค PCR ทั้งในด้านของความเร็ว ประสิทธิภาพ ความไว ความแม่นยำ ความจำเพาะ และความประหยัด (Eiken GENOME SITE, 2005) ปัจจุบันเทคนิค LAMP ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในงานทางการแพทย์ เพื่อช่วยในการวินิจฉัยโรคที่เกิดจาก แบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต และมีการนำไปประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ด้วย ซึ่งเป้าหมายของเทคนิคก็คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายอย่างจำเพาะ ถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว

ผลการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซอร์มิทวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตรจะได้ถูกนำมาปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรทั้งส่งออกและนำเข้าให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้ในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า เป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้า และป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชชุกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศไทย นอกจากนี้ยังถูกนำไปใช้ในการตรวจหาศัตรูพืชในแปลงปลูกเพื่อหาวิธีการป้องกันกำจัดที่เหมาะสมได้ทันสถานการณ์การระบาดของศัตรูพืช

ความเชื่อมโยงระหว่างประเด็นปัญหาและกิจกรรมงานวิจัย



บทคัดย่อ

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อ การนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ดำเนินการในช่วงปี พ.ศ. 2563 – 2564 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ พัฒนาการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและ ความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันเข้ามา ในประเทศ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศ คู่ค้า ประกอบด้วย 2 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร ประกอบไป ด้วย 7 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพในการ ตรวจสอบศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย ได้แก่แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Burkholderia glumae*, *Ralstonia solanacearum* species complex, *Pseudomonas fuscovaginae*, ไวรัส African Cassava Mosaic Virus, Sri Lankan cassava mosaic virus และ รา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 เพื่อป้องกันไม่ให้เข้ามารุกรานในประเทศไทยและเป็นเครื่องมือ ในการตรวจสอบติดตามและตรวจหาศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทยเพื่อคงสภาพการเป็นศัตรูพืชกักกัน โดยจากผลการทดลองพบว่า สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชให้ทันสมัย ตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ ทำให้สามารถประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย จะก่อให้เกิดประโยชน์ เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตรของประเทศไทย อีกทั้งสนับสนุนการเตรียมรับมือกับสถานการณ์การแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เป็นไปอย่างรวดเร็วและ รุนแรงในปัจจุบัน

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกัน กำจัดและการส่งออก ประกอบไปด้วย 17 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหา ศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถ ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและ นำไปใช้ในการ นำไปใช้ในการตรวจศัตรูพืชอย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ผลการทดลอง สามารถ พัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล ได้แก่ ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป จำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* เชื้อไฟโต พลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เชื้อไวรัสทริสเทฮาในพืชตระกูลส้ม เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลจำนวน 9 วิธี 10 ชนิดศัตรูพืช ได้แก่ *Phyllosticta citriasiana* ราสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* เชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยเชื้อไวรอยด์ *Pepper chat fruit viroid* แบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M.*

enterolobii แมลงวันแดง *Zeugodacus cucurbitae* และ แมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* และการผลิตแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช จำนวน 5 ชนิดได้แก่แบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* เชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* เชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และซีโมแลกุล และแอนติบอดีที่เฉพาะต่อศัตรูพืชที่ได้ที่พัฒนาได้ในโครงการนี้ สามารถนำไปปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืชให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และเพื่อการป้องกันกำจัด และ ใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศ เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย ย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

Abstract

Research and development project for pest detection by serological and molecular biology technique for the Import and Export of Agricultural Products were Implemented during the year 2017-2021. The objective of the project to develop a highly efficient, rapid, and accurate method of detecting pests by serological and molecular biology techniques for use as a tool to prevent the serious foreign or quarantine pests from entering the country and certify agricultural products for export according to the conditions of trading partner countries, consisting of 2 activities as follows:

Activity 1 Development of quarantine pest detection for agricultural import consists of 7 experiments. The objective of the activity was to develop modern and effective detection methods for quarantine pests: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Burkholderia glumae*, *Ralstonia solanacearum* species complex, *Pseudomonas fuscovaginae*, African cassava Mosaic Virus, virus. Sri Lankan cassava mosaic and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 to prevent invasion in Thailand and maintain the condition of quarantine pests. The results showed that the methods of pest detection are developed as a modern and quickly and accurately, saving time in diagnosis. It will be of great benefit to the development of pest detection techniques for importing agricultural products in Thailand. It also supports preparation to deal with the current fast and severe pest epidemic situation.

Activity 2 Development of pest and natural enemies' detection In the country for pest control and export, 17 experiments were conducted with the aim of developing efficient, rapid and highly accurate pest detection methods using serology and molecular biology techniques for used as a pest certification tool for agricultural exports and rapid detection of pests for pest control. The results showed that methods for detecting pests at the serology and molecular biology method could be developed. Including four serological kits for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, phytoplasma caused sugarcane white leaf disease, *Citrus Tristeza virus*, *Leek yellow stripe virus* and 9 molecular detection methods, 10 pests: *Phyllosticta citriasiana*, *Neoscytalidium* sp. and *N. dimidiatum*, Phytoplasma caused sugarcane white leaf disease, *Pepper chat fruit viroid*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Meloidogyne*

incognita, *M. javanica*, *M. Arenaria*, and *M. enterolobii*, Fruit flies: *Zeugodacus cucurbitae* and *Bactrocera correcta*. In addition, specific antibodies were produced against five plant pathogens: *X. campestris pv. campestris*, *Watermelon silver mottle virus*, *Leek yellow stripe virus*, *sugarcane mosaic virus* and the phytoplasma caused sugarcane white leaf disease.

The methods for pest detection and antibodies specific to the pests developed in this project could be used as a tool to detect pests in agricultural products, prevent serious foreign pests or quarantine pests from entering the country and for the prevention and control of pests for international trade. The methods are accepted for standardized method of pest detection. The methods could detect pests in small quantities and reduce the period of identification for keep up with the international trade situation and prevention and elimination in a timely manner. In addition, it saves money on importing test kits from abroad and It is the development of research by Thai academics to be accepted by foreign countries.

กิจกรรมที่ 1

การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร

ชื่อผู้วิจัย

ณัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล

กาญจนา วาระวิชนี

ทิพวรรณ กันหาญาติ

ชนินทร์ ดวงสอาด

ภูวนารถ มณีโชติ

ชลธิชา รักใคร่

รุ่งนภา ทองเครื่อง

บุรณี พัวพงษ์แพทย์

กาญจนา ศรีไม้

ธารทิพย์ ภาสบุตร

อมรรักษ์ คัดใจเดียว

อภิรัชต์ สมฤทธิ์

มะโนรัตน์ สุดสงวน

สุนัดดา เชาวลิต

วาสนา รุ่งสว่าง

คำสำคัญ (Key words)

การตรวจวินิจฉัย, การตรวจสอบ, เชื้อไวรัส, เทคนิค real-time PCR, เทคนิคทางอณูชีววิทยา, เทคนิคแลมพ์, โรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าว, โรครวงไหม้, โรคเหี่ยวของกล้วย, โรคเหี่ยวและโรคใบไหม้ของข้าวโพด, ศัตรูพืชกักกัน

African cassava mosaic virus (ACMV) bacterial panicle blight, Bacterial Ring Rot disease, blood disease of banana, *Burkholderia glumae*, Cassava Diseases, *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, Detection, Goss's Bacterial Wilt of corn, LAMP, Blight of corn, Plant Health, Plant quarantine, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Ralstonia solanacearum* species complex, *Ralstonia syzigii*, real-time PCR, Real-time PCR technique, seed borne pathogen

กรมวิชาการเกษตร

บทคัดย่อ

การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชชักกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร อยู่ภายใต้โครงการวิจัย และพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออก สินค้าเกษตร ดำเนินการในช่วงปี พ.ศ. 2560 – 2564 ประกอบไปด้วย 7 การทดลอง โดยมี วัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบศัตรูพืชชักกักกัน ของประเทศไทย ได้แก่แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Burkholderia glumae*, *Ralstonia solanacearum* species complex, *Pseudomonas fuscovaginae*, ไวรัส *African Cassava Mosaic Virus*, *Sri Lankan cassava mosaic virus* และ รา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 เพื่อป้องกันไม่ให้เข้ามารุกรานในประเทศไทยและเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบ ติดตามและตรวจหาศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทยเพื่อคงสภาพการเป็นศัตรูพืชชักกักกัน โดยจากผลการ ทดลองพบว่า สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชให้ทันสมัย ตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมี ประสิทธิภาพ ทำให้สามารถประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัย จะก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งใน การพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตรของประเทศไทย อีกทั้งสนับสนุน การเตรียมรับมือกับสถานการณ์การแพร่ระบาดของศัตรูพืชที่เป็นไปอย่างรวดเร็วและรุนแรงในปัจจุบัน

Abstracts

Development of quarantine pest detection for agricultural import were implemented during the year 2017-2021. The objective of the activity was to develop modern and effective detection methods for quarantine pests: *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Burkholderia glumae*, *Ralstonia solanacearum* species complex, *Pseudomonas fuscovaginae*, *African cassava Mosaic Virus*, *virus. Sri Lankan cassava mosaic* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Tropical Race 4 to prevent invasion in Thailand and maintain the condition of quarantine pests, consists of 7 experiments. The results showed that the methods of pest detection are developed as a modern and quickly and accurately, saving time in diagnosis. It will be of great benefit to the development of pest detection techniques for importing agricultural products in Thailand. It also supports preparation to deal with the current fast and severe pest epidemic situation.

กรมวิชาการเกษตร

บทนำ

จากการเปิดการค้าเสรีในโลกยุคปัจจุบัน ทำให้เกิดการแข่งขันทางการค้าระหว่างประเทศเพิ่มมากขึ้น มาตรการกีดกันทางการค้าที่มีใช้ภาษีสศุลกากร (non-tariff barrier, NTB) ถูกนำมาใช้แทน โดยเฉพาะศัตรูพืชมีบทบาทเพิ่มขึ้น โดยมีการนำมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) มาใช้ในการจำกัดการนำเข้าสินค้าเกษตรเพื่อปกป้องและคุ้มครองชีวิตและสุขภาพของมนุษย์พืช สัตว์ภายในประเทศของตนเอง ในด้านที่เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการบริโภคหรือเสี่ยงต่อโรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตที่ติดมากับพืช สัตว์และผลิตภัณฑ์รวมทั้งสารเจือปนในอาหาร สารพิษหรือจุลินทรีย์ที่เป็นพาหะของโรค โดยมีมาตรฐานระหว่างประเทศเพื่อใช้อ้างอิง และตั้งอยู่บนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เชื่อถือได้ โดยมาตรฐานระหว่างประเทศด้านพืชที่ใช้อ้างอิงคือ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention, IPPC) โดยมีองค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) ของแต่ละประเทศดำเนินการตามข้อกำหนด มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชได้ถูกนำมาใช้ในการค้าระหว่างประเทศ โดยประเทศคู่ค้ามักนำมาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช มาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตร โดยอ้างการตรวจพบเชื้อโรคพืชแมลง และอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์ทางการค้าของประเทศ และการออกกฎระเบียบใหม่ใช้ศัตรูพืชกักกันมาเป็นเงื่อนไขในการนำเข้าสินค้าเกษตร ประเทศไทยมีพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และ พระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งเป็นกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร โดยมีกรมวิชาการเกษตรในฐานะ องค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของประเทศไทย ทำหน้าที่กำกับดูแล ต้องทำหน้าที่ในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศไทย และยังต้องทำหน้าที่ในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรในการส่งออก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชที่รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรเพื่อป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และต้องพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ทันสมัย ทันต่อสถานการณ์ มีประสิทธิภาพในการตรวจหาศัตรูพืช และต้องเป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้า ศัตรูพืชแต่ละชนิดต้องใช้เทคนิคในการตรวจหาที่มีความเฉพาะเจาะจงแตกต่างกันไป หากเลือกใช้วิธีการตรวจหาที่ไม่เหมาะสมหรือไม่มีประสิทธิภาพแล้ว จะก่อให้เกิดความเสียหายต่องานการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและงานด้านกักกันพืช โดยเฉพาะการตรวจหาศัตรูพืชจากผลผลิตทางการเกษตรที่ส่งออกและนำเข้า หากวิธีการตรวจหาศัตรูพืชไม่มีประสิทธิภาพ ผลผลิตที่ส่งออกจากประเทศไทยอาจถูกตีกลับมาจากตรวจพบศัตรูพืชตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ทำให้เสียภาพลักษณ์ของประเทศไทย นอกจากนี้อาจทำให้ศัตรูพืชร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันจากต่างประเทศ ติดเข้ามาถึงสินค้าเกษตรนำเข้า ทำให้เกิดการระบาดทำความเสียหายต่อการเพาะปลูกพืชของไทย ที่สำคัญประเทศไทยยังเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์ที่สำคัญโดยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์และส่วนขยายพันธุ์เพื่อการบริโภคภายในประเทศและใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม สำหรับใช้ในประเทศและ

ส่งออกไปยังประเทศต่างๆ ทำให้มีความเสี่ยงที่เป็นเส้นทาง (pathway) ของศัตรูพืชร้ายแรงหรือศัตรูพืช กักกันที่สำคัญที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ ทำให้มีศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงเข้ามาในประเทศไทย ดังนั้นจึงมี ความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืช ที่เหมาะสมและมี ประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตร ป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และต้องพัฒนาวิธีการตรวจหา ศัตรูพืชที่ทันสมัย ทันท่วงสถานการณ์ มีประสิทธิภาพในการตรวจหาศัตรูพืช และต้องเป็นที่ยอมรับของ ประเทศคู่ค้า เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ ค้า

กรมวิชาการเกษตร

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร

การทดลองที่ 1.1 การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยเทคนิค Real time PCR (ปี 2560-2562)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การขออนุญาตนำเข้าแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (ปี 2560)

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศเช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบพก.1) พร้อมเสนอข้อมูลการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เสนอต่อคณะกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

2. ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific primer) (ปี 2560)

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ (primer) ที่ได้มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่ง ได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* คัดเลือกไพรเมอร์จากนั้นนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

3. การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ (Purified genomic DNA) (ปี 2560)

การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่ง อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลาย ใน 1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอน DNA ด้วย TE

buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องspectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

4. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR (ปี 2561)

โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสมตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR เพื่อหา crossing point และ วิเคราะห์หา melting curve

5. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) (ปี 2561-2562)

ทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยใช้ DNA และเซลล์ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยใช้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้ และสภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4 มาทำการทดสอบความจำเพาะและความไวของไพรเมอร์ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

การทดสอบความจำเพาะ (specificity) โดยใช้ DNA และเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* และ แบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง ที่ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 cfu/ml

การทดสอบความไว (sensitivity) โดยใช้ DNA ของ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่ความเข้มข้น 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

6. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวมันฝรั่งที่นำเข้า (ปี 2562)

ทำการสุ่มตัวอย่างหัวมันฝรั่งนำเข้ามาจากด่านตรวจพืช จำนวน 100 หัว นำมาผ่าดูลักษณะอาการของโรคเน่าวงแหวน ตัดเอาส่วนท่อน้ำที่อาหารของตัวอย่างมา ใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge ที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่มีส่วนตะกอนน้ำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้ว

ข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อบนอาหาร semi-selective for *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

- การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกค่า Tm ค่า crossing point และ ค่า melting curve ของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

2. บันทึกโปรแกรมสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

3. บันทึกความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

4. บันทึก ความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA และ เซลล์แบคทีเรีย

การทดลองที่ 1.2 การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้า โดยเทคนิค Real time PCR (ปี 2560-2562)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. การขออนุญาตนำเข้าแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (ปี 2560)

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศเช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบพก.1) พร้อมเสนอข้อมูลการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เสนอต่อคณะกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

2. ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific primer) (ปี 2560)

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ (primer) ที่ได้มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่ง ได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* คัดเลือกไพรเมอร์จากนั้นนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

3. การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ (Purified genomic DNA) (ปี 2560)

การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* สาเหตุโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่ง อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลาย ใน 1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ส่วนน้ำใสข้างบน เติมด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA

pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ เครื่องปั่น vortex เติมด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C ผสมให้เข้ากัน วางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70 % ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องspectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

4. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR (ปี 2561)

โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสมตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR เพื่อหา crossing point และ วิเคราะห์หา melting curve

5. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) (ปี 2561-2562)

ทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยใช้ DNA และเซลล์ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยใช้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้ และสภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4 มาทำการทดสอบความจำเพาะและความไวของไพรเมอร์ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*

การทดสอบความจำเพาะ (specificity) โดยใช้ DNA และเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* และ แบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง ที่ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 cfu/ml

การทดสอบความไว (sensitivity) โดยใช้ DNA ของ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่ความเข้มข้น 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 หน่วยโคลนี/มิลลิลิตร

6. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้า(ปี 2562)

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด ที่นำเข้าจากด่านตรวจพืช ตามวิธีของ ASTA นำมาบดแล้วที่ เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ที่ส่วนตะกอน นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อบนอาหาร semi-selective for *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*

- การบันทึกข้อมูล

- บันทึกค่า Tm ค่า crossing point และ ค่า melting curve ของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*
- บันทึกโปรแกรมสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR
- บันทึกความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*
- บันทึก ความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA และ เซลล์แบคทีเรีย

การทดลองที่ 1.3 การตรวจเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV) ตัวยักษ์ที่ขักกั้น ในมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและอณูชีววิทยา(2560-2561)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. สืบค้นข้อมูล (ดำเนินการปี 2560)

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV) ของมันสำปะหลังจากข้อมูลที่เคยมีรายงานเพื่อใช้ประกอบการสำรวจและวิจัย

2. สำรวจและเก็บตัวอย่าง (ดำเนินการปี 2560-2561)

สำรวจและเก็บตัวอย่างมันสำปะหลังทั้งใบและท่อนพันธุ์ที่สงสัยลักษณะอาการโรคว่าอาจเกิดจากเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV) เข้าทำลาย จากพื้นที่ปลูกสำคัญของประเทศไทยและบันทึกข้อมูลระหว่างการสำรวจได้แก่ ชื่อพืช สถานที่ วันที่ ลักษณะอาการ ส่วนของพืชที่แสดงอาการ ระยะการเจริญเติบโตของพืช และระดับความรุนแรงของโรค เป็นต้น

3. ตรวจสอบตัวอย่างด้วยเทคนิค DAS-ELISA ตามขั้นตอนของบริษัท Agdia (ดำเนินการปี 2560-2561)

เตรียม capture antibody ที่เจือจางด้วย 1X carbonate coating buffer ที่ความเข้มข้น 1 : 200 เติมลงใน ELISA Plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ล้างด้วย 1X PBST แล้วเคาะ plate ให้แห้ง แล้วทำการบดตัวอย่างใบมันสำปะหลังด้วย general extract buffer ในอัตราส่วน 1:10 แล้วเติมสารละลายตัวอย่างพืช, negative control (buffer และ healthy) และ positive control (ตัวอย่างเชื้อไวรัส ACMV, Agdia) เติมลงใน ELISA Plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 1X PBST แล้วเคาะ plate ให้แห้ง เตรียม enzyme conjugate เจือจางด้วย ECI buffer ที่ความเข้มข้น 1 : 200 (เตรียมก่อนใช้งาน 10 นาที) และเติมลงใน ELISA plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 1X PBST แล้วเคาะ plate ให้แห้ง เตรียม PNP substrate โดยละลาย PNP tablet ด้วย PNP solution ที่ความเข้มข้น 1X (ในอัตราส่วน 1 เม็ดต่อ 5 มิลลิลิตร) เตรียมก่อนใช้งานประมาณ 15 นาที แล้วเติมลงใน ELISA plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3M sodium hydroxide ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร และตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยอ่านอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm (O.D. 405 nm) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Rosys Anthos 2010) เปรียบเทียบสีระหว่าง control ทั้ง 3 ชนิด คือ buffer, negative และ positive กับตัวอย่างมันสำปะหลังโดยตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจะให้สีเหลืองเข้ม เมื่อเทียบกับ positive control ของเชื้อไวรัส ACMV (Agdia) และตัวอย่างที่ปกติจะใส

4. สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN

(Germany)

(ดำเนินการปี 2560-2561)

ชั่งตัวอย่างพืช ประมาณ 0.1 กรัม ตัดให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในโถงและเติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้เป็นผงละเอียด ใช้ช้อนตักผงละเอียดที่บดใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันและนำหลอด microcentrifuge tube ไปแช่ที่ 56 °C นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและวางบนน้ำแข็ง นาน 5 นาที นำมาหมุนเหวี่ยงตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใสที่ผ่าน column ทั้งหมดมาเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาณ 650 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column แล้วนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสที่ผ่าน column ทิ้ง แล้วล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้น

นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 80,00 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนน้ำใสที่ผ่าน column ทิ้ง แล้วย้าย column มาซ้อนบนหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทำการเก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

5. ออกแบบไพรเมอร์(ดำเนินการปี 2560)

ทำการเลือกหรือออกแบบไพรเมอร์แบบความจำเพาะเจาะจง (specific primer) และแบบกว้าง (universal primer) โดยอาศัยข้อมูลที่เคยมีรายงานและข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสในวงศ์ *Geminiviridae* ภายใต้วงศ์ *Begomoviruses* ที่มีอยู่ใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) และมาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) หลังจากนั้นใช้โปรแกรม Primer3 (<http://simgene.com/Primer3>) ออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 2 ชุด และคำนวณค่า Annealing Temperature (T_m °C) โดยใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basis.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>)

6. ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) (ดำเนินการปี 2561)

ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH ₂ O)	17.0	ไมโครลิตร
- 10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
- MgCl ₂ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
- dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- platinum Taqmix (Invitogen, 0.1 unit/μl)	0.5	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	ไมโครลิตร
รวม	25.0	ไมโครลิตร

ผสมนำมาส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 1 นาที	
ขั้นที่ 3:	52-56°C	นาน 2 นาที	
ขั้นที่ 4:	72°C	นาน 3 นาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 29 รอบ
ขั้นที่ 5:	72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6:	15°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

นำ DNA PCR product ที่ได้มาปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% gel agarose ที่เตรียม

ในสารละลาย 1X TAE buffer มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้น นำ 1% gel agarose มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที และนำแผ่น 1% gel agarose มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยเปรียบเทียบกับขนาด 100 bp DNA Ladder และทำการบันทึกภาพเพื่อสรุปผลที่เกิดขึ้น

7. เตรียมชิ้นยีนเป้าหมายให้บริสุทธิ์ (ดำเนินการปี 2561)

แยกแถบดีเอ็นเอเป้าหมายตามขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 0.8% agarose gel ในสารละลาย 1X TAE buffer และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ใส่หลอด microcentrifuge tube และชั่งน้ำหนักของเจลต้องไม่เกิน 300 มิลลิกรัม แล้วนำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป (QIAquickGel Extraction Kit, Qiagen, Germany)

8. การโคลนยีนกับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy cloning vector (Promega, USA.) (ดำเนินการปี 2561)

ทำการเชื่อมต่อชิ้นยีนเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy cloning vector (Promega, USA.) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่คอมพีเท็นเซลล์ (competent cell) แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 α ใช้วิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

T4 DNA Ligase 2X buffer	10.0 ไมโครลิตร
PGEM-T easy vector	1.0 ไมโครลิตร
purified PCR product	1.0 ไมโครลิตร
T4 DNA Ligase (3 unit/ μ l)	2.0 ไมโครลิตร
H ₂ O	6.0 ไมโครลิตร
รวม	20.0 ไมโครลิตร

9. เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank (ดำเนินการปี 2561)

ทำการวิเคราะห์ลำดับเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) เพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ทำการเลือกหรือออกแบบไว้สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุได้

การทดลองที่ 1.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR (2562-2564)

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. สืบค้น การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ (2562)

นำเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก International Rice Research Institute (IRRI) เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าว และแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขึ้นตอนตามแนะนำของบริษัท โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูบละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

2. สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์และทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* (2562)

2.1 สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวได้อย่างเฉพาะเจาะจง และคัดเลือกเพื่อส่งสังเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค real-time PCR ต่อไป โดยมีรายงานไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเบื้องต้นจำนวน 4 คู่ ดังนี้

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
BG1F	CCGCGCTGTTTCATGAGGGATAA	138	Kim <i>et al.</i> (2012)
BG1R	CGGGCGGAACGACGGTAAGT		
Forward	ACGTTCAGGGATRCTGAGCAG	282	Sayler <i>et al.</i> (2006)
Reverse	AGTCTGTCTCGCTCTCCCGA		
Glu-FW	GAAGTGTCGCCGATGGAG	529	Maeda <i>et al.</i> (2006)
Glu-RW	CCTTCACCGACAGCACGCAT		
GL-13f	ACACGGAACACCTGGGTA	400	Takeuchi <i>et al.</i> (1997)
GL-14r	TCGCTCTCCCGAAGAGAT		

2.2 ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย

B. glumae

ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์เบื้องต้นจำนวน 4 คู่ ทำการทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) โดยใช้ชุดน้ำยา LightCycler 480 SYBR green I master (Roche Diagnostics, Thailand) ในการทำปฏิกิริยาจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler 480 SYBR Green I Master (Faststart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP, SYBR green dye และ $MgCl_2$), 0.25 uM primer และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* 1 ไมโครลิตร โดยมีขั้นตอนดังนี้ initial-denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที, denaturing 95 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที, annealing 63 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที, extension 72 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที (ทำซ้ำ denaturing, annealing และ extension จำนวน 45 รอบ) และ final extension 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ความถูกต้องของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจากค่า melting temperature (Tm) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิตั้งแต่ 72-95 องศาเซลเซียส โดยเพิ่ม 0.1 องศาเซลเซียส/วินาที เมื่อสิ้นสุดให้ลดอุณหภูมิลงที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที โดยมีรายละเอียดโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:03:00	4.40	none
Amplification	45	95	00:00:10	4.40	none
		63	00:00:20	2.20	none
		72	00:00:15	4.40	none
		72	00:05:00	4.40	single
Melting curve	1	95	00:00:05	4.40	none
		72	00:01:00	2.20	none
		95	00:00:00	0.10	continuous
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

การรายงานผลทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับค่า Cp และการวิเคราะห์ค่า melting curve เนื่องจากในขณะทำปฏิกิริยาเครื่อง LightCycler® 480 จะตรวจจับ SYBR green fluorescence ที่แทรกเข้าไปในสายดีเอ็นเอที่มีการเพิ่มปริมาณในแต่ละรอบ โดยเครื่องจะตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น และแสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semilog curve) ของ SYBR green fluorescence ที่เกิดสะสมในแต่ละรอบของปฏิกิริยา real-time PCR ซึ่ง crossing point (Cp) ของ

แต่ละกราฟเส้นโค้งจะแสดงจำนวนรอบและระดับการสะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มขึ้นสูงกว่า background ค่า C_p จึงใช้เป็นเกณฑ์หนึ่งในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมาย และบอกได้ถึงปริมาณของผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายโดยถ้ามีผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายมากค่า C_p จะต่ำ การวิเคราะห์ค่า melting curve เป็นเกณฑ์ตัวที่สองที่ใช้ในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายเพราะเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดให้ลักษณะ peak สูงสุดของอุณหภูมิหลอมละลาย [melting temperature (T_m)] ที่เฉพาะตัวแตกต่างกันไป ดังนั้นการวิเคราะห์ค่า T_m จึงสามารถใช้ในการจำแนกผลผลิตดีเอ็นเอที่ไม่ใช่เป้าหมายและ primer-dimer ที่เกิดขึ้นได้

3. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* แบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวและแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ ที่ต้องการทดสอบมาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae*

ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเซลล์และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* บนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า จากนั้นเกลี่ยเชื้อให้กระจายบนอาหารด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PSA ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และใช้เซลล์แขวนลอยที่เหลือแต่ละความเข้มข้นจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม และนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* มาปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เท่ากับ 50, 5, 0.5 ng/ul และ 5, 0.5, 0.05, 0.005 pg/ul เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกัน โดยเปรียบเทียบกับ conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997)

5. ทดสอบเทคนิค real-time PCR ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* จากตัวอย่างพืช

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายโรครวงไหม้ของข้าวจากแปลงปลูกข้าวของเกษตรกรเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบ

5.1 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* จากใบหรือกาบใบข้าว

เตรียมตัวอย่างโดยตัดส่วนของใบหรือกาบใบ บดในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media) และ conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) และเตรียมตัวอย่างแบบเดียวกันผสมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวดทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media) และ conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997)

5.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* จากเมล็ดข้าว

เตรียมตัวอย่างโดยแช่เมล็ดจำนวน 20 เมล็ด ในน้ำกลั่นหนึ่งขวดเชื้อ 2 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที มิลลิลิตร ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ และ conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) และเตรียมตัวอย่างแบบเดียวกันผสมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งขวดทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media) และ conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997)

- บันทึกข้อมูล

1. บันทึกค่า Tm ค่า crossing point และ ค่า melting curve ของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ในการตรวจแบคทีเรีย *B. glumae*
2. บันทึกโปรแกรมสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR
3. บันทึกความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *B. glumae*
4. บันทึกความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA และ เซลล์แบคทีเรีย

การทดลองที่ 1.5 พัฒนารูปวิธีการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum species complex* สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย (2562-2564)

- วิธีปฏิบัติทดลอง

1. คัดเลือกไพรเมอร์และทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย (ปี 2562)

1.1 สืบค้นข้อมูลและคัดเลือกไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้อย่างเฉพาะเจาะจง และคัดเลือกเพื่อส่งสังเคราะห์สำหรับใช้ในการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิค PCR ต่อไป โดยมีรายงานคู่ ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจเชื้อเบื้องต้น ดังนี้

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
759	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	281	Opina <i>et al.</i> (1997)
760	GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG		
93F	CGCTGCGCGGCCGTTTCAC	477	Cellier <i>et al.</i> (2015)
93R	CGGTGCGGCATGGGCTTGG		
5F	GCGCGGAGGCTGGTGATGT	661	
5R	TGGGTTTCGAGGCGGACAGC		
Nmult21:1F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	144	Fegan and Prior (2005)
Nmult21:2F	AAGTTATGGACGGTGGAAAGTC	372	
Nmult23:AF	ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT	91	
Nmult22:InF	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	213	
Nmult22:RR	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA		

1.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขึ้นตอนตามแนะนำของบริษัท โดยนำเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ 1 ลูบ ละลายในบัฟเฟอร์ ATL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร จากนั้นเติมด้วย Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมด้วยบัฟเฟอร์ AL ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติมด้วย absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAamp Spin Column ที่สวมอยู่บน collection tube นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เปลี่ยน collection tube ใหม่ แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเติมบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใน QIAamp Spin Column ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที นำ QIAamp Spin Column ใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วเติมด้วยบัฟเฟอร์ AE ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบต่อไป

1.3 ทดสอบสถานะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคหิวของกล้วย

ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคหิวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ปริมาตรรวมในการทำปฏิกิริยา PCR 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 50 ng/ μ l, 1X TopTaq Master Mix (QIAGEN Inc., USA) และไพรเมอร์ 0.5 μ M เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ Biometra® (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Germany) กำหนดอุณหภูมิและเวลาให้เริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที แยกสาย ดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR มาตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) โดยใช้ 2% agarose ใน 0.5X TBE ใช้กระแสไฟฟ้าที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 25 นาที ย้อมดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง gel documentation

2. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคหิวของกล้วย (ปี 2563)

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ μ l เพื่อนำไปทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค PCR ด้วยสถานะที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับคู่ไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

3. ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคหิวของกล้วย (ปี 2563)

3.1 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเซลล์เชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR

โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า จากนั้นเกลี่ยเชื้อให้กระจายบนอาหารด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PSA ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และใช้เซลล์แขวนลอยที่เหลือแต่ละความเข้มข้นจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสถานะที่เหมาะสม และเตรียมตัวอย่างโดยตัดบริเวณ vascular ของตัวอย่างกล้วยที่ไม่เป็นโรค บดในน้ำเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เจือจาง

โดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media) โดยเปรียบเทียบกับคูไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

3.2 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เท่ากับ 50, 5, 0.5 ng/ul และ 5, 0.5, 0.05, 0.005 pg/ul เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม เช่นเดียวกัน โดยเปรียบเทียบกับคูไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

4. ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR (ปี 2563)

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคเหี่ยวของกล้วยเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบ

4.1 ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากตัวอย่างพืช

4.1.1 สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

เตรียมตัวอย่างโดยตัดบริเวณ vascular ของตัวอย่างกล้วย บดในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขึ้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท ใช้ดีเอ็นเอจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับคูไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

4.1.2 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Zou *et al.* (2017)

เตรียมตัวอย่างโดยตัดบริเวณ vascular ของตัวอย่างกล้วย บดใน extraction buffer #1 (50 mM Tris [pH8.0], 150 mM NaCl, 2% PVP, 1% Tween-20) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประมาณ 30 วินาที นำกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ลงไปแช่นาน 3 วินาที จากนั้นล้างกระดาษกรองด้วย wash buffer (10 mM Tris [pH8.0], 0.1% Tween-20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นาน 1 นาที ใช้แผ่นกระดาษกรองจำนวน 1 แผ่น สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับคูไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

4.1.3 เตรียมตัวอย่างตามวิธีการของ OEPP/EPPO (2018)

เตรียมตัวอย่างโดยตัดบริเวณ vascular ของตัวอย่างกล้วย ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70% ซับให้แห้ง แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดใน 50 mM Phosphate buffer pH 7 จำนวน 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ใช้ส่วนน้ำใสเกลี่ยให้กระจายบนอาหารด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับคูไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

4.2 ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากดิน

4.2.1 สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

เตรียมตัวอย่างโดยชั่งดิน 10 กรัม เขย่าในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน 15 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขั้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท ใช้ดีเอ็นเอจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับคูไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

4.2.2 สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Zou *et al.* (2017)

เตรียมตัวอย่างโดยชั่งดิน 10 กรัม เขย่าในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ดินตกตะกอน 15 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมาปั่นตกตะกอนแล้วละลายตะกอนด้วย extraction buffer #1 (50 mM Tris [pH8.0], 150 mM NaCl, 2% PVP, 1% Tween-20) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประมาณ 30 วินาที นำกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ลงไปแช่นาน 3 วินาที จากนั้นล้างกระดาษกรองด้วย wash buffer (10 mM Tris [pH8.0], 0.1% Tween-20) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นาน 1 นาที ใช้แผ่นกระดาษกรองจำนวน 1 แผ่น สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ด้วยสภาวะที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับคูไพรเมอร์ 759/760 (Opina *et al.*, 1997)

- บันทึกข้อมูล

1. บันทึกโปรแกรมสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา PCR
2. บันทึกความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR
3. บันทึกความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR
4. บันทึกวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR

การทดลองที่ 1.6 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* ในข้าวด้วยเทคนิค LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) (2563-2564)

- วิธีปฏิบัติทดลอง

- 1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ (2563)

นำเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* เชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลในข้าว และแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ ที่เก็บรักษาไว้ใน culture collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืช มาเลี้ยงบนอาหาร Potato semi-synthetic agar (PSA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) ขึ้นตอนตามแนะนำของบริษัท เก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2 ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* (2563)

ดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าวด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ไพรเมอร์เซต ดังนี้

Primer set	Single primer	Sequence (5'-3')	Reference
Pf3	F3	GAATTCCTGTTCTATGATTCCT	Ash <i>et al.</i> (2014)
	B3	TTGAGCAGACTCATGATTCAG	
	FIP	TCACGCACAACTGTTCTGGTTGCAGA GCAATAATCGCTAT	
	BIP	AAAGGCCGGGTACGCAACTCTGGTAGC TCTTCATCTGT	
	LoopF	GCCGACTTCAGCACATCT	
	LoopB	TACGCCAGCAAGATCACG	
Pf3	F3	TGTGTTTCAGTTCCTTCATCG	Ash <i>et al.</i> (2014)
	B3	TAACAGCGTCACGTTCTTC	
	FIP	GATCATCAGCGGGACTGTCAGGGTGAG GTCTACGAGAAATTC	
	BIP	CGACGGCGATTTTCGTTGCGTTATACAA CAACGCTTGCC	
	LoopF	TGAGAAACGCCTTCTGGTC	
	LoopB	TGTGCTGTGCCTGATTCTT	

ทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP โดยการหาความเข้มข้นของสารในการทำปฏิกิริยา อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์เซตที่กล่าวข้างต้น ปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยชุดไพรเมอร์ 1.6 μ M FIP และ BIP, 0.2 μ M F3 และ B3 primer, 0.4 μ M loop B primer, 0.4 μ M dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100 และ cell suspension ของเชื้อที่ต้องการทดสอบ บ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งก่อน แล้วเติม 8U *Bst* DNA polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส

3 ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา LAMP ด้วยวิธีต่างๆ (2564)

3.1 วิธี gel electrophoresis เพื่อดูผลของปฏิกิริยา โดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 2% ใน 1X TBE (88.9 mM Tris, 8.9 mM boric acid, 2.5 mM EDTA) และใช้ Hyper ladder II (Bioline, USA) เป็น ดีเอ็นเอมาตรฐาน และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 85 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

3.2 วิธีการดูความขุ่นที่เกิดขึ้น โดยหลังจากเสร็จปฏิกิริยาแล้วจึงเติม 10 mU Tth-pyrophosphatase ทำให้เกิดตะกอนสีขาวของ magnesium pyrophosphate ขึ้น สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า

3.3 วิธีการดูสีฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ 50 μ M calcein เพิ่มเติมในปฏิกิริยา เมื่อปฏิกิริยาเป็นบวก สาร calcein จะจับกับ magnesium มีสาร pyrophosphate เกิดขึ้น สาร pyrophosphate จะแย่งจับกับ magnesium ทำให้สาร calcein เป็นอิสระจึงให้แสงฟลูออเรสเซนซ์ออกมา จากนั้นเลือกวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบ

4 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* (2564)

นำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* แบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวและแบคทีเรียสาเหตุโรคอื่นๆ ที่ต้องการทดสอบ มาวัดความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul เพื่อนำไปสำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ทำซ้ำ 3 ซ้ำ

5 ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* (2564)

ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเซลล์และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค LAMP โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* บนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า จากนั้นเกลี่ยเชื้อให้กระจายบนอาหารด้วยวิธี spread plate บนอาหาร PSA ความเข้มข้นละ 4 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้น และใช้เซลล์แขวนลอยที่เหลือแต่ละความเข้มข้นจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม และนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* มาปรับระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เท่ากับ 50, 5, 0.5 ng/ul และ 5, 0.5, 0.05, 0.005 pg/ul เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสมเช่นเดียวกันทำซ้ำ 3 ซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับ conventional PCR

5 ทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* จากตัวอย่างพืช (2564)

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าว จากแปลงปลูกข้าวของเกษตรกรเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบ

5.1 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* จากกาบใบข้าว เตรียมตัวอย่างโดย ตัดส่วนของใบหรือกาบใบ บดในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจสอบยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media) และ conventional PCR และเตรียมตัวอย่างแบบเดียวกันผสมกับเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจสอบยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media) และ conventional PCR

5.2 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* จากเมล็ดข้าว เตรียมตัวอย่างโดย แช่เมล็ดจำนวน 20 เมล็ด ในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร เขย่า 30 นาที มิลลิลิตร ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจสอบยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ และ conventional PCR และเตรียมตัวอย่างแบบเดียวกันผสมกับเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ปรับระดับความเข้มข้นของเชื้อโดยใช้ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.1 ด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้เจือจางโดยวิธี tenfold serial dilution ตั้งแต่ 10^{-1} - 10^{-8} เท่า ใช้ส่วนน้ำใสจำนวน 1 ไมโครลิตร สำหรับทำปฏิกิริยา LAMP ด้วยสภาวะที่เหมาะสม ตรวจสอบยืนยันด้วยการเลี้ยงบนอาหารเฉพาะ (selective media) และ conventional PCR

บันทึกข้อมูล

1. บันทึกค่า Tm ค่า crossing point ของไพรเมอร์ที่คัดเลือกไว้ในการตรวจแบคทีเรีย *P. fuscovaginae*

2. บันทึกโปรแกรมสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP

3. บันทึกความจำเพาะ (specificity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *P.*

fuscovaginae

4. บันทึกความไว (sensitivity) ของไพรเมอร์ในการตรวจแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ DNA และ เซลล์แบคทีเรีย

- ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2562 – กันยายน 2564

- สถานที่ดำเนินการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพมหานคร

การทดลองที่ 1.7 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (2564)

- วิธีปฏิบัติการทดลอง

1 การทดสอบการสกัดดีเอ็นเอ (2564)

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture ของรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense*

เขียนเส้นใยของรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ Doungsa-ard, et al. (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพราย ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Doungsa-ard, et al. (2015) โดยปรับปริมาณของเนื้อเยื่อที่ใช้ตั้งต้น ปรับวิธีการในการตอนของ cell lysis และการตกตะกอนโปรตีน

1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพราย ทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Doungsa-ard, et al. (2015) โดยปรับปริมาณของเนื้อเยื่อที่ใช้ตั้งต้น ปรับวิธีการในการตอนของ cell lysis และการตกตะกอนโปรตีน

2 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 (2564)

ไพรเมอร์ ได้แก่

TR4-F2	CAG GCC AGA GTG AAG GGG GAT
TR4-R1	CGC CAG GAC TGC CTC GTG A
FocTR4-F	CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG
FocTR4-R1	CGCACGCCAGGACTGCCTCGTGA
FocTR4-R2	GCCAGGACTGCCTCGTGA
EF-1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC
EF-2	GGARGTACCAGTSATCATGTT
Ban-Actin2-F	ACAGTGCTGGATTGGAGGC
Ban-Actin2-R	GCACTTCATGTGGACAATGG

2.1 นำไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR กับ Plasmid DNA standard ของ Foc TR4

2.2 นำไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR กับ DNA template จาก clean culture ของรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ของ Foc TR4

2.3 นำไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR กับ DNA template จาก ตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพราย

2.4 นำไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR กับ DNA template จาก ตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพราย

3 ตรวจสอบชนิดของ Foc TR4 (2564)

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) ของตัวอย่างจาก clean culture ที่ทำปฏิกิริยากับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับ FocTR4 มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบชนิด โดยวิธี phylogenetic reconstruction

บันทึกข้อมูล

1. บันทึกข้อมูล เก็บรักษาตัวอย่างแห้ง สายพันธุ์เชื้อราและเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ตัวอย่างเก็บรักษาในรูปแบบตัวอย่างแห้ง ดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พืชไร่โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

- ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2563 – กันยายน 2564
- สถานที่ดำเนินการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพมหานคร

การทดลองที่ 1.8 การตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic* วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. ตัวอย่างมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง (ปี 2564)

เก็บมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างหรือใบเหลือง เสียรูปทรง จากแหล่งปลูกมันสำปะหลังในจังหวัดอุบลราชธานี ศรีสะเกษ สุรินทร์ บุรีรัมย์ สระแก้ว ปราจีนบุรี และ นครราชสีมา ทำการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ในห้องปฏิบัติการ

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างมันสำปะหลัง

สกัดดีเอ็นเอจากใบมันสำปะหลังที่เก็บมาด้วย DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

2.1 บดใบพืช 100 มิลลิกรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด แล้วย้ายใบพืชที่บดละเอียดมาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ AP1 ปริมาตร 400 มิลลิลิตรและเติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 65 °C นาน 10 นาที

2.2 เติมน้ำบัฟเฟอร์ P3 ปริมาตร 130 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ววางบนน้ำแข็ง 5 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสที่ได้ใส่ใน Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที แล้วดูดส่วนใสที่ได้ใส่ในหลอด ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.3 เติมน้ำบัฟเฟอร์ AW1 ปริมาตร 1.5 เท่าของส่วนใสที่ได้ ผสมให้เข้ากัน แล้วดูดส่วนผสมนั้น ไปใส่ใน DNeasy mini spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm นาน 1 วินาที แล้วทิ้งส่วนของเหลวใส

2.4 เติมน้ำบัฟเฟอร์ AW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 วินาที ทิ้งส่วนของเหลวใส แล้วนำ DNeasy mini spin column มาวางบนหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Nuclease free water ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บ DNA ที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3. ตรวจสอบตัวอย่างมันสำปะหลังด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) (2564)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเชื้อไวรัสในตัวอย่างมันสำปะหลัง ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส SLCMV ซึ่งจะได้นาขนาดชิ้น DNA 600 คู่เบส (Jose *et al.*, 2008) ดังนี้

SLCMV-F TGTAATTCTCAAAGTTACAGTCN และ

SLCMV-R ATATGGACCACATCGTGTCN

โดยทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร โดยมีส่วนผสมของปฏิกิริยาและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังนี้

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร

2x master mix buffer	10 ไมโครลิตร
Forward primer (10 pmole)	1 ไมโครลิตร
Reverse primer (10 pmole)	1 ไมโครลิตร
Nuclease-free water	6 ไมโครลิตร
DNA template	2 ไมโครลิตร
รวม	20 ไมโครลิตร

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR

1) Predenaturation	94 °C	5 นาที
2) Three step-cycling	35 cycles	
Denaturation	94 °C	30 วินาที
Annealing	56 °C	30 วินาที

Extension 72 °C 90 วินาที

3) Final extension 72 °C 7 นาที

เมื่อเสร็จสิ้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแล้วจะนำมาตรวจสอบบน 1% agarose gel แล้วย้อมด้วย GelRed แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Imaging System (Biorad, USA)

4. การเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อ SLCMV ด้วยเทคนิค Rolling circle amplification (RCA)

เพิ่มปริมาณจีโนมเชื้อไวรัสในตัวอย่างมันสำปะหลังโดยเลือกตัวอย่างไวรัสจังหวัดละ 1 ตัวอย่าง ด้วยชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสำเร็จรูป TempliPhi 100 Amplification Kit (GE Healthcare, Germany) ตามวิธีการที่แนะนำของของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

4.1 ตูตดีเอ็นเอของมันสำปะหลังที่เป็นโรคใบต่าง ๆ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับ Sample buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่ 95 °C นาน 5 นาที เมื่อครบเวลานำมาวางบนน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที

4.2 เติม Reaction buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และเติม Enzyme mix ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 4–18 ชั่วโมง

4.3 เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 10 นาที ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณจีโนมไวรัสบน 1% agarose gel แล้วย้อมด้วย GelRed แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Imaging System (Biorad, USA)

5. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัสด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) (จี 2564)

แยกจีโนมเชื้อไวรัสออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป FavorPrep GEL/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต แล้วตรวจสอบขนาดและปริมาณ DNA ที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ทำการวัดปริมาณจีโนมเชื้อไวรัสด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร (O.D.) ด้วยเครื่อง Multiskan GO ELISA reader (Finland) ค่าสัดส่วนของ O.D.260/O.D.280 ที่มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 1.8 - 2.2 ถือว่าดีเอ็นเอของจีโนมไวรัสที่ได้มีความบริสุทธิ์มาก โดยให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอจีโนมของไวรัส ≥ 2 ng/ul ปริมาตร > 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำจีโนมไวรัสที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัสด้วยการทำ *De novo* Whole Genome Sequencing ด้วยเครื่อง Illumina HiSeq instrument (Illumina, San Diego, CA, USA)

6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัส

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัสจาก Illumina HiSeq Sequence ด้วยซอฟต์แวร์ Geneious Prime 2019.0.4 โดยการนำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ขนาดประมาณ 150 นิ

วคลีโอไทด์ มาทำการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสต้นแบบที่มีรายงานใน GenBank เช่น เชื้อไวรัส SLCMV ที่พบในประเทศกัมพูชา เวียดนาม จีน ศรีลังกา และ อินเดีย เป็นต้น เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมไวรัสที่สมบูรณ์ของแต่ละตัวอย่างแล้ว จะนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ SLCMV กับเชื้อไวรัสที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ SLCMV ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 10

บันทึกข้อมูล

1. บันทึกลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมไวรัสด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS)
2. บันทึกผลการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสต้นแบบที่มีรายงานใน GenBank
3. บันทึกความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ SLCMV ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree
 - ระยะเวลาดำเนินการ ตุลาคม 2563 – กันยายน 2564
 - สถานที่ดำเนินการ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรุงเทพมหานคร

ผลการทดลองและอภิปราย (Results and Discussion)

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร

การทดลองที่ 1.1 การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยเทคนิค Real time PCR (ปี 2560-2562)

1. การเตรียม DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

สืบค้นยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จาก Gen Bank :ซึ่งเป็นยีนที่ใช้สำหรับออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้รายละเอียดดังนี้

ชื่อแบคทีเรีย	Accession number
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> LMG 2889	U09382
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> LMG 2901	JN613837
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i> K0090	HM181750

ดำเนินการสังเคราะห์ของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากบริษัท Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH ประเทศเยอรมันนี เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

2. การคัดเลือก probe สำหรับ Real-Time PCR

สืบค้นข้อมูล probe สำหรับ Real-Time PCR ที่ใช้สำหรับตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่ได้มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่ง ได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* คัดเลือกได้ Cms probe ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ตามรายงานของ Bach et al (2003) โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้

Cms probe FAM -5' TTCCGTCGTCCTTGAGTGGAT3' -TAMRA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ probe ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการทดสอบการสภาพที่เหมาะสมและการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

3. การทดสอบ DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

ทดสอบ DNA positive control ที่สังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ด้วย conventional PCR และ Real-Time PCR ผลการทดสอบพบว่า การทดสอบด้วย conventional PCR โดยใช้ไพรเมอร์ FP

Cm/RP Cm primer ที่เฉพาะเจาะจงกับ แบคทีเรียกลุ่ม *Clavibacter michiganensis* พบว่าดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อ 3 สายพันธุ์ ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp ได้แก่ สายพันธุ์ LMG 2889, LMG 2901 และ K0090 (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับผลทดสอบด้วย Real-Time PCR โดยใช้ Cms probe ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อ 3 สายพันธุ์ จึงใช้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็น DNA positive control สำหรับทดลองต่อไป

4. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

ผลการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR สำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

นำดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มาวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) ในการทำปฏิกิริยาจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Thailand), 0.25 uM primer, 0.25 uM probe, น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 1 ไมโครลิตร โดยมีรายละเอียดโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:10:00	4.40	none
Amplification	40	95	00:00:20	4.40	none
		66	00:01:00	2.20	none
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

5. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR

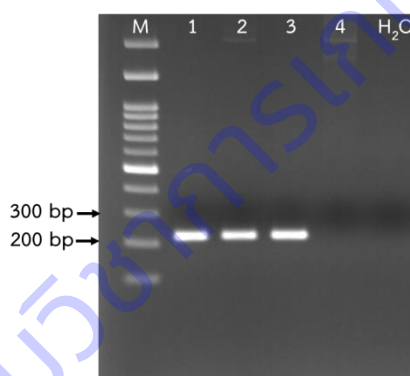
ผลทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยใช้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้

การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เท่านั้นไม่เพิ่มกับเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 2)

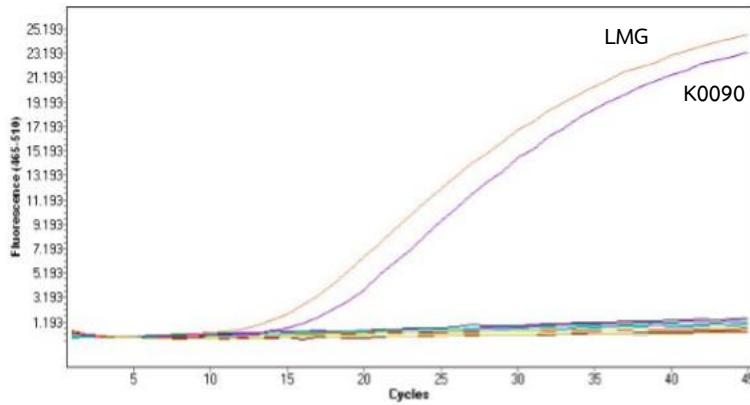
การทดสอบความไว โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม ผลการทดสอบพบว่า สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอ คือ 25 pg/ ปฏิกริยา (ภาพที่ 3)

6. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้า

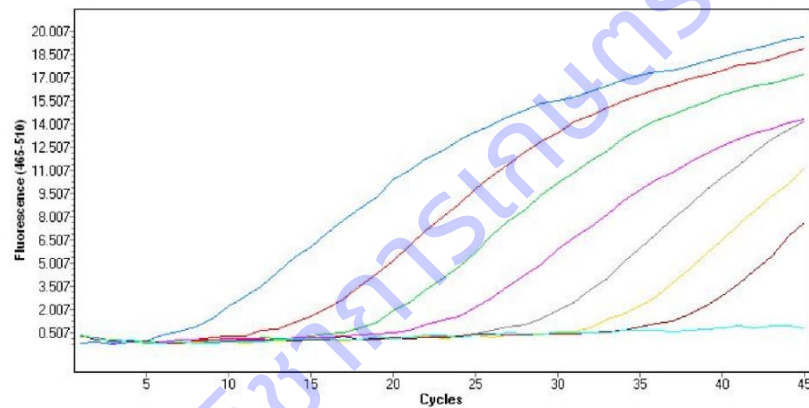
สุ่มเก็บตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย จำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อและตรวจด้วย Real time PCR ผลการแยกเชื้อไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากนั้นดำเนินการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำส่วนที่เป็นน้ำใสจากตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่หลอด ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้และตัวอย่างมันฝรั่งที่นำเข้าจากออสเตรเลีย 12 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (ภาพที่ 4)



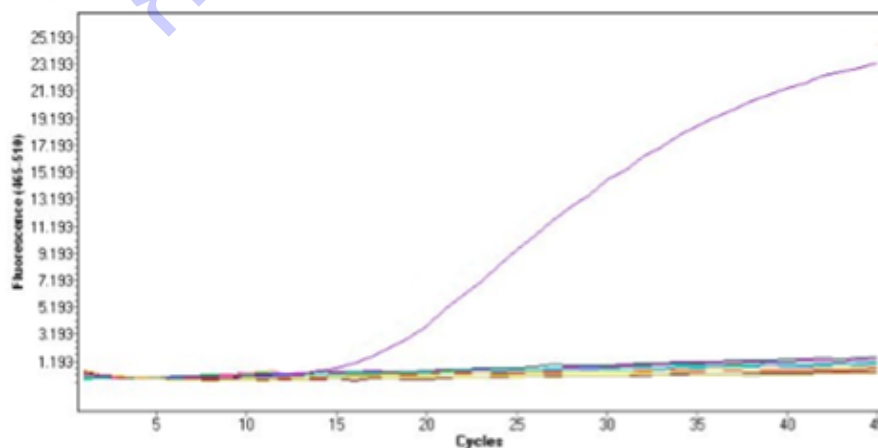
ภาพที่ 1 แสดงผลทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ด้วย conventional PCR โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน OneMark 100
 ช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* LMG 2889
 ช่อง 2 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* LMG 2901
 ช่อง 3 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* K0090
 ช่อง 4 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1405



ภาพที่ 2 แสดงผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับแบคทีเรียชนิดอื่นที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*



ภาพที่ 3 แสดงผลทดสอบความไวของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*



ภาพที่ 4 แสดงผลการตัวอย่างหัวมันฝรั่งนำเข้าจากประเทศด้วย Real time PCR

การทดลองที่ 1.2 การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*
จากเมล็ดวิธีปฏิบัติการทดลอง

2. การเตรียม DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*

สืบค้นยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จาก Gen Bank :ซึ่งเป็นยีนที่ใช้สำหรับออกแบบไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ได้รายละเอียดดังนี้

ชื่อแบคทีเรีย	Accession number
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> ATCC27794	JX216836
<i>C. michiganensis</i> subsp. <i>nebraskensis</i> NCPPB2578	JX216839

ดำเนินการสังเคราะห์ของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากบริษัท Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH ประเทศเยอรมันนี้ เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

2. คัดเลือก specific primer

ดำเนินการสืบค้นข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนที่สำคัญของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ใน GenBank เพื่อนำมาออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยพบว่ายีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือ ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer โดยได้ไพรเมอร์ดังนี้

FP Cm primer 5'-TGTCGAGGGCATGTTGCACG-3'

RP Cm primer 5'-GGAGACAGAATTGACCAATGAT-3'

Cmn probe FAM -5' TTCCGTCGTCCTTTCGTGGATG 3' -TAMRA

3. การสกัด genomic DNA และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

ทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ด้วย conventional PCR พบว่าดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อสายพันธุ์ NCPPB2578 ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับผลทดสอบด้วย real time PCR จึงใช้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อสายพันธุ์ NCPPB2578 เป็น DNA positive control สำหรับทดลองต่อไป

ผลการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR สำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

นำดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* มาวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอในช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) ในการทำปฏิกิริยาจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Thailand), 0.25 uM primer, 0.25 uM probe, น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 1 ไมโครลิตร โดยมีรายละเอียดโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:10:00	4.40	none
Amplification	40	95	00:00:20	4.40	none
		66	00:01:00	2.20	none
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

4. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR

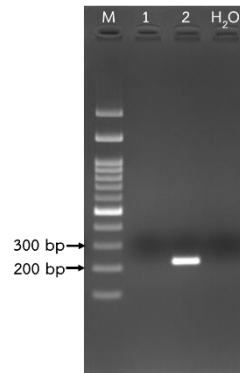
การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cmn probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 2)

การทดสอบความไว โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม ผลการทดสอบพบว่า สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 50 pg/ ปฏิกิริยา (ภาพที่ 3)

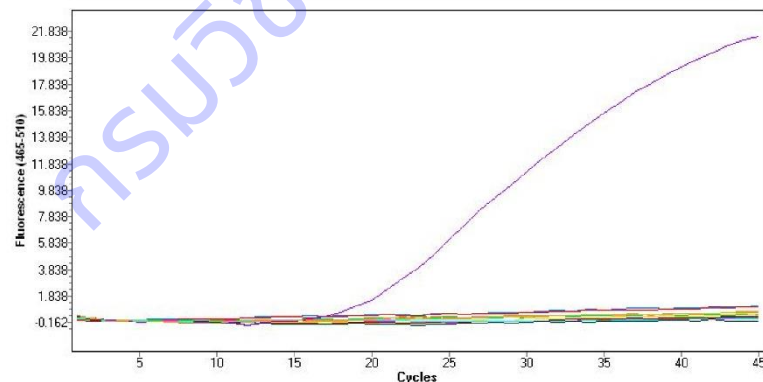
5. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้า

สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา จำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อและตรวจด้วย Real time PCR ผลการแยกเชื้อไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากนั้นดำเนินการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำ

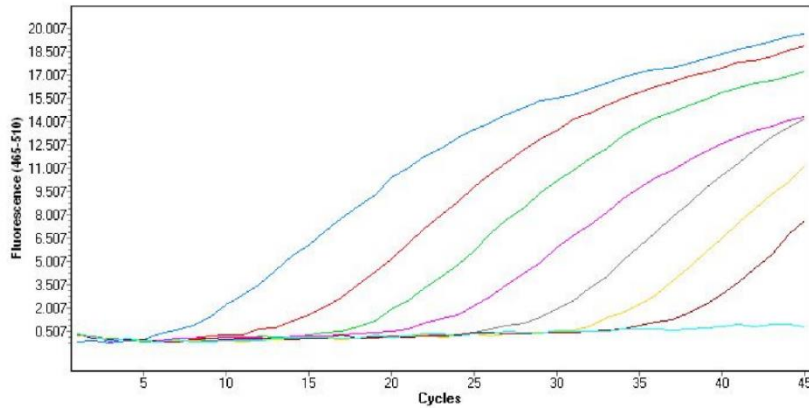
ส่วนบนที่เป็นน้ำใสจากตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่หลอด ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้และเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้ามาจากประเทศสหรัฐอเมริกา 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (ภาพที่ 4)



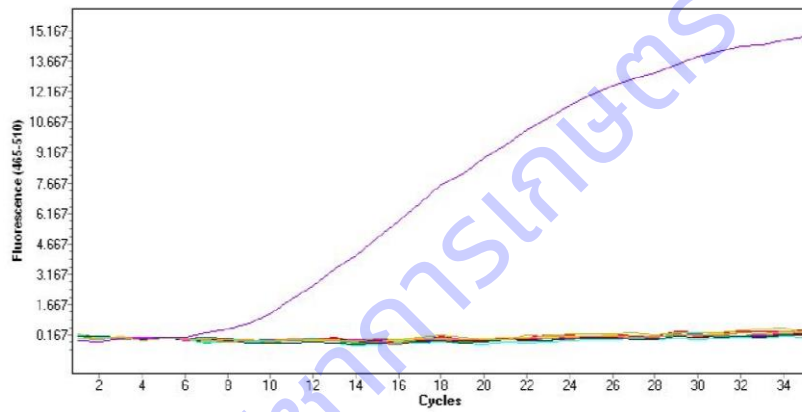
ภาพที่ 1 แสดงผลทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ด้วย conventional PCR โดยช่อง M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน OneMark 100
 ช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ATCC27794
 ช่อง 2 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* NCPPB2578



ภาพที่ 2 แสดงผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับแบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดพบว่าไพรเมอร์ Cmn probe มีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*



ภาพที่ 3 แสดงผลทดสอบความไวของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*



ภาพที่ 4 แสดงผลการตัวอย่างหัวพันธุ์เมล็ดข้าวโพดนำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาด้วย Real time PCR

การทดลองที่ 1.3 การตรวจเชื้อไวรัส *African cassava mosaic virus* (ACMV) ศัตรูพืชกักกัน ในมันสำปะหลัง ด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและอณูชีววิทยา

1.ผลการสืบค้นข้อมูล

เชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง (Cassava Mosaic Viruses, CMVs) อยู่ใน Family *Geminiviridae* Genus *Begomovirus* จากรายงานพบประมาณ 10 ชนิด ได้แก่ *African cassava mosaic virus* (ACMV), *East African cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV), *East African cassava mosaic Kenya virus* (EACMKV), *East African cassava mosaic Malawi virus* (EACMMV), *East African cassava mosaic virus* (EACMV), *East African cassava mosaic Zanzibar virus* (EACMZV), *Indian cassava mosaic virus* (ICMV), *South African cassava mosaic virus* (SACMV), *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) และ *East African cassava mosaic virus-Uganda* (EACMV-UG) พบทำลายมันสำปะหลังในแถบแอฟริกา อเมริกาใต้ อเมริกา กลาง และแถบกลุ่มประเทศเอเชียแปซิฟิก (Thottappilly *et al.*, 2003) ติดมาได้กับท่อนพันธุ์และมีแมลงห้ำขาวยาสูบ (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะแบบ persistent circulative ใช้เวลาถ่ายทอดเชื้อไวรัสประมาณ 10 นาที ก็มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการก่อให้เกิดโรคได้ (Fauquet and Fargette., 1990) สำหรับเชื้อไวรัส ACMV เป็นศัตรูพืชสำคัญชนิดหนึ่งที่มีอยู่ในแนบท้ายประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้าม ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญกับมันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทย แต่ขณะนี้ยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัส ACMV ในประเทศไทย

2.ผลการออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง (CMVs) โดยเฉพาะเชื้อไวรัส ACMV ดำเนินการโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกัน (Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ตัวแทนจากฐานข้อมูล GenBank นำมาวิเคราะห์ด้วย Clustal Omega programs และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ MEGA 7.026 programs (maximum-likelihood method, 500 bootstrap replicates) พบว่า ตัวแทนเชื้อไวรัส CMVs ทั้ง 10 ชนิดมีความคล้ายกัน (Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่า 90% ทั้งนี้ ตามเงื่อนไขของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ฉบับที่ 9 สำหรับการจำแนกเชื้อไวรัสในจีนัส *Begamovirus* ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์แบบครบสมบูรณ์ (Whole genome) ถ้ามีความคล้ายกัน (Identity) น้อยกว่า 90% จัดเป็นเชื้อไวรัสคนละชนิด (Fauquet *et al.*, 2003 ; Alabi *et al.*, 2011) (ตารางที่ 1) (ภาพที่ 1) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จากข้อมูลข้างต้น ได้ไพรเมอร์จำนวน 2 ชุด สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส ACMV และเชื้อไวรัส CMVs ภายใต้ Genus *Begamovirus* Family *Geminiviridae* ด้วยเทคนิค PCR มีความถูกต้อง และแม่นยำ ดังนี้

ชุดที่ 1 ประกอบด้วยไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์คู่ที่ 1.1 สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV ได้อย่างแม่นยำ สำหรับ positive control ได้สั่งจ้างบริษัทการค้าทำการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัส ACMV ส่วน AV2 gene (pre coat protein gene) ร่วมกับ AV1 gene (coat protein gene) จำนวน 937 bp (**ภาพที่ 2**) ไพรเมอร์คู่ที่ 1.2 สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง (CMVs) ได้ทั้ง 10 ชนิด จึงทำให้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสกัดกัน (interception) และตรวจเฝ้าระวัง (monitoring) เชื้อไวรัสกลุ่มนี้ได้ครอบคลุม และไพรเมอร์คู่ที่ 1.3 เลือกออกแบบให้มีลำดับเบสคล้ายกับเชื้อไวรัส ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) ซึ่งทั้ง 3 ชนิด เป็นศัตรูพืชสำคัญที่อยู่ในบัญชีพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 6) รวมทั้งไพรเมอร์ชุดนี้ออกแบบให้มีลำดับเบสคล้ายกับ SLCMV ด้วย เนื่องจากปัจจุบันมีข้อมูลการแพร่ระบาดของเชื้อดังกล่าวในประเทศกัมพูชา และเวียดนาม (Wang H. L *et al.*, 2016; Uke A *et al.*, 2018 ; Minato *et al.*, 2019)

ชุดที่ 2 ประกอบด้วยไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์คู่ที่ 2.1-2.4 ที่คาดหวังว่าจะสามารถใช้สำหรับตรวจแยกเพื่อระบุชนิดเชื้อไวรัสที่เป็นศัตรูพืชสำคัญที่อยู่ในบัญชีพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 6) ทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) รวมทั้ง SLCMV ด้วย (**ตารางที่ 2**)

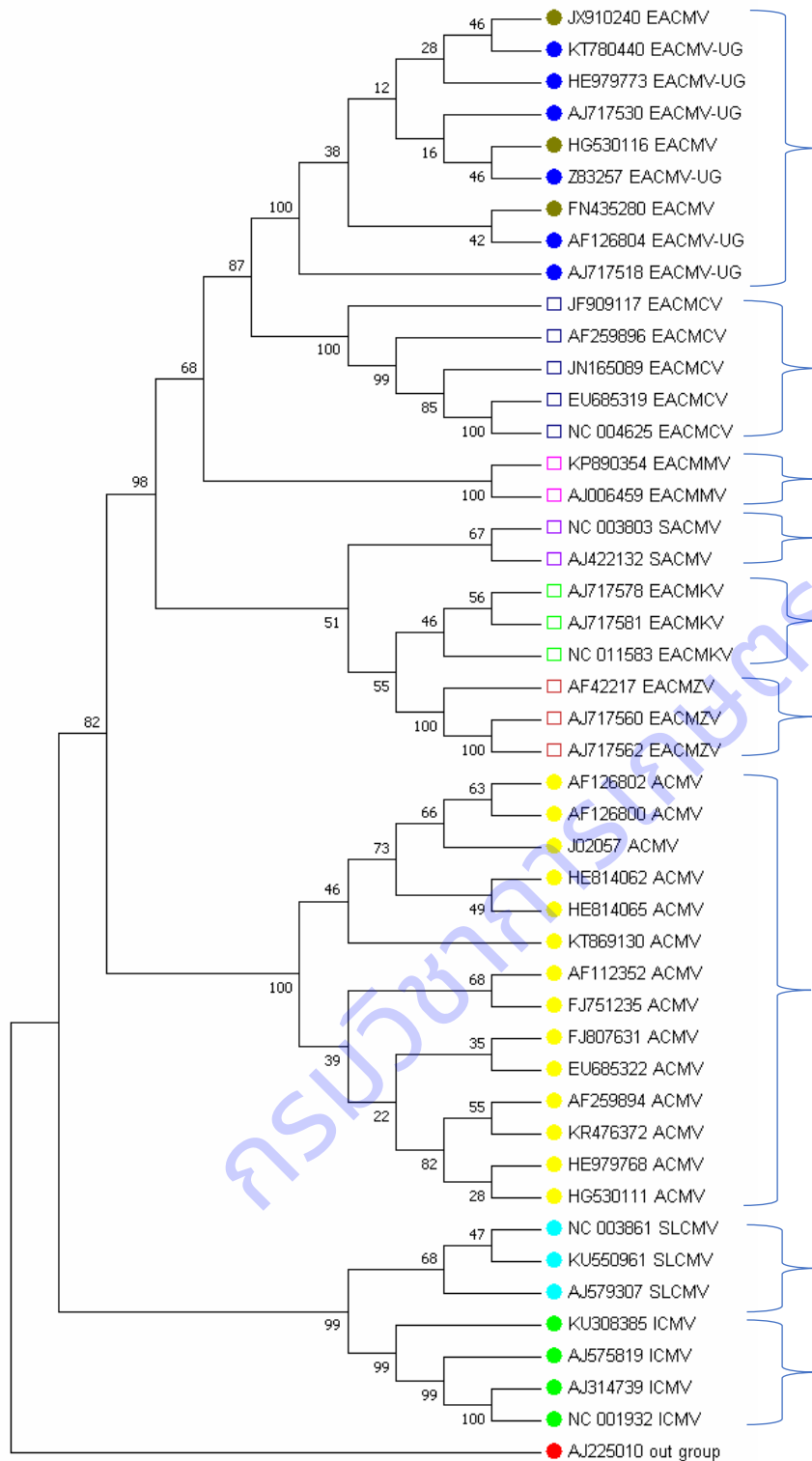
นอกจากนี้ ได้นำคู่ไพรเมอร์ GEM-U-CP-F1/ GEM-U-CP-R1 ซึ่งเป็น universal primer นำมารวมใช้สำหรับงานทดลองครั้งนี้ด้วย ซึ่งเป็นคู่ไพรเมอร์ที่ได้ทดสอบแล้วว่าสามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสในส่วน partial AV1 gene ใน Family *Geminiviridae* Genus *Begomovirus* ได้ด้วยเทคนิค PCR แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 500 เบส (กาญจนาและคณะ, 2555) และคู่ไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาใช้เปรียบ

ตารางที่ 1 แสดง Accession No. DNA-A เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง 10 ชนิด
จากฐานข้อมูล GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Species	Accession No. of DNA-A
<i>African cassava mosaic virus(ACMV)</i>	HE814062, HE814065, KT869130, AF126802, AF126800, Z83252, J0205, N053431, FJ807631, HE979768, AF112352, AJ427910, EU685322, AF366902, FJ751235, GQ204109, FJ751234, AF259894, KR476372, HG530111, X17095
<i>East African cassava mosaic Cameroon virus(EACMCV)</i>	EU685319, NC_004625, EU685323, EU685326, JN165089, AF259896, JF909117
<i>East African cassava mosaic Kenya virus(EACMKV)</i>	NC_011583, AJ717578, AJ717576, AJ717580, AJ717581
<i>East African cassava mosaic Malawi virus(EACMMV)</i>	KP890354, AJ006459, AJ006460, KT869122, KP890349
<i>East African cassava mosaic virus(EACMV)</i>	FN435280, JX910240, NC_004674, HG530116
<i>East African cassava mosaic Zanzibar virus(EACMZV)</i>	AF422174, AJ717560, AJ717562, AJ717567, AJ717566, AJ717561, AJ717583, AJ717565
<i>Indian cassava mosaic virus(ICMV)</i>	KU308385, AJ314739, NC_001932, AJ575819 AY730035, Z24758
<i>South African cassava mosaic virus(SACMV)</i>	NC_003803, AJ422132, AF155806
<i>Sri Lankan cassava mosaic virus(SLCMV)</i>	NC_003861, KF898349, AJ579307, KR611577, KU550961
<i>East African cassava mosaic virus-Uganda(EACMV-UG)</i>	AJ717518, KT780440, HE979773, HE979775, Z83257, AJ717532, AJ717530, AJ717519, HE979770, AJ717522, AF126804, AF126806

ตารางที่ 2 แสดงชื่อไพรเมอร์ ชนิดดีเอ็นเอ และขนาดดีเอ็นเอ สำหรับใช้สังเคราะห์เชื้อไวรัส ACMV เชื้อไวรัส CMVs และเชื้อไวรัส Genus *Begomovirus* ภายใต้ Family *Geminiviridae* ด้วยเทคนิค PCR

Primer set	Forward primer name	Reverse primer name	Tm °C	Virus detected	Product Size (bp)	reference
ไพรเมอร์ชุดที่ 1						
คู่ที่ 1.1	51./AV2-ACMV-F1	51./AV1-ACMV-R1	60	ACMV-A	~ 710	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 1.2	53./AV1-CMV5-F2.2	53./AV1-CMV5-R2.1	58-60	CMV5-A	~ 500	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 1.3	52.AV1-CMV4-F1	52./AC1-CMV4-R1.1	60	4 kinds-A	~ 1300	กาญจนาและแสนชัย 2561
ไพรเมอร์ชุดที่ 2						
คู่ที่ 2.1	62./BV1-ACMV-SF1	62./BV1-ACMV-SR1	60	Specific ACMV-B	~ 750	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 2.2	61./AC1-ICMV-SF1	61./AC1-ICMV-SR1	60-61	Specific ICMV-A	~ 500	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 2.3	63.1/BC1-EACMV-SF1	63.1/BC1-EACM-SR1	60-61	Specific EACMV-B	~ 900	กาญจนาและแสนชัย 2561
คู่ที่ 2.4	60./AC1-SLCMV-SF1	60./AC1-SLCMV-SR1	60	Specific SLCMV-A	~ 450	กาญจนาและแสนชัย 2561
universal primer for detecting Virus within Genus <i>Begomovirus</i>, Family <i>Geminiviridae</i>						
Virion sense primer name	Complementary primer name	Tm °C	Virus detected	Product Size (bp)	reference	
GEM-U-CP-F1.1	GEM-U-CP-R1.2	56	Begomo virus	~ 500	กาญจนาและคณะ 2556	



ภาพที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ DNA-A ของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลังทั้ง 10 ชนิด จากตัวแทนแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) สร้างเป็น Phylogenetic tree (maximum-likelihood method, 500 bootstrap replicates, MEGA version 7.0.26)

Sequence name / optimized for
AV2_AV1_ACMV/ Non optimized

ORF	Protected sites	Protected areas	Motifs to avoid
161-837 [ATG...TAA]			

```

1. ATGTGGGATCCACTGGTGAATGAGTTTCCAGACTCGGTGCATGGGCTTAGGTGTATGCTGGCAATTA
70. TATTTGCAGGCCTTAGAGGATACATACGAGCCAGTACGTTGGGCCAGAACTGGTGAGGGATCTAGTC
139. TCAGTTATCAGGGCTCGTAATTATGTGGAAGCGACCCAGGAGATATCATCATTCCCACTCCAGGCTCAA
V R R R R L N F D S P Y R N R A T A P T V H V T
208. GGTTTCGTCGAAAGGCTGAACTTCGACAGCCCATACAGGAACCGTGCTACTGCCCCACTGTCCACGTCA
N R K R A W V N R P M Y R K P M M Y R M Y R S
277. AAATCGAAAACGGGCCTGGGTGAACAGGCCATGTACAGAAAAGCCCATGATGTACAGGATGTATAGAAG
P D I P R G C E G F C K V D S F E G R D D V K
346. CCCAGACATACCTAGGGCTGTGAAGCCCATGTAAGTCCAGTCGTTTGAGCCAGGGATGATGTGAA
H L G I C K V I S D V T R G P Q L T H R V G K
415. GCACCTTGGTATCTGTAAAGTGATTAGTGATGTGACTCGTGGGCCTGGGTGACACAGGGTCGGAAA
R F C I K S I Y I L G K I W M D E N I K K Q N
484. GAGGTTTGTATCAAAGTCCATTTACATTCCTGGTAAGATCTGGATGGATGAAAATATTAAGAAGCAGAA
H T N N V M F Y L L R D R R P Y G N A P O D F
553. TCACCTAATAATGTGATGTTTTACCTGTTAGGGATAGAAGCCCTTATGGCAATGGCCCAAGACTT
G G I F N M F D N E P S T A T I K N D L R D R
622. TGGGCAGATATTAACATGTTTGTAAATGAGCCAGTACTGCAACAATTAAGAACGATTTAGGGATAG
F Q V L R K F H A T V V G G P Y G M K E Q A L
691. GTTTCAGGTGTTGAGGAAATTCATGCCACTGTTGTTGGTGGTCCATATGGCATGAAGGAGCAGCGGTT
V K R R F Y R L N H H V T Y N H O E A G K Y E N
760. GGTGAAAAGGTTTACAGGTTGAATCATCACGTGACATACAATCATCAGGAGCCAGGGAAGTATGAGAA
H T E N A L L L Y M A C T H A S N P V Y A T L
829. TCACACAGAAATGCTTTGCTTCTGTACATGGCATGTACTCATGCCTCAAATCCTGTATATGGCAGTT
K I R I Y F Y D S I G N *
898. GAAAATACGTATATACTTCTATGACAGTATTGGCAATTA

```

ภาพที่ 2 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ AV2 gene (pre coat protein gene) รวมกับ AV1 gene (coat protein gene) ซึ่งสังเคราะห์ลำดับเบส โดยอ้างอิงจาก Accession No. DNA-A ของเชื้อไวรัส ACMV ในตารางที่ 1 เพื่อใช้เป็น positive control ตรวจสอบเชื้อไวรัส ACMV

การทดลองที่ 1.4 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR (2562-2564)

1. การเตรียมแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลอง (Table 1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าว และแบคทีเรียสาเหตุโรคในพืชหลายชนิด ได้แก่ *B. glumae*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *Acidovorax cattleyae*, *A. citrulli*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* และ *Ralstonia solanacearum* เลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 1 ลูกบ ใน การสกัดดีเอ็นเอขั้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง

2. ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวได้อย่าง เฉพาะเจาะจง และดำเนินการทดสอบไพรเมอร์เบื้องต้นด้วย conventional PCR ได้ไพรเมอร์สำหรับ ใช้ตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *B. glumae* ได้เฉพาะเจาะจง จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ คือ GL-13F/GL-14R, Forward/Reverse และ Glu-FW/Glu-RW ส่วนคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R ให้ผลเป็นบวก โดยเกิดแถบ ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 138 คู่เบส ของแบคทีเรีย *B. gladioli* pv. *gladioli* ได้เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *B. glumae*

คัดเลือกไพรเมอร์และดำเนินการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* สาเหตุโรครวงไหม้ของข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R มี สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:03:00	4.40	none
Amplification	45	95	00:00:10	4.40	none
		63	00:00:20	2.20	none
		72	00:00:30	4.40	none
Melting curve	1	95	00:00:05	4.40	none
		65	00:01:00	2.20	none
		95	00:00:00	0.10	continuous
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

คู่มือ Forward/Reverse มีสถานะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:03:00	4.40	none
Amplification	45	95	00:00:15	4.40	none
		60	00:00:30	2.20	none
		72	00:00:15	4.40	none
Melting curve	1	95	00:00:05	4.40	none
		65	00:01:00	2.20	none
		95	00:00:00	0.10	continuous
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

3. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

การทดสอบความจำเพาะของคู่มือ BG1F/BG1R สำหรับการตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ด้วยเทคนิค real-time PCR เมื่อวิเคราะห์ melting temperature (T_m) และ melting peak ของผลผลิต PCR พบว่าแบคทีเรีย *B. glumae* และ *B. gladioli* pv. *gladioli* มีค่า T_m เท่ากับ 82.80 °C และ 82.84 °C ตามลำดับ ใกล้เคียงกับรายงานของ Kim *et al.* (2012) ที่มีค่า T_m เท่ากับ 81.50 °C และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท แบคทีเรีย *P. fuscovaginae*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* และ *R. solanacearum*

การทดสอบความจำเพาะของคู่มือ Forward/Reverse พบว่าเมื่อวิเคราะห์ T_m และ melting peak ของผลผลิต PCR พบว่ามีค่า T_m เท่ากับ 83.36 °C ใกล้เคียงกับรายงานของ Saylor *et al.* (2006) ที่มีค่า T_m เท่ากับ 82.50 °C สามารถตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ได้เฉพาะเจาะจง และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท แบคทีเรียที่มีรายงานเป็นสาเหตุโรคในข้าว ได้แก่ *P. fuscovaginae*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola* แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชอีกหลายชนิด ได้แก่ *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi* และ *R. solanacearum* (Table 1, 2)

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae*

การทดสอบความไวของคู่ไพรเมอร์ BG1F/BG1R สำหรับตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าสามารถตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ 15 โคโลนี/มิลลิลิตร แตกต่างจากรายงานของ Kim *et al.* (2012) ที่สามารถตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ 1×10^2 โคโลนี/มิลลิลิตร ส่วนการทดสอบคู่ไพรเมอร์ Forward/Reverse พบว่ามีความไวในการตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ความเข้มข้น 15 โคโลนี/มิลลิลิตร แตกต่างจากรายงานของ Saylor *et al.* (2006) สามารถตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ได้ที่ความเข้มข้น 1-10 เซลล์ โดยไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ที่ใช้ในเทคนิค real-time PCR มีความไวกว่าวิธี conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) ที่มีความไวในการตรวจแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ความเข้มข้นเซลล์ 1.5×10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร (Figure 1, Table 3)

5. ทดสอบเทคนิค real-time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *Burkholderia glumae* จากตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายโรครวงไหม้ของข้าว นำมาแยกเชื้อและตรวจยืนยันด้วย conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) ไม่พบแบคทีเรีย *B. glumae* ในตัวอย่างที่ตรวจ จึงผสมแบคทีเรีย *B. glumae* ในตัวอย่างข้าวเพื่อใช้ในการทดสอบ (Figure 2) การตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Kim *et al.* (2012) และ Saylor *et al.* (2006) จากใบหรือกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายกับโรครวงไหม้ (panicle blight) พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรียได้ถูกต้องทุกตัวอย่างที่ตรวจ โดยมีผลการทดสอบเป็นบวกในตัวอย่างกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่ผสมแบคทีเรีย *B. glumae* ที่ใช้ในการทดสอบสอดคล้องกับผลการตรวจด้วย conventional PCR ตามรายงานของ Takeuchi *et al.* (1997) (Figure 3)

ไพรเมอร์ที่ใช้ทดสอบทั้ง 2 คู่ มีความไวในการตรวจเท่ากัน แต่เมื่อพิจารณาถึงการทดสอบความจำเพาะจากรายงานของ Kim *et al.* (2012) พบว่าไพรเมอร์ Forward/Reverse ที่ออกแบบจากบริเวณ 16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) ของ Saylor *et al.* (2006) เกิดผลบวกกับแบคทีเรียอ้างอิง (type strain) *Pseudomonas syringae* pv. *oryzae* KACC 10133 สาเหตุโรค bacterial halo blight ของข้าว ซึ่งหากนำมาใช้ในการตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวแล้วอาจเกิดผลบวกปลอม (false positive) ได้ ดังนั้น จากรายงานดังกล่าวรวมทั้งการทดสอบจากงานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่า คู่ไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวด้วยเทคนิค real-time PCR คือไพรเมอร์ BG1F/BG1R ที่ออกแบบจากยีน *rhs* family ตามรายงานของ Kim *et al.* (2012)

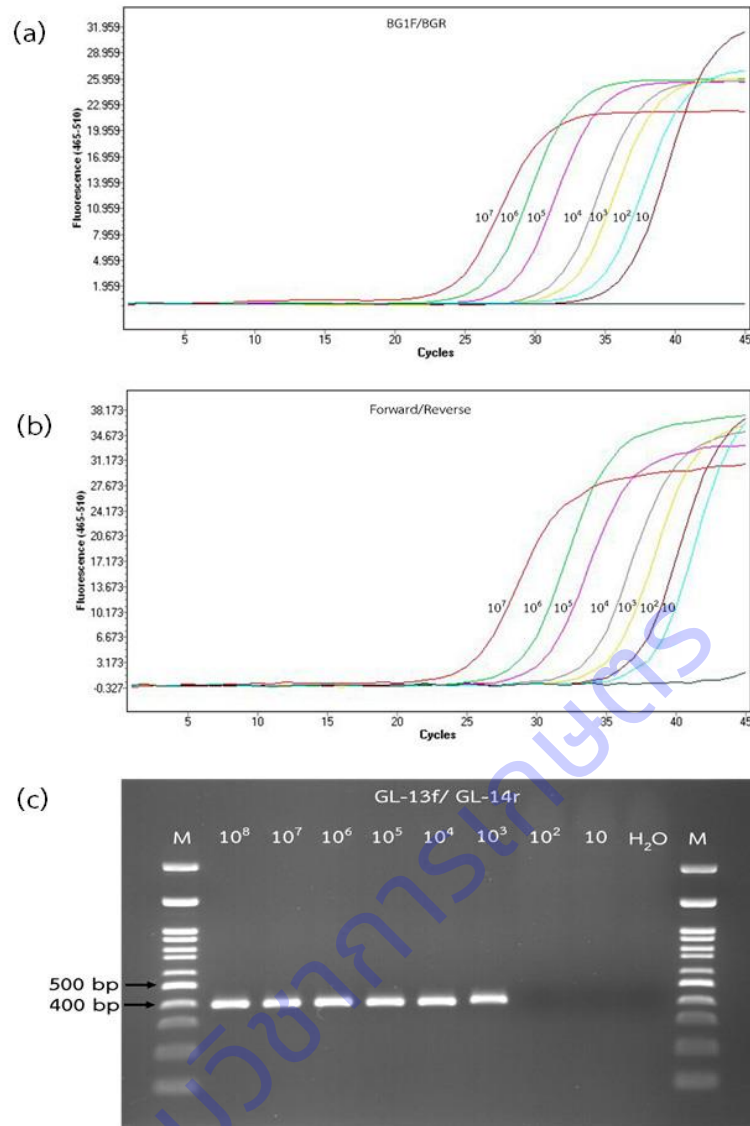


Figure 1 Sensitivity of real-time PCR and conventional PCR. (a-b) Correlation between bacterial number and real-time PCR cycle threshold. (c) Result of conventional PCR detection.



Figure 2 Detection of *Burkholderia glumae* by conventional polymerase chain reaction. Lane M, size marker (onemark 100); lane 1, inoculated rice seeds; lanes 2–10, panicle rice samples; lane 11, *B. glumae*; lane 12, negative control (distilled water).

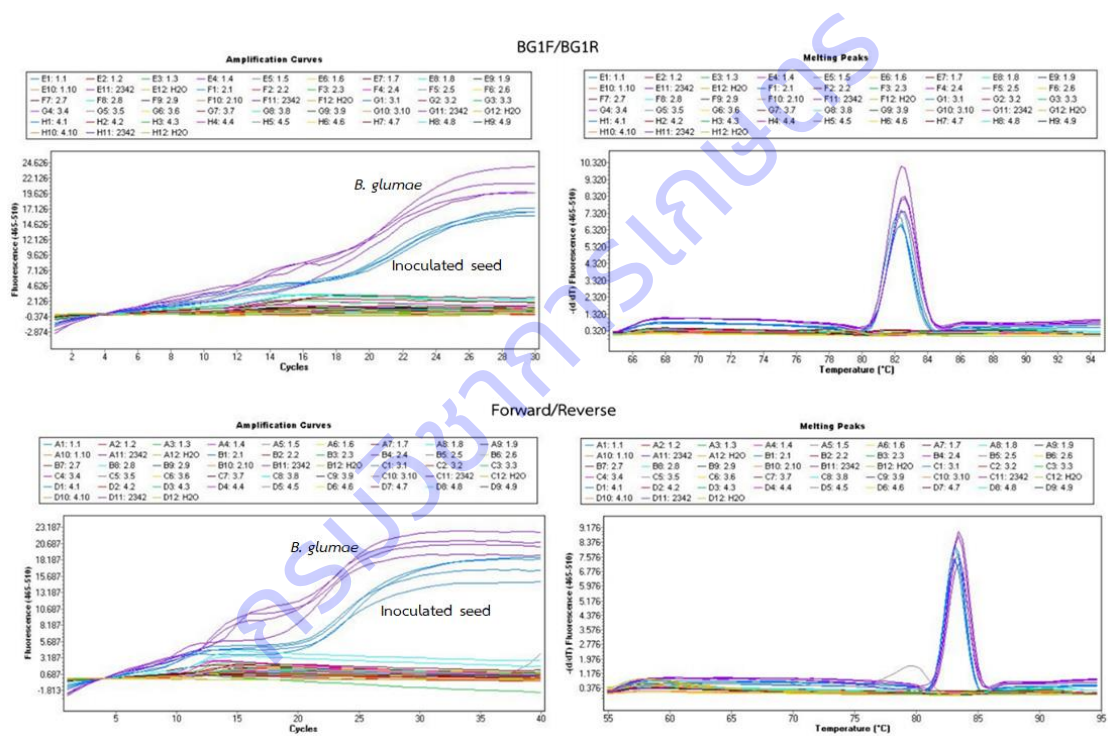


Figure 3 Detection of *Burkholderia glumae* from rice seeds by real-time PCR. The fluorescence intensity and melting curve analysis from each primer set were presented.

Table 1 Bacterial strains used in this study and result of specificity test.

Bacterial species		Origin	Primer sets		
			GL-13f/ GL-14r	Forward/Reverse	BG1F/BGR
<i>Burkholderia glumae</i>		IRRI	+	+	+
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>		IRRI	-	-	-
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	DOABCC2562	Suphan Buri	-	-	-
	DOABCC2568	Suphan Buri	-	-	-
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	DOABCC2561	Suphan Buri	-	-	-
	DOABCC2563	Suphan Buri	-	-	-
<i>Acidovorax cattleyae</i>	DOABCC2078	Nakhon Pathom	-	-	-
<i>Acidovorax citrulli</i>	DOABCC1228	Nakhon Ratchasima	-	-	-
	DOABCC1364	Khon Kaen	-	-	-
<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	DOABCC2059	Nakhon Pathom	-	-	+
	DOABCC2479	Pathum Thani	-	-	+
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	DOABCC0681	Phetchabun	-	-	-
	DOABCC2802	Lamphun	-	-	-
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	DOABCC2515	Chiang Mai	-	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	DOABCC1954	Chiang Ma	-	-	-

Table 1 Continue

Bacterial species	Origin	Primer sets		
		GL-13f/ GL-14r	Forward/Reverse	BG1F/BGR
<i>Ralstonia solanacearum</i>	DOABCC1954	Chiang Mai	-	-
Unknown, isolated from seed	U843-1	Kamphaeng Phet	-	-
Unknown, isolated from seed	U843-2	Kamphaeng Phet	-	-
Unknown, isolated from seed	U870-1	Nakhon Sawan	-	-
Unknown, isolated from seed	U870-2	Nakhon Sawan	-	-
Unknown, isolated from seed	U902-1	Saraburi	-	-
Unknown, isolated from seed	U902-2	Saraburi	-	-
Unknown, isolated from seed	U903-1	Saraburi	-	-
Unknown, isolated from seed	U903-2	Saraburi	-	-
Unknown, isolated from seed	U914-1	Ratchaburi	-	-
Unknown, isolated from seed	U914-2	Ratchaburi	-	-

+ and – indicates species was detected or not detected, respectively

Table 2 Primers used in this study

Primer	Sequences (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon size (bp)	References
BG1F	CCGCGCTGTTTCATGAGGGATAA	63	138	Kim <i>et al.</i> (2012)
BG1R	CGGGCGGAACGACGGTAAGT			
Forward	ACG TTCAGGGATRCTGAGCAG	60	282	Sayler <i>et al.</i> (2006)
Reverse	AGTCTGTCTCGCTCTCCCGA			
GL-13f	ACACGGAACACCTGGGTA	60	400	Takeuchi <i>et al.</i> (1997)
GL-14r	TCGCTCTCCCGAAGAGAT			

Table 3 Ct values for the bacterial cell dilutions in real-time PCR detection

Cell suspensions (CFU/ml)	Ct value	
	Forward/Reverse	BG1F/BG1R
1.5×10^1	38.03	36.10
1.5×10^2	36.86	34.52
1.5×10^3	35.14	32.52
1.5×10^4	33.62	31.27
1.5×10^5	30.43	28.26
1.5×10^6	28.85	26.33
1.5×10^7	25.30	24.24

การทดลองที่ 1.5 พัฒนารูปแบบการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย (2562-2564)

1. การเตรียมแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลอง (Table 1) ได้แก่ แบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis*, *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ชิง ปทุมมา ดาวเรือง ยูคาลิปตัส แบคทีเรีย *Acidovorax citrulli*, *A. cattleyae*, *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) และ *Dickeya zae* (*E. chrysanthemi* pv. *zae*) มาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหาร PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยใช้แบคทีเรีย 1 ลูก ในการสกัดดีเอ็นเอขึ้นตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. ทดสอบภาวะที่เหมาะสมของเทคนิค PCR ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

รวบรวมข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยได้อย่างเฉพาะเจาะจง และทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการตรวจเชื้อ พบว่ามีไพรเมอร์ 121F/121R ตามรายงานของ Tan (2003) ที่พัฒนาขึ้นสำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* หรือชื่อเดิม Blood Disease Bacterium สาเหตุโรคเลือดในกล้วย (Blood disease of banana) ได้เฉพาะเจาะจงและมีการนำมาใช้ในการตรวจหาเชื้อในประเทศที่พบการระบาดของโรค (Hadiwiyono, 2011) โดยมีอุณหภูมิการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ อุณหภูมิและเวลาเริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ 759/760 ตามรายงานของ Opina *et al.* (1997) ซึ่งกรมวิชาการเกษตรใช้ในการตรวจรับรองการปลอดเชื้อ *R. solanacearum* ในพืชส่งออก โดยมีอุณหภูมิการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังนี้ อุณหภูมิและเวลาเริ่มต้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบ (denaturing) ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ไพรเมอร์เริ่มต้นจับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 นาที จากนั้นแยกสายดีเอ็นเอแม่แบบต่อที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ไพรเมอร์จับคู่กับดีเอ็นเอแม่แบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 30 รอบ และสังเคราะห์ดีเอ็นเอรอบสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (Table 2)

3. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ 121F/121R ในการตรวจแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย พบว่าไพรเมอร์ 121F/121R สามารถใช้ตรวจแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* ที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเหี่ยวได้อย่างเฉพาะเจาะจง ปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 317 คู่เบส และให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบกับแบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ชิง ปทุมมา ดาวเรือง ยูคาลิปตัส แบคทีเรีย *A. citrulli*, *A. cattleyae*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *D. zeae* และ *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* ส่วนไพรเมอร์ 759/760 เกิดผลบวกกับแบคทีเรียที่จัดเป็น *R. solanacearum* species complex ได้แก่แบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* ที่แยกได้จากตัวอย่างกล้วยเหี่ยว แบคทีเรีย *R. solanacearum* ที่แยกได้จากดินแปลงปลูกกล้วย พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง ชิง ปทุมมา ดาวเรือง ยูคาลิปตัส โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 280 คู่เบส และให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบกับแบคทีเรีย *A. citrulli*, *A. cattleyae*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *D. zeae* และ *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (Figure 1, Table 1)

4. ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค PCR ในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย

4.1 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR

การทดสอบความไวของไพรเมอร์ 121F/121R และ 759/760 สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* ด้วยเทคนิค PCR พบว่ามีความไวเท่ากันสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ 2.6×10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร (Figure 2)

4.2 ทดสอบหาระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ตรวจพบได้ด้วยเทคนิค PCR

การทดสอบความไวของไพรเมอร์ 121F/121R และ 759/760 สำหรับตรวจหาระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* ด้วยเทคนิค PCR พบว่าทั้งสองไพรเมอร์มีความไวเท่ากัน โดยสามารถตรวจหาดีเอ็นเอแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* ได้ที่ความเข้มข้น 5 พิโคกรัม/ไมโครลิตร (Figure 2)

5. ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR

5.1 ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากตัวอย่างพืช

การทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 121F/121R เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ 759/760 และใช้ดีเอ็นเอต้นแบบที่ได้จากการเตรียมตัวอย่าง 3 วิธี ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป วิธีการของ Zou *et al.* (2017) และ OEPP/EPPO (2018) พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่ สามารถตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis*

ได้ถูกต้องทุกตัวอย่างจากการเตรียมตัวอย่างทั้ง 3 วิธี สอดคล้องกันกับผลการแยกเชื้อบนอาหาร PSA (Figure 3) แต่การเตรียมตัวอย่างตามวิธีการของ Zou *et al.* (2017) ที่ถึงแม้จะใช้ระยะเวลาสั้นในการเตรียมตัวอย่าง แต่มีข้อด้อยคือแผ่นกระดาษกรองที่ใช้สำหรับทำปฏิกิริยา PCR ดูดซับน้ำยาไว้บางส่วน ทำให้เหลือปริมาณผลผลิต PCR เพื่อตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสน้อยลง และให้ปริมาณดีเอ็นเอต่อแผ่นไม่เท่ากัน ดังนั้น วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างพืชจึงได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป และวิธีการของ EPPO (2018)

5.2 ทดสอบวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากดิน

การทดสอบวิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยจากตัวอย่างดินแปลงปลูกกล้วยจำนวน 10 ตัวอย่าง ไม่พบแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย จึงปลูกเชื้อในดินโดยผสมดินกับเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 10^1 - 10^7 โคโลนี/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเตรียมตัวอย่าง 2 วิธี ได้แก่ การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูปและวิธีการของ Zou *et al.* (2017) จากการทดสอบพบว่าไพรเมอร์ 121F/121R และ 759/760 ให้ผลสอดคล้องกัน โดยสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* ได้จากดินผสมเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น 2.6×10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร จากการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป ดีกว่าการเตรียมตัวอย่างตามวิธีของ Zou *et al.* (2017) ที่ตรวจหาเชื้อได้จากดินผสมแบคทีเรียความเข้มข้น 2.6×10^5 โคโลนี/มิลลิลิตร โดยที่การเตรียมตัวอย่างตามวิธีของ Zou *et al.* (2017) ให้ผลการตรวจเหมือนกันกับการตรวจหาเชื้อจากส่วนน้ำใสที่ได้จากการชั่งดิน 10 กรัม เขย่าในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร นาน 30 นาที ดังนั้น จากผลการทดสอบสามารถสรุปได้ว่า วิธีการเตรียมตัวอย่างที่เหมาะสมสำหรับใช้ตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วยด้วยเทคนิค PCR จากตัวอย่างดินได้แก่ วิธีการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Figure 4)

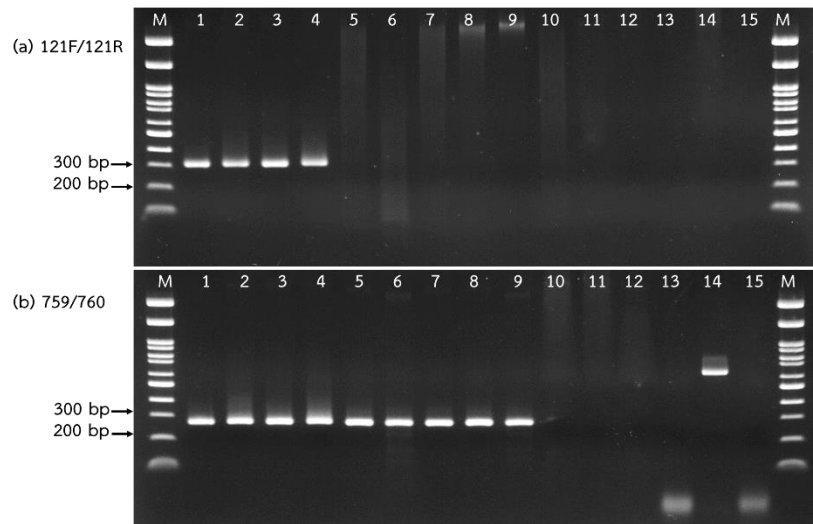


Figure 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified for specificity detection *R. solanacearum* species complex using (a) 121F/121R and (b) 759/760 primers, M: onemark 100, lane 1–4: *R. syzygii* subsp. *celebensis*, lane 5–9: *R. solanacearum*, lane 10: *Acidovorax citrulli*, lane 11: *Acidovorax cattleyae*, lane 12: *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, lane 13: *Dickeya zea*, lane 14: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, lane 15: distilled water

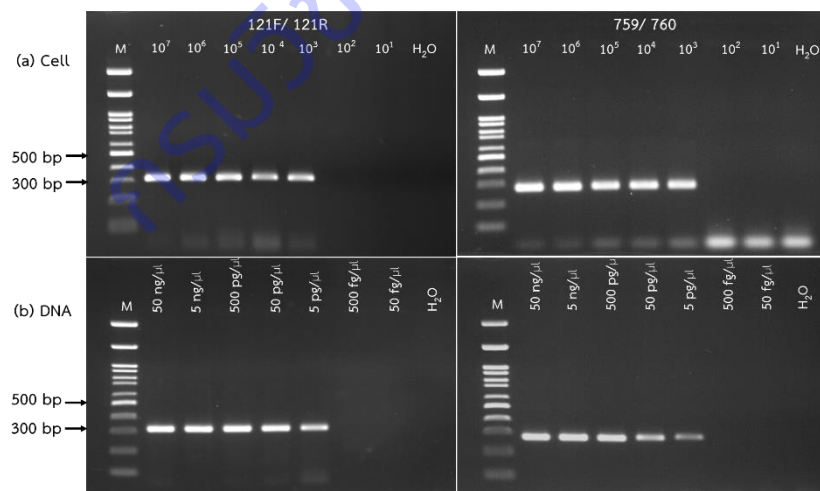


Figure 2 Sensitivity of PCR assay for detection (a) cell suspension and (b) DNA of *R. syzygii* subsp. *celebensis*.

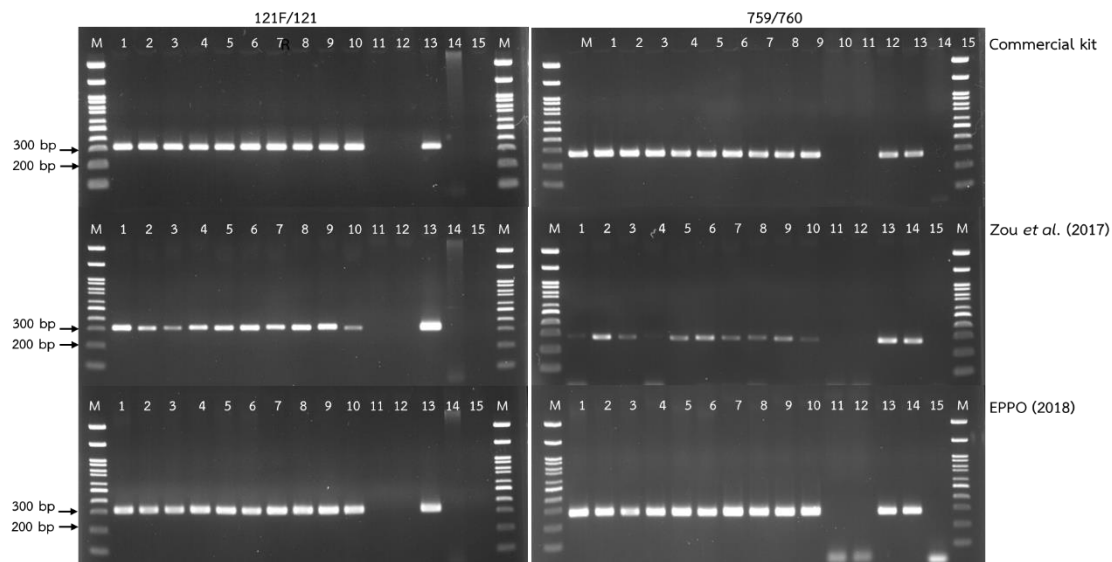


Figure 3 Comparison of primer sets and different extraction methods for detection *R. solanacearum* species complex in plant samples.

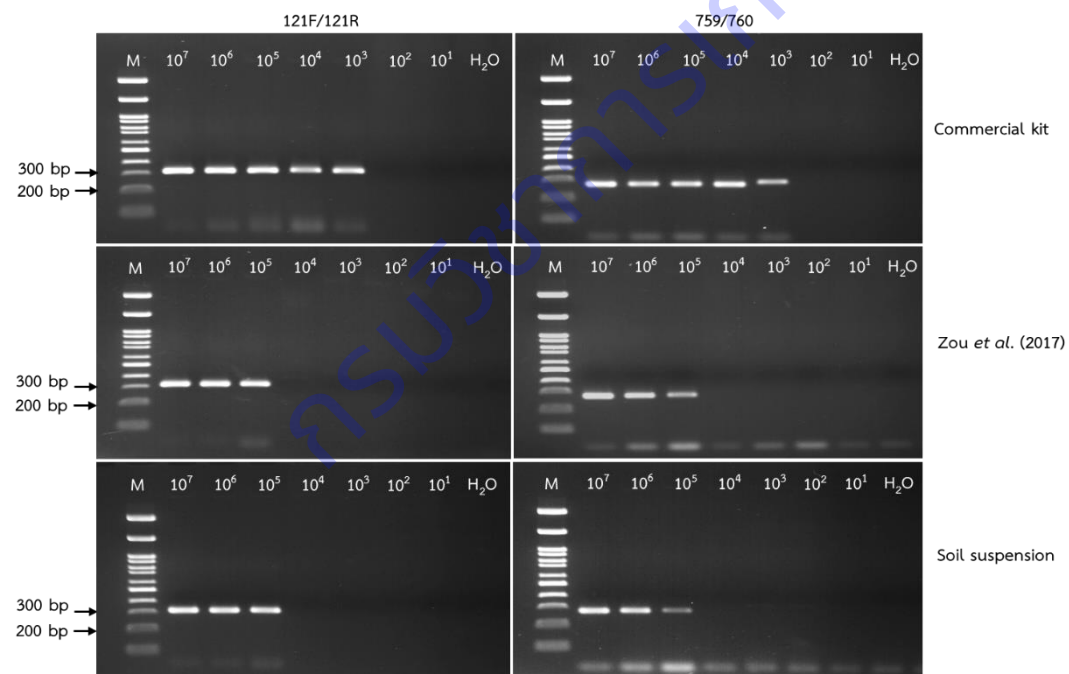


Figure 4 Comparison of primer sets and different extraction methods for detection *R. solanacearum* species complex in soil samples.

Table 1 Primers used in this study.

Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Reference
Nmult21:1F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	144	Fegan and Prior (2005)
Nmult21:2F	AAGTTATGGACGGTGGAAAGTC	372	
Nmult23:AF	ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT	91	
Nmult22:InF	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	213	
Nmult22:RR	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA		
759	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	281	Opina <i>et al.</i> (1997)
760	GTCGCCGTGAGCAATGCGGAATCG		
121F	CGTATTGGATGCCGTAATGGA	317	Tan (2003)
121R	AAGTTCATTGGTGCCGAATCA		

กรมวิชาการเกษตร

Table 2 Bacterial strains used in this study and result of specificity test.

Bacterial species		Location	Primer sets	
			121F/121R	759/760
<i>Ralstonia syzigii</i> subsp. <i>celebesensis</i>	DOABCC2730	Yala	+	+
	BCC2924	Yala	+	+
	BCC2925	Yala	+	+
	BCC2927	Yala	+	+
<i>Ralstonia solanacearum</i>	DOABCC2930	Yala	-	+
	DOABCC0832	Nakhon Phanom	-	+
	DOABCC1191	Loei	-	+
	DOABCC1350	Chiang Rai	-	+
	DOABCC1374	Chachoengsao	-	+
	DOABCC1387	Bangkok	-	+
	DOABCC1481	Chiang Mai	-	+
	DOABCC1512	Chiang Rai	-	+
	DOABCC1954	Chiang Mai	-	+
	DOABCC2156	Chiang Mai	-	+
	DOABCC3279	Phichit	-	+
	<i>Acidovorax cattleyae</i>	DOABCC2078	Nakhon Pathom	-
<i>Acidovorax citrulli</i>	DOABCC1228	Nakhon Ratchasima	-	-
	DOABCC1364	Khon Kaen	-	-
<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	DOABCC2059	Nakhon Pathom	-	-
	DOABCC2479	Pathum Thani	-	-
<i>Dickeya zeae</i>	DOABCC2515	Chiang Mai	-	-
	DOABCC1181	Lop Buri	-	-
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	DOABCC0681	Phetchabun	-	-
	DOABCC2802	Lamphun	-	-
	DOABCC3036	Kanchanaburi	-	-

+ and – indicates species was detected or not detected, respectively

การทดลองที่ 1.6 การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fuscovaginae* ในข้าวด้วยเทคนิค LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) (2563-2564)

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียและสกัดดีเอ็นเอ

นำเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งเป็นแบคทีเรียสาเหตุโรคในข้าวแบคทีเรียสาเหตุโรคในพืชอื่นๆ และแบคทีเรียที่แยกได้จากข้าว ได้แก่ *P. fuscovaginae*, *Burkholderia glumae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *Acidovorax cattleyae*, *A. citrulli*, *B. gladioli* pv. *gladioli*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *Ralstonia solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris* และ *X. citri* pv. *citri* (Table 2) เลี้ยงในอาหารเหลว LB เขย่าที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง PSA บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, USA) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 1 หลูบ ในการสกัดดีเอ็นเอขึ้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในข้าวด้วยเทคนิค LAMP

2.1 การตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา LAMP

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* สาเหตุโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าวด้วยเทคนิค LAMP ใช้ไพรเมอร์เซต Pf8 ผลการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสม มีขั้นตอนดังนี้ เตรียมดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบโดยบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ใช้ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร เติมในปฏิกิริยา LAMP 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2.0 μ M FIP และ BIP, 0.4 μ M F3 และ B3, 2.0 μ M F loop และ B loop, 0.4 μ M dNTPs, 1.0 M Betaine, 20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM KCl, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 mM MgSO_4 , 0.1% Triton X-100 และ 8U *Bst* DNA polymerase บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิลิคโตรโพรซีส พบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะคล้ายขั้นบันไดซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา LAMP การตรวจสอบผลด้วยสารเรืองแสง SYBR Green I หลังทำปฏิกิริยาเสร็จ พบว่าสารเรืองแสง SYBR Green I เปลี่ยนจากสีส้มเป็นเรืองแสงสีเขียวในทุกตัวอย่างดีเอ็นเอเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ทดสอบ ยกเว้นน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ สอดคล้องกับการตรวจสอบผลด้วยวิธีเจลอิลิคโตรโพรซีส (Figure 1)

2.2 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae*

การทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์เซต Pf8 สำหรับการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* พบว่าไพรเมอร์ให้ผลการทดสอบเป็นบวกกับเชื้อแบคทีเรีย *B. glumae* และให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากเมล็ดข้าวจำนวน 10 ไอโซเลท แบคทีเรีย *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *A. cattleyae*, *A. citrulli*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *E. chrysanthemi*, *R. solanacearum*, *X. campestris* pv. *campestris* และ *X. citri* pv. *citri* (Table 1, 2)

2.3 ทดสอบความไว (sensitivity) ของเทคนิค LAMP ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae*

เตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อที่ค่าดูดกลืนแสง O.D._{600 nm} เท่ากับ 0.2 แบคทีเรียมีความเข้มข้นของเซลล์ 1.5×10^8 CFU/ml ทำให้เจือจางด้วยวิธี tenfold serial dilution ใช้สำหรับทดสอบหาระดับความเข้มข้นของเซลล์เชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่สามารถตรวจพบได้ด้วยเทคนิค LAMP พบว่าสามารถตรวจแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ได้ที่ความเข้มข้นเซลล์ 15 CFU/ml มีความไวกว่า conventional PCR ที่สามารถตรวจแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ความเข้มข้นเซลล์ 1.5×10^3 CFU/ml (Figure 2)

3. ทดสอบเทคนิค LAMP ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* จากตัวอย่างพืช

การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ด้วยเทคนิค LAMP โดยใช้ชุดไพรเมอร์ Pf8 ตามรายงานของ Ash *et al.* (2014) จากกาบใบข้าวและเมล็ดข้าวที่มีลักษณะอาการคล้ายกับโรคกาบใบเน่าสีน้ำตาลของข้าว ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในทุกตัวอย่างที่ตรวจ ผลการแยกเชื้อบนอาหาร King's B พบแบคทีเรียสร้างสารเรืองแสง แต่เมื่อนำแบคทีเรียตรวจยืนยันด้วย LAMP อีกครั้งพบว่าให้ผลเป็นลบ ผลการตรวจด้วย conventional PCR ตามรายงานของ Onasanya *et al.* (2010) พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกโดยปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 bp เช่นเดียวกับแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* (Figure 3) สอดคล้องกับผลการแยกเชื้อบนอาหาร King's B ที่พบแบคทีเรียสร้างสารเรืองแสง เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการพบว่าไม่ใช่คุณสมบัติของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* โดยผลบวกที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากไพรเมอร์ PfF3/PfR3 ตามรายงานของ Onasanya *et al.* (2010) ออกแบบจากยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างในกลุ่มแบคทีเรีย *Pseudomonas* ที่สามารถสร้างสารเรืองแสงที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันได้ ส่วนการตรวจสอบด้วย conventional PCR ตามรายงานของ Cui *et al.* (2016) ให้ผลเป็นลบในทุกตัวอย่างที่ตรวจรวมทั้งแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากของ IRRI ซึ่งเป็นตัวควบคุมบวก จึงไม่นำมาใช้ในการเปรียบเทียบ จากผลการตรวจที่ไม่สอดคล้องกันจำเป็นต้องใช้หลายวิธีในการตรวจหาเชื้อ

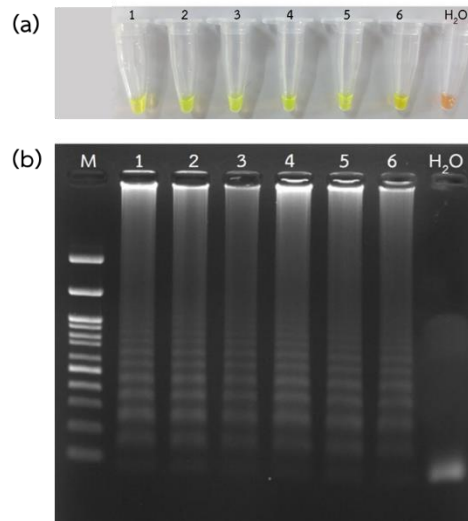


Figure 1 Detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from genomic DNA by loop-mediated amplification (LAMP) assay (a) Visual inspection of LAMP assay with fluorescent dye of SYBR Green I (b) agarose gel electrophoresis visualization of LAMP M: onemark 100, lane 1–6: genomic DNA of *Pseudomonas fuscovaginae*, H₂O (negative control)

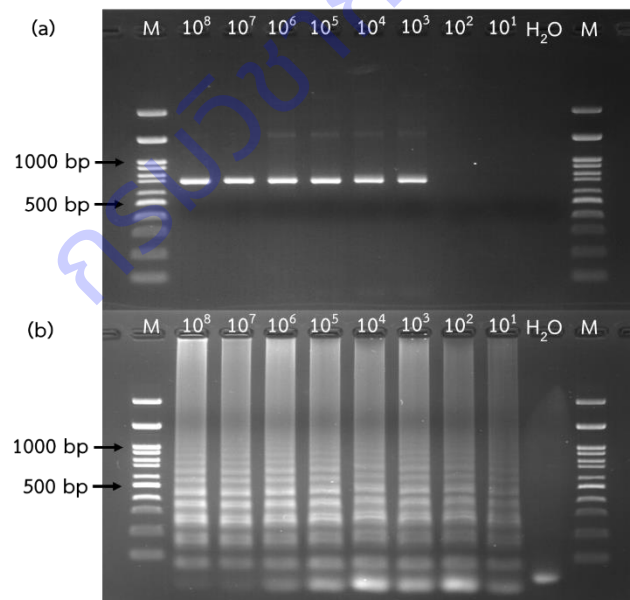


Figure 2 Sensitivity test for detection *Pseudomonas fuscovaginae* by (a) PCR and (b) LAMP assay; M: Onemark 100, H₂O (negative control)

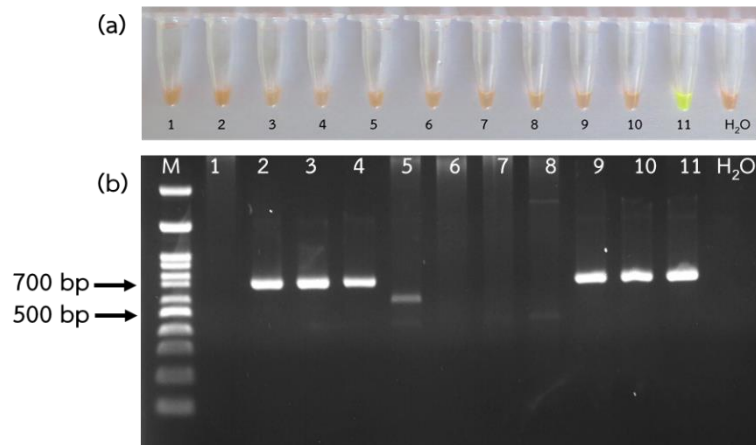


Figure 3 Detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from rice by LAMP assay and PCR.

(a) LAMP positive reactions appeared green and negative reactions appeared orange in daylight (b) PCR results, M: Onemark 100, 1–10: rice samples, 11: *Pseudomonas fuscovaginae* (positive control), H₂O (negative control)

Table 1 Primers used in this study.

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
	<u>Primer set: Pf8</u>	Ash <i>et al.</i> (2014)
F3	TGTGTT CAGTTCCTTCATCG	
B3	TAACAGCGTCACGTTCTTC	
FIP	GATCATCAGCGGGACTGTCAGGGTGAGGTCTACGAGAAATTC	
BIP	CGACGGCGATTTTCGTTGCGTTATAACAACGCTTGCC	
LoopF	TGAGAAACGCCTTCTGGTC	
LoopB	TGTGCTGTGCCTGATTCTT	
PfF3	AACGGGTGTA CTTGGTCAGG	Onasanya <i>et al.</i> (2010)
PfR3	CTCCGAGATTACCCACAAGC	

Table 2 Bacterial strains used in this study and result of specificity test.

Bacterial species		Origin	Primer sets	
			PfF3 / PfR3	Pf8
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>		IRRI	+	+
<i>Burkholderia glumae</i>		IRRI	-	+
<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	DOABCC2562	Suphan Buri	-	-
	DOABCC2568	Suphan Buri	-	-
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	DOABCC2561	Suphan Buri	-	-
<i>Acidovorax cattleyae</i>	DOABCC2078	Nakhon Pathom	-	-
<i>A. citrulli</i>	DOABCC1228	Nakhon Ratchasima	-	-
	DOABCC1364	Khon Kaen	-	-
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	DOABCC2059	Nakhon Pathom	-	-
	DOABCC2479	Pathum Thani	-	-
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	DOABCC0681	Phetchabun	-	-
	DOABCC2802	Lamphun	-	-
<i>E. chrysanthemi</i>	DOABCC2515	Chiang Mai	-	-
<i>Ralstonia solanacearum</i>	DOABCC1954	Chiang Mai	-	-
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	DOABCC0493	Pathum Thani	-	-
<i>X. citri</i> pv. <i>citri</i>	DOABCC0888	Phitsanulok	-	-
Unknown, isolated from seed	U164	Nan	+	-
Unknown, isolated from seed	U179-1	Chiang Rai	+	-
Unknown, isolated from seed	U179-2	Chiang Rai	+	-
Unknown, isolated from seed	U699	Phetchabun	-	-
Unknown, isolated from seed	U713	Phetchabun	-	-
Unknown, isolated from seed	U721	Uttaradit	-	-
Unknown, isolated from seed	U722	Uttaradit	-	-
Unknown, isolated from seed	U726	Uttaradit	+	-
Unknown, isolated from seed	U728	Uttaradit	+	-
Unknown, isolated from seed	U759	Prachin Buri	+	-

+ and - indicates species was detected or not detected, respectively

การทดลองที่ 1.7 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (2564)

1. การทดสอบการสกัดดีเอ็นเอ

ผลการดำเนินงานในระหว่างเดือนตุลาคม 2563 - กันยายน 2564 รวบรวมตัวอย่างเชื้อรา Foc ได้ 75 ไอโซเลท ตัวอย่างเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่แสดงอาการตายพรายได้อย่างน้อย 60 ตัวอย่าง จากการทดสอบการสกัดดีเอ็นเอ ตรวจสอบการมีอยู่ของ DNA ของเชื้อราในตัวอย่างที่ทำการสกัดด้วยไพรเมอร์ EF-1/EF-2 พบว่าได้วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากแหล่งตัวอย่าง 3 ชนิด จำนวน 2 วิธีการ (Protocol 1 และ 2) ดังนี้

วิธีการที่ 1 การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense*

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit โดยดัดแปลงจากวิธีการสำหรับ PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit ของบริษัท BIO-HELIX จำกัด มีวิธีการ ดังนี้

1. เติม micro glass beads ขนาด 0.5 mm ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 2.0 ml ประมาณ 0.2 กรัม
2. เติม *Trichoderma* enzyme ความเข้มข้น 200 µg/µl ปริมาณ 8 µl ลงในหลอดจากข้อ 1 จากนั้นเติม cell lysis solution (Buffer CC) ปริมาณ 350 µl
3. เชื้อเส้นใยของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ที่เลี้ยงให้บริสุทธิ์โดยวิธี single spore isolation บน PDA แล้วย้ายลงในหลอดจากข้อ 2
4. บ่มหลอดจากข้อ 3 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 4-12 ชั่วโมง
5. จากนั้นนำมาเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที จำนวน 3-4 ครั้ง
6. ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
7. เติม Buffer CB ปริมาณ 400 µl กลับหลอดไปมาเพื่อให้สารเข้ากัน จากนั้นนำหลอดไปพักไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมงเพื่อตกตะกอนโปรตีน
8. นำหลอดจากข้อ 7 มาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
9. ดูดเฉพาะส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ค่อยๆ หยดลงใน Column CC ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 ml (หลอดใหม่)
10. นำหลอดจากข้อ 9 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 10,000 x g นาน 1 นาที
11. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
12. เติมสารละลาย Buffer W1 ปริมาณ 400 µl โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC
13. นำหลอดจากข้อ 12 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
14. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
15. เติมสารละลาย Buffer W2 ปริมาณ 600 µl โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC

16. นำหลอดจากข้อ 15 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
17. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ที่ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
18. นำหลอดจากข้อ 17 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที
19. ย้าย Column CC ไปบรรจุลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
20. เติมสารละลาย Solution BE ปริมาณ 50 μ l โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC โดยระวังไม่ให้ปลาย tip โดนด้านข้างของ column และให้ปลาย tip ใกล้กับ filter membrane
21. Incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
22. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที
23. เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

Protocol 1: DNA extraction from mycelium cultures

Extraction protocol using PureDireX[®] Genomic DNA Isolation Kit (Modified from protocol instruction for PureDireX[®] Genomic DNA Isolation Kit that designed by BIO-HELIX Co., LTD.) Modified by Chanintorn Doungsa-ard

Cell Lysis



- Add mycelium, micro beads, *Trichoderma* enzyme 200 μ g/ μ l, and 350 μ l of the Buffer CC (cell lysis solution)



- Heat tubes at 65 °C overnight
- Shake tubes with Vortex at maximum speed for 10 minutes or Tissue Lyser at 30 times/sec for 3 minutes, 3-4 times
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute

Protein Precipitation



- Add 400 μ l of the Buffer CB



- Invert the tubes to mix the contents
- Incubate at 4 °C for 1 hour
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute

Bind DNA

- Transfer the supernatant to 2 ml Collection Tubes that installed Column CC
- Centrifuge at 10,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes

**Wash**

- Add 400 μ l of the Buffer W1 into the Column CC
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes
- Add 600 μ l of the Buffer W2 into the Column CC
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes
- Centrifuge at 14,000 x g for 2 minutes

**Elute**

- Transfer the dried Column CC to a new 1.5 ml microcentrifuge tubes (Being careful not to splash liquid on the spin filter basket)
- Add 50 μ l of Solution BE to the center of the white filter membrane
- Let stand at 60 °C for 3 minutes
- Centrifuge at 14,000 x g for 2 minutes to elute the purified DNA

**DNA**

- Storing DNA frozen at -20 or -40 °C and at -80 °C for long term

วิธีการที่ 2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างสด และตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วย

สกัดดีเอ็นเอโดยใช้ PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit โดยดัดแปลงจากวิธีการสำหรับ PureDireX® Genomic DNA Isolation Kit ของบริษัท BIO-HELIX จำกัด มีวิธีการ ดังนี้

1. ตัดเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่ต้องการตรวจสอบเป็นเส้นเล็กๆ และตัดให้ละเอียดให้มากที่สุดอีกครั้งด้วยกรรไกร

ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุเนื้อเยื่อที่ละเอียด โดยใช้ปลายใบมีดตัดประมาณปลายใบมีด หรือ ปริมาณ 0.2 กรัม สำหรับตัวอย่างแห้ง และ ปริมาณ 0.5 กรัม สำหรับตัวอย่างสด ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml

2. บดเนื้อเยื่อด้วย Pre+Sterized ขนาด 1.5 mL & 2.0 mL Pestle จนละเอียด

3. เติม micro glass beads ขนาด 0.5 mm ประมาณ 0.1 กรัม และ micro glass beads ขนาด 1.0 mm ประมาณ 0.1 กรัม ลงในหลอด microcentrifuge จากข้อ 2

4. เติม *Trichoderma* enzyme ความเข้มข้น 200 µg/µl ปริมาณ 8 µl และเติม cell lysis solution (Buffer CC) ปริมาณ 350 µl ลงในหลอด

5. สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อแห้ง วางหลอดจากข้อ 4 ไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 2 วัน (48 ชั่วโมง) และสำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อสด ไม่ต้องทำขั้นตอนนี้

6. จากนั้นบ่มหลอดจากข้อ 5 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง หรือ overnight

7. จากนั้นนำมาเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที จำนวน 3-4 ครั้ง

8. ปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที

9. เติม Buffer CB ปริมาณ 400 µl กลับหลอดไปมาเพื่อให้สารเข้ากัน จากนั้นนำหลอดไปพักไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมงเพื่อตกตะกอนโปรตีน

10. นำหลอดจากข้อ 9 มาปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที

11. ดูดเฉพาะส่วนใสที่อยู่ด้านบน (supernatant) ค่อยๆ หยดลงใน Column CC ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 ml (หลอดใหม่)

12. นำหลอดจากข้อ 11 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 10,000 x g นาน 1 นาที

13. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม

14. เติมสารละลาย Buffer W1 ปริมาณ 400 µl โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC

15. นำหลอดจากข้อ 14 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที

16. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ทิ้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม

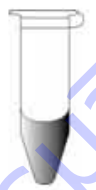
17. เติมสารละลาย Buffer W2 ปริมาณ 600 µl โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC

18. นำหลอดจากข้อ 17 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 1 นาที
19. เทสารละลายที่กรองผ่าน Column CC ทั้ง และนำ Column CC ใส่กลับไปยังหลอดเดิม
20. นำหลอดจากข้อ 19 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที
21. ย้าย Column CC ไปบรรจุลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml
22. เติมสารละลาย Solution BE ปริมาณ 50 μ l โดยค่อยๆ หยดลงใน Column CC โดยระวังไม่ให้ปลาย tip โดนด้านข้างของ column และให้ปลาย tip ใกล้กับ filter membrane
23. Incubate ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที
24. นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารละลายผ่าน column ด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 14,000 x g นาน 2 นาที เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

Protocol 2: DNA extraction from Banana plant materials (fresh and dried)

Extraction protocol using PureDireX[®] Genomic DNA Isolation Kit (Modified from protocol instruction for PureDireX[®] Genomic DNA Isolation Kit that designed by BIO-HELIX Co., LTD.) Modified by Chanintorn Doungsa-ard

Cell Lysis



- Add small pieces of banana pseudo stem into 1.5 microcentrifuge tubes
- Grind plant material using Pre+Sterized 1.5 mL & 2.0 mL Pestle
- Add 0.5 mm and 1.0 mm micro beads, *Trichoderma* enzyme 200 μ g/ μ l, and 350 μ l of the Buffer CC (cell lysis solution)

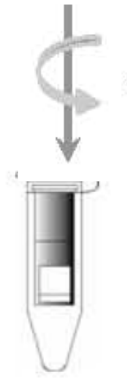


- Let stand at RT for 2 days for dried specimen, but can skip this step for fresh specimens
- Heat tubes at 65 °C overnight
- Shake tubes with Vortex at maximum speed for 10 minutes or Tissue Lyser at 30 times/sec for 3 minutes, 3-4 times
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute



- Add 400 μ l of the Buffer CB

Protein Precipitation

Bind DNA

- Invert the tubes to mix the contents
- Incubate at 4 °C for 1 hour
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute

Wash

- Add 400 µl of the Buffer W1 into the Column CC
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes
- Add 600 µl of the Buffer W2 into the Column CC
- Centrifuge at 14,000 x g for 1 minute
- Discard the flow-through and place the Column CC back into the same Collection Tubes
- Centrifuge at 14,000 x g for 2 minutes

Elute

- Transfer the dried Column CC to a new 1.5 ml microcentrifuge tubes (Being careful not to splash liquid on the spin filter basket)
- Add 50 µl of Solution BE to the center of the white filter membrane
- Let stand at 60 °C for 3 minutes
- Centrifuge at 14,000 x g for 2 minutes to elute the purified DNA

DNA

- Storing DNA frozen at -20 or -40 °C and at -80 °C for long term

2. ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Foc TR4

ดำเนินการทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 จำนวน 5 เส้น ได้แก่

TR4-F2	CAG GCC AGA GTG AAG GGG GAT (Bentley <i>et al.</i> , 2003)
TR4-R1	CGC CAG GAC TGC CTC GTG A (Bentley <i>et al.</i> , 2003)
FocTR4-F	CACGTTTAAGGTGCCATGAGAG (Dita <i>et al.</i> , 2010)
FocTR4-R1	CGCACGCCAGGACTGCCTCGTGA (Dita <i>et al.</i> , 2010)
FocTR4-R2	GCCAGGACTGCCTCGTGA (Dita <i>et al.</i> , 2010)

จับคู่ไพรเมอร์สำหรับการทดสอบความจำเพาะจำนวน 3 คู่ ดังนี้

1. TR4-F2/TR4-R1
2. FocTR4-F/FocTR4-R1
3. FocTR4-F/FocTR4-R2

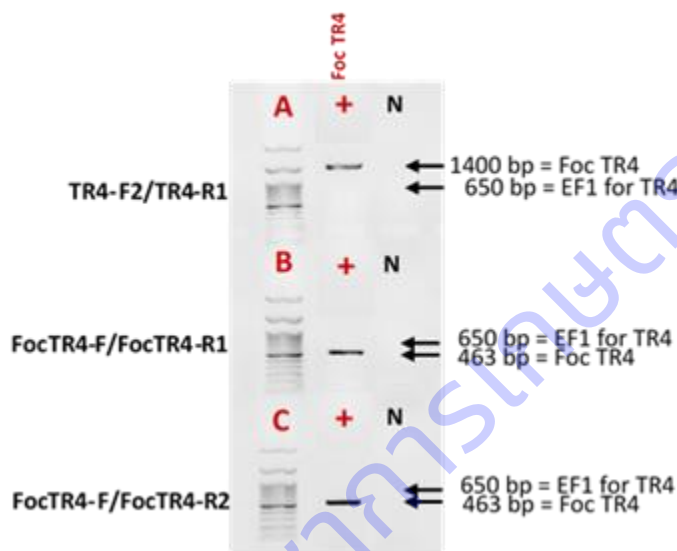
ทดสอบไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่กับ plasmid มาตรฐานของเชื้อรา Foc TR4 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4 strain VCG 01213/16 NRRL 36114 (Ballard *et al.*, 2018; Dita *et al.*, 2010; O'Donnell *et al.*, 1998) ที่ความเข้มข้น 500 pg ซึ่งมีตำแหน่งจำเพาะ (binding site) ของไพรเมอร์แต่ละเส้นดังแสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตำแหน่งจำเพาะ (binding site) ของไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4

2.1 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ Plasmid DNA standard ของ Foc TR4

เมื่อทำการทดสอบปฏิกิริยา PCR เพื่อหา cycling parameters ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ที่ได้รับ การออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 ทั้ง 3 คู่ โดยทดสอบกับ plasmid DNA มาตรฐานของเชื้อรา Foc TR4 (VCG 01213/16) NRRL36114 พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ ได้แก่ TR4-F2/TR4-R1 FocTR4-F/FocTR4-R1 และ FocTR4-F/FocTR4-R2 สามารถตรวจจับ plasmid DNA มาตรฐานของเชื้อรา Foc TR4 (VCG 01213/16) NRRL36114 ได้ (ภาพที่ 2) โดยมี annealing temperature ที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียส จำนวน 30 cycle (ภาพที่ 3) ดังนั้น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 (VCG 01213/16) NRRL36114 สามารถใช้เป็น positive control ในการตรวจสอบชนิดของเชื้อรา Foc TR4



ภาพที่ 2 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 เมื่อทดสอบกับ plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 (VCG 01213/16) NRRL36114

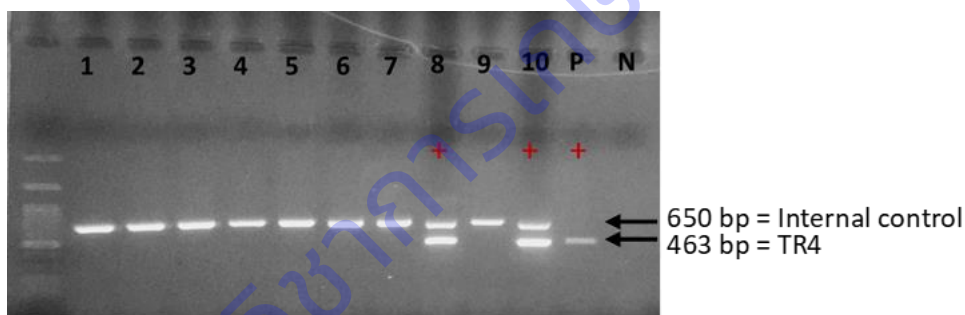
PCR Cycling Parameters	temp. °C	time	Cycle
Initial denaturation	95	5 mins	-
Denaturation	95	1 min	30
Annealing	60	1 min	
Extension	72	3 mins	
Final extension	72	10 mins	-

ภาพที่ 3 PCR Cycling Parameters ของไพรเมอร์ TR4-F2/TR4-R1 FocTR4-F/FocTR4-R1 และ FocTR4-F/FocTR4-R2

2.2 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ DNA template จาก clean culture ของเชื้อรา *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ของ Foc TR4

นำไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 ได้แก่ FocTR4-F/FocTR4-R2 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cycling parameters จากข้อ 2.1 กับ DNA template ที่สกัดได้จาก clean culture ของเชื้อรา Foc ที่ได้จำแนกชนิดแล้ว ได้แก่ เชื้อรา Foc race 1 (lane 1-7 และ 9) และ Foc TR4 (lane 8 และ 10) โดยใช้ไพรเมอร์ตำแหน่ง translation elongation factor alpha 1 ได้แก่ EF-1/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998) ซึ่งมีขนาด PCR product ประมาณ 650 bp เป็น internal control พบว่า internal control primer สามารถตรวจจับ DNA ของเชื้อรา Foc ได้ทั้งหมด (lane ที่ 1-10) ยกเว้น lane P ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 และไม่มี binding site สำหรับ EF-1/EF-2 (ภาพที่ 4)

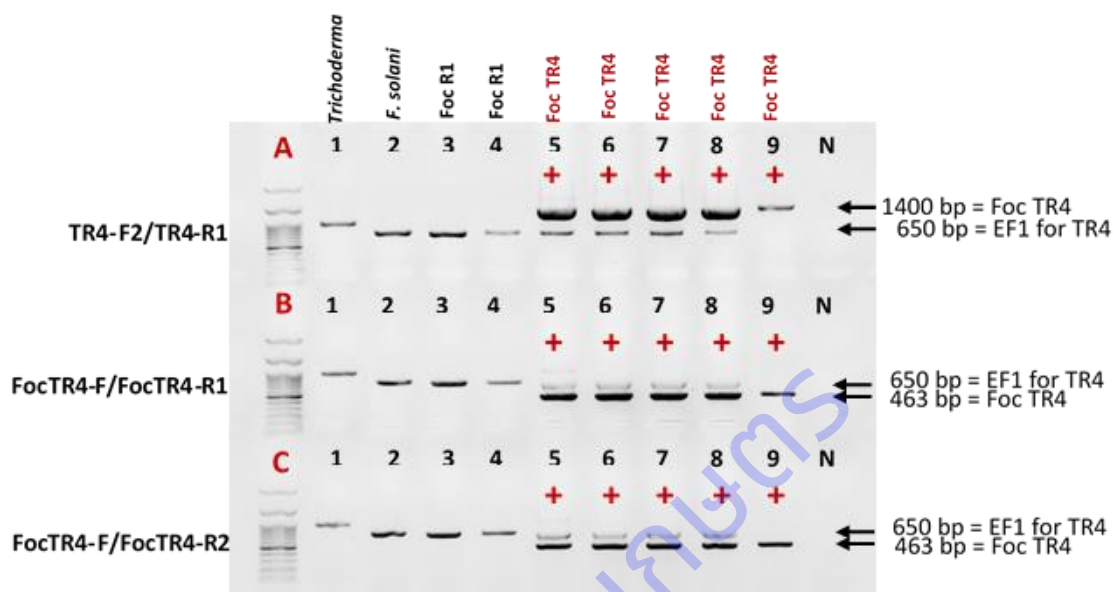
จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 สามารถตรวจจับได้เฉพาะ DNA ของเชื้อรา Foc TR4 (lane 8 และ 10) รวมถึง positive control (lane P) ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 เท่านั้น และมีขนาดของ PCR product ประมาณ 463 bp (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ผลการทดสอบไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 โดยทดสอบกับ DNA template ที่สกัดได้จาก clean culture ของเชื้อรา Foc: เชื้อรา Foc race 1 (lane 1-7 และ 9); Foc TR4 (lane 8 และ 10); positive control (lane P); negative control (lane N) ด้วยวิธี Duplex PCR

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 จำนวน 3 คู่ ได้แก่ TR4-F2/TR4-R1 FocTR4-F/FocTR4-R1 และ FocTR4-F/FocTR4-R2 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cycling parameters จากข้อ 2.1 กับ DNA template ที่สกัดได้จาก clean culture ของเชื้อราที่จำแนกชนิดแล้ว ได้แก่ *Trichoderma* sp., *Fusarium solani*, *F. oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 (Foc R1) และ *F. oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4) โดยใช้ไพรเมอร์ตำแหน่ง translation elongation factor alpha 1: EF-1/EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998) เป็น internal control ซึ่งมีขนาดของ PCR product ประมาณ 650 bp (ภาพที่ 5)

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ สามารถตรวจจับได้เฉพาะ DNA ของเชื้อรา Foc TR4 (lane 5-8) รวมถึง positive control (lane 9) ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 เท่านั้น ซึ่งไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R1 และ FocTR4-F/FocTR4-R2 มีขนาดของ PCR product ประมาณ 463 bp และไพรเมอร์ TR4-F2/TR4-R1 มีขนาดของ PCR product ประมาณ 1,400 bp (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ผลการทดสอบไพรเมอร์ TR4-F2/TR4-R1 FocTR4-F/FocTR4-R1 และ FocTR4-F/FocTR4-R2 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 โดยทดสอบกับ DNA template ที่สกัดได้จาก clean culture ของเชื้อรา: *Trichoderma* (lane 1); *Fusarium solani* (lane 2); Foc race 1 (lane 3-4); Foc TR4 (lane 5-8); positive control (lane 9); negative control (lane N) ด้วยวิธี Duplex PCR

2.3 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ DNA template จากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพรายของเชื้อรา Foc TR4

นำไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 ได้แก่ FocTR4-F/FocTR4-R2 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cycling parameters จากข้อ 2.1 กับ DNA template ที่สกัดได้จากตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา Foc TR4 (lane 1-6) และตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยปกติที่ (lane 7) โดยใช้ไพรเมอร์ Ban-Actin2-F/Ban-Actin2-R (Dita *et al.*, 2010) ซึ่งจะตรวจจับกับ DNA ของพืชบริเวณตำแหน่งยีน Actin เป็น internal control ซึ่งมีขนาดของ PCR product ประมาณ 200 bp พบว่า internal control primer สามารถตรวจจับ DNA ของกล้วยได้ แสดงให้เห็นว่า DNA ที่สกัดได้มี DNA ของพืชอยู่ด้วย (lane ที่ 1-15) ยกเว้น lane P ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 และไม่มี binding site สำหรับ Ban-Actin2-F/Ban-Actin2-R (ภาพที่ 6)

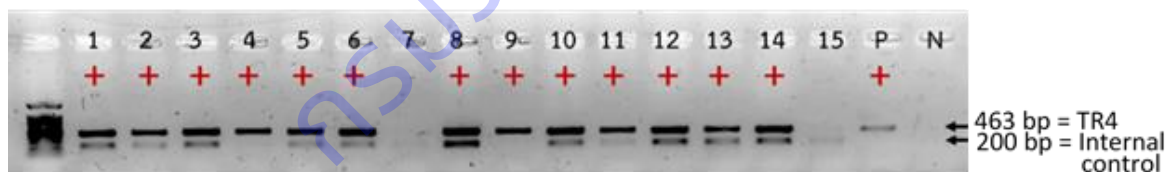
จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 สามารถตรวจจับ DNA ของเชื้อรา Foc TR4 ที่อยู่ในตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยได้ (lane 1-6) รวมถึง positive control (lane P) ซึ่งเป็น

plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 เท่านั้น และมีขนาดของ PCR product ประมาณ 463 bp ซึ่งในขณะเดียวกัน ไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 แสดงผลเป็นลบ ในตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่ปกติหรือไม่เป็นโรคตายพราย (lane 7) (ภาพที่ 6)

2.4 ผลการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อ DNA template จากตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพรายของเชื้อรา Foc TR4

นำไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบให้มีความจำเพาะต่อ Foc TR4 ได้แก่ FocTR4-F/FocTR4-R2 มาทดสอบปฏิกิริยา PCR โดยใช้ cycling parameters จากข้อ 2.1 กับ DNA template ที่สกัดได้จากตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยจากส่วนที่แสดงอาการของโรคตายพรายที่เกิดจากเชื้อรา Foc TR4 (lane 8-14) และตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยปกติที่ (lane 15) โดยใช้ไพรเมอร์ Ban-Actin2-F/Ban-Actin2-R (Dita *et al.*, 2010) ซึ่งจะตรวจจับกับ DNA ของพืชบริเวณตำแหน่งยีน Actin เป็น internal control ซึ่งมีขนาดของ PCR product ประมาณ 200 bp พบว่า internal control primer สามารถตรวจจับ DNA ของกล้วยได้ แสดงให้เห็นว่า DNA ที่สกัดได้มี DNA ของพืชอยู่ด้วย (lane ที่ 1-15) ยกเว้น lane P ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 และไม่มี binding site สำหรับ Ban-Actin2-F/Ban-Actin2-R (ภาพที่ 6)

จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่าไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 สามารถตรวจจับ DNA ของเชื้อรา Foc TR4 ที่อยู่ในตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยได้ (lane 8-14) รวมถึง positive control (lane P) ซึ่งเป็น plasmid DNA มาตรฐานของ Foc TR4 เท่านั้น และมีขนาดของ PCR product ประมาณ 463 bp ซึ่งในขณะเดียวกัน ไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 แสดงผลเป็นลบ ในตัวอย่างสดของเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่ปกติหรือไม่เป็นโรคตายพราย (lane 15) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ผลการทดสอบไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 โดยทดสอบกับ DNA template ที่สกัดได้จากตัวอย่างสด และตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่แสดงอาการของโรคตายพรายจากเชื้อรา Foc TR4 และต้นปกติ: ตัวอย่างสดที่เป็นโรค (lane 1-6); ตัวอย่างสดที่อาการปกติ (lane 7); ตัวอย่างแห้งที่เป็นโรค (lane 8-14); ตัวอย่างแห้งที่อาการปกติ (lane 15); positive control (lane P); negative control (lane N) ด้วยวิธี Duplex PCR

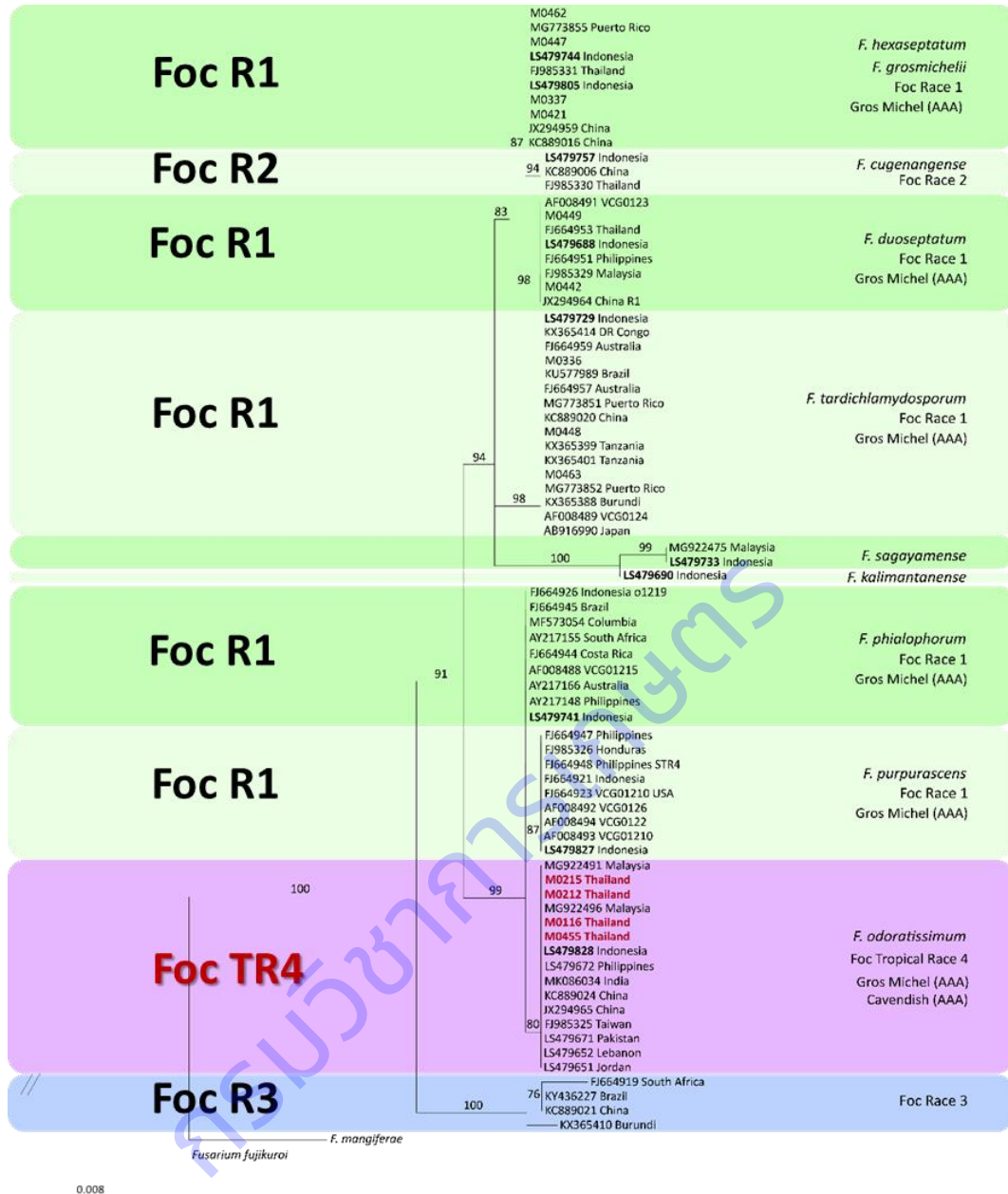
3. ตรวจสอบชนิดของ Foc TR4

นำเชื้อราที่มีผลทดสอบการด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 มาทำการยืนยันชนิดที่ถูกต้องอีกครั้ง โดยดำเนินการเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ของยีน

ตำแหน่ง the translation elongation factor 1-alpha (*tef1*) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อทำ purification และ sequencing

จัดทำ contig ของลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2021 จากนั้นจัดเรียง (align) เป็นชุดข้อมูล (dataset) ร่วมกับ type sequences และ dataset จากการศึกษาของ Maryani *et al.* (2019) โดยวิเคราะห์จาก *tef1* ของ 80 taxa โดยมี *F. fujikuroi* เป็น outgroup ทำการวิเคราะห์รวม 581 bases/taxa เมื่อวิเคราะห์ phylogenetic reconstruction ด้วย phylogenetic criteria แบบ Maximum Likelihood (ML) และวิเคราะห์โดยโปรแกรม RAxML v8.1.15 (Stamatakis, 2014) พบว่า topology ที่ได้เป็น monophyletic (ภาพที่ 7) โดย phylogram ที่ได้จาก ML พิจารณาค่า bootstrap support values ($\geq 70\%$) ที่วิเคราะห์จาก 1,000 ซ้ำ ผลจากการวิเคราะห์และจำแนกด้วยวิธี phylogenetic reconstruction พบว่า เชื้อราไอโซเลทที่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 สามารถตรวจจับได้หรือให้ผลเป็นบวก ถูกจำแนกอยู่ใน clade เดียวกับเชื้อรา Foc TR4 (ภาพที่ 7)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 7 Phylogram ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลของยีนตำแหน่ง the translation elongation factor 1- alpha (*tef1*) ของเชื้อราไอโซเลทที่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 สามารถตรวจจับได้ (ตัวอักษรสีแดงเข้ม) เปรียบเทียบกับ type species dataset จากการศึกษานของ Maryani *et al.* (2019) ด้วยวิธี maximum likelihood ด้วยโปรแกรม RAXML ค่า bootstrap (มากกว่าหรือเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์) เหนือแต่ละ node ได้จากการวิเคราะห์ 1,000 ซ้ำ

การทดลองที่ 1.8 การตรวจสอบโรคใบด่างมันสำปะหลังที่เกิดจากเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic* วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV)

เก็บตัวอย่างมันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างและเสียรูปทรงจากแปลงปลูกมันสำปะหลังในจังหวัดศรีสะเกษ จันทบุรี บุรีรัมย์ และปราจีนบุรี โดยลักษณะอาการที่พบในแปลงสามารถจำแนกสาเหตุของการเกิดโรคได้ 2 สาเหตุ คือ 1) เกิดจากการใช้ท่อนพันธุ์ที่เป็นโรคมาปลูก (ภาพที่ 1ก) และ 2) อาการที่เกิดจากมีแมลงหิวขาวยาสูบ (ภาพที่ 1ข) เมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR พบว่าเป็นโรคใบด่างมันสำปะหลัง จึงได้กำหนดเป็นไอโซเลต Chanthaburi

2. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และโครงสร้างจีโนม

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค Next generation sequencing (NGS) จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต Sakaeo, Prachinburi, Chanthaburi และ Burirum ซึ่งผลการวิเคราะห์และ Accession number (Acc. No.) นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ SLCMV จำนวน 8 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Sanger sequencing มาร่วมวิเคราะห์ความสัมพันธ์ในการศึกษารุ่นนี้ด้วย (ตารางที่ 1)

โครงสร้างจีโนมของเชื้อ SLCMV ประกอบด้วยดีเอ็นเอวงปิดสายเดี่ยว จำนวน 2 โมเลกุล (ภาพที่ 2) เรียกว่า DNA-A แพลรหัสให้โปรตีนจำนวน 6 โปรตีน ซึ่งมีรหัสการแปลรหัสเป็นโปรตีนอยู่บนสายบวก (viral strand) จำนวน 2 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน AV2 (Pre-coat protein) และ โปรตีน AV1 หรือโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (Coat protein: CP) และมีรหัสการแปลรหัสเป็นโปรตีนอยู่บนสายคู่สม (complementary strand) จำนวน 6 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน AC1 (Replication-associated protein: Rep), AC2 (Transcriptional activator protein: TrAP), AC3 (Replication enhancer: REEn) และ โปรตีน AC4

สำหรับ DNA-B สามารถแปลรหัสให้โปรตีนจำนวน 2 โปรตีน ซึ่งมีรหัสการแปลรหัสเป็นโปรตีนอยู่บนสายบวกและบนสายคู่สม สายละ 1 โปรตีน ได้แก่ โปรตีน BV1 (Nuclear shuttle protein: NSP) และ BC1 (Movement protein: MP) ตามลำดับ

เชื้อ SLCMV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในสกุล *Begomovirus* ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน จำนวน 9 นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ TAATATTAC (nanomer) ในส่วนของ common region ทั้งใน DNA-A และ DNA-B ซึ่งบริเวณดังกล่าวเป็นบริเวณสำหรับเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อไวรัส (Gutierrez, 2000; Laufs *et al.*, 1995) ซึ่งพบลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวในเชื้อ SLCMV ทั้ง 12 ไอโซเลตที่ศึกษาในครั้งนี้ด้วย

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AC1 (Rep.) พบว่ามีจำนวนกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน 2 แบบ คือ แบบที่ 1) โปรตีน AC1 ที่มีกรดอะมิโน จำนวน 1035 เรซิดิวส์ ได้แก่ ไอโซเลต Srisaket, Chanthaburi, Chachoengsao, Surin, Nakhon Ratchasima และ Sa Kaeo ส่วนแบบที่ 2) โปรตีน AC1 ที่มีกรดอะมิโน จำนวน 1056 เรซิดิวส์ ได้แก่ ไอโซเลต Prachinburi, Rayong, Khon Kaen, Ubon Ratchathani, Chonburi และ Burirum (ภาพที่ 3) โปรตีน AC1 (Rep.) มีหน้าที่เกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณของ

จีโนมไวรัสในพืช จากรายงานของ Wang *et al.* (2020) พบว่า กรดอะมิโนจำนวน 7 เรซิดิวส์ ทางด้าน carboxyl terminus มีผลต่อความรุนแรง (virulence) เชื้อไวรัสและปริมาณของเชื้อไวรัส (titer) ในพืช และนอกจากนี้ยังมีผลต่อการชักนำ เกี่ยวกับกรดซาลิไซลิกในการป้องกันจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสอีกด้วย

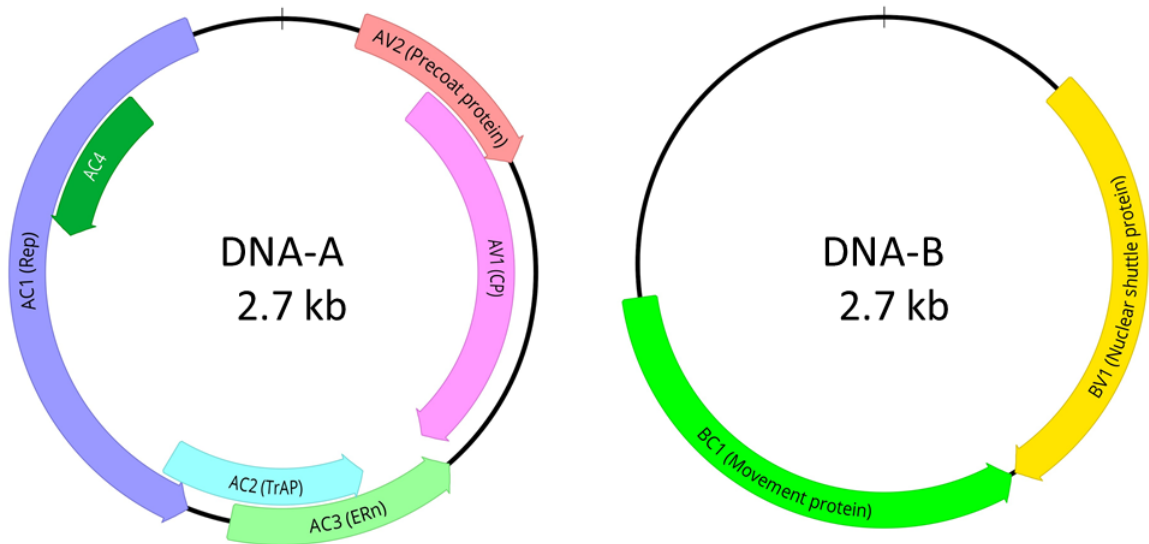
3. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (multiple alignment) และความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ด้วย phylogenetic tree

จากการทำ multiple alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของเชื้อ SLCMV ไอโซเลต Srisaket Buriram Chanthaburi และ Prachinburi ร่วมกับ ไอโซเลต ๆ ของประเทศไทย จำนวน 8 ไอโซเลต พบว่า DNA-A มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.1% - 99.9% และ DNA-B ที่ระดับ 98.2% - 99.9 % (ตารางที่ 2)

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ด้วย phylogenetic tree ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง DNA-A (ภาพที่ 4) และ DNA-B (ภาพที่ 5) กับเชื้อ SLCMV ICMV และ ACMV ที่มีรายงานในประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ พบว่าเชื้อ SLCMV ของไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ SLCMV ที่ก่อให้เกิดโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบรายงานในประเทศอินเดีย ศรีลังกา กัมพูชา เวียดนาม ลาว และจีน



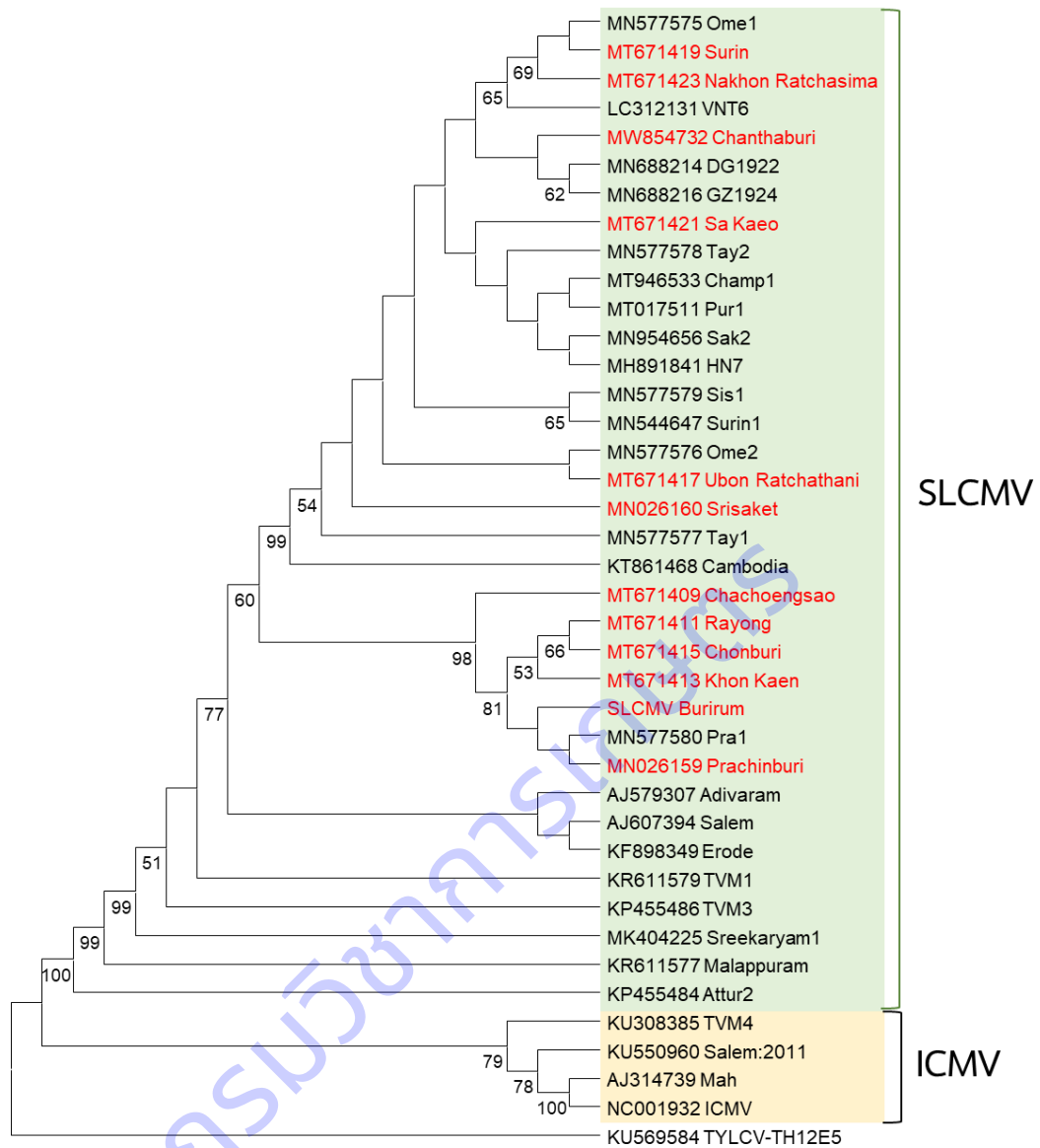
ภาพที่ 1 มันสำปะหลังที่แสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนหรือเหลืองสลับเขียวเข้ม ใบหงิกงอ และเสียรูปทรงทั่วทั้งต้นที่เกิดจากท่อนพันธุ์หรือเหง้า (ก) และถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหริ้วขาวยาสูบ บริเวณใบยอดและใบล่างที่ถัดลงมาจากยอดของต้น (ข)



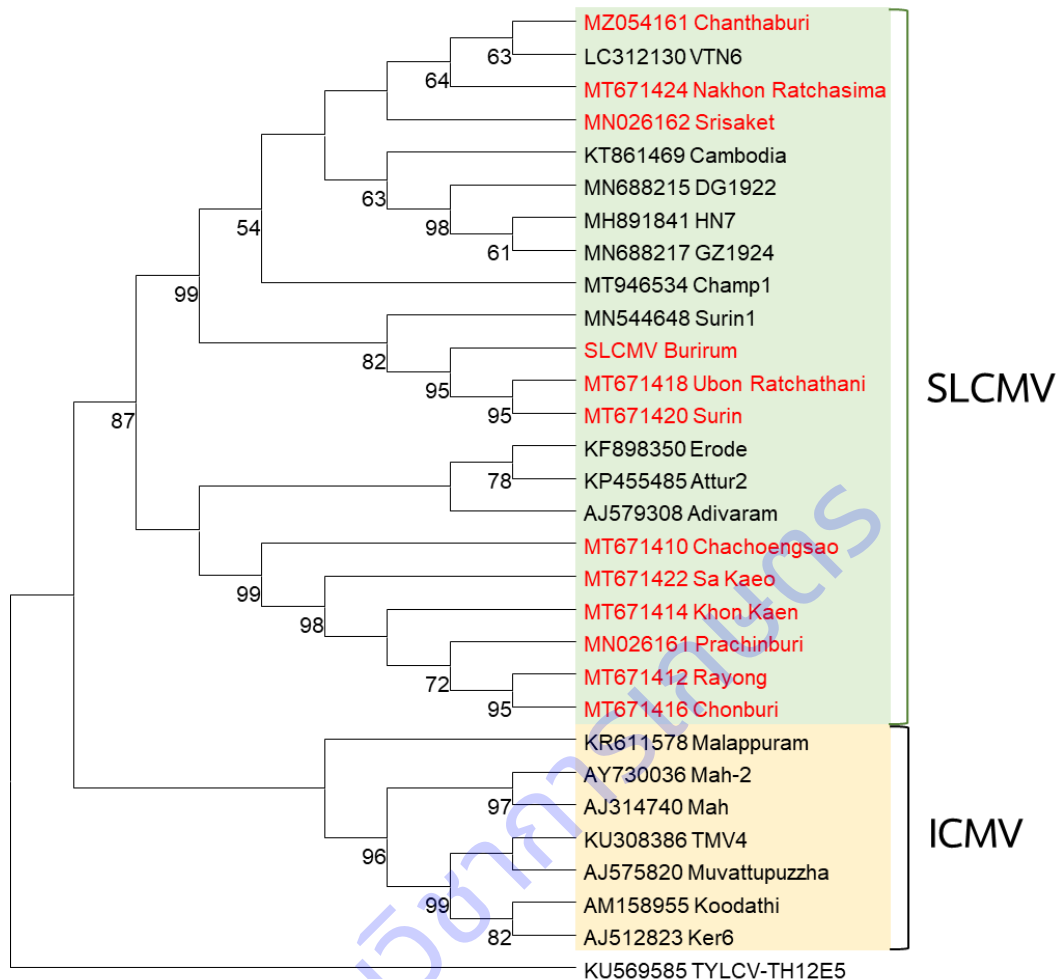
ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างจีโนมของเชื้อไวรัส SLCMV ทั้ง DNA-A และ DNA-B ที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างมันสำปะหลัง

Srisaket	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*
Chanthaburi	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*
Ubon Ratchathani	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*
Sa Kaeo	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*
Surin	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*
Nakhon Ratchasima	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSN*
Burirum	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSNQGPTQGS*
Prachinburi	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSNQGPTQGS*
Chachoengsao	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSNQGPTQGS*
Khon Kaen	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSNQGPTQGS*
Rayong	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSNQGPTQGR*
Chonburi	LCNPGPNSSYKEFLDEAKNSALKAWALKNATFISLSEPLYSGSNQGPTQGR*

ภาพที่ 3 แสดงลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน AC1 (Rep.) พบว่ามีจำนวนกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง DNA-A ของเชื้อ SLCMV จำนวน 12 ไอโซเลต (ตัวอักษรสีแดง) ของไทยกับไอโซเลตอื่น ๆ ของเชื้อ SLCMV และ *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) ที่มีรายงานในต่างประเทศ วิเคราะห์ความสัมพันธ์แบบ Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม MEGA X ใช้ค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% และใช้ข้อมูลของเชื้อ *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCV-TH12E5) เป็น outgroup



ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ทั้ง DNA-B ของเชื้อ SLCMV จำนวน 12 ไอโซเลต (ตัวอักษรสีแดง) ของไทยกับไอโซเลตอื่น ๆ ของเชื้อ SLCMV และ *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) ที่มีรายงานในต่างประเทศ วิเคราะห์ ความสัมพันธ์แบบ Neighbor-joining ด้วยโปรแกรม MEGA X ใช้ค่า bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% และใช้ข้อมูลของเชื้อ *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCV-TH12E5) เป็น outgroup

ตารางที่ 1 ไอโซเลต Accession number และขนาดของจีโนมเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) จำนวน 12 ไอโซเลต

จังหวัด	ไอโซเลต	Acc. No.	จีโนม	นิวคลีโอไทด์				
				A	T	C	G	รวม
ศรีสะเกษ	Srisaket	MN026160	DNA-A	696	797	608	657	2758
		MN026162	DNA-B	713	855	541	628	2737
จันทบุรี	Chanthaburi	MW854732	DNA-A	698	797	609	654	2758
		MZ054161	DNA-B	715	854	539	629	2737
ปราจีนบุรี	Prachinburi	MN026159	DNA-A	693	799	612	656	2760
		MN026161	DNA-B	711	853	538	635	2737
บุรีรัมย์	Burirum	Not assigned	DNA-A	693	799	611	656	2759
		Not assigned	DNA-B	713	857	538	629	2737
สุรินทร์	Surin	MT671419	DNA-A	695	799	606	658	2758
		MT671420	DNA-B	713	857	538	629	2737
อุบลราชธานี	Ubon Ratchathani	MT671417	DNA-A	695	797	609	657	2758
		MT671418	DNA-B	713	857	538	629	2737
สระแก้ว	Sa Kaeo	MT671421	DNA-A	695	798	608	658	2759
		MT671422	DNA-B	713	853	537	634	2737
ฉะเชิงเทรา	Chachoengsao	MT671409	DNA-A	693	801	611	654	2759
		MT671410	DNA-B	714	852	539	632	2737
นครราชสีมา	Nakhon Ratchasima	MT671423	DNA-A	695	798	607	658	2758
		MT671424	DNA-B	713	855	539	630	2737
ระยอง	Rayong	MT671411	DNA-A	693	799	610	657	2759
		MT671412	DNA-B	712	850	538	637	2737
ชลบุรี	Chonburi	MT671415	DNA-A	693	798	610	657	2758
		MT671416	DNA-B	713	850	538	636	2737
ขอนแก่น	Khon Kaen	MT671413	DNA-A	694	797	612	655	2758
		MT671414	DNA-B	712	854	538	633	2737

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของเชื้อ *Sri Lankan cassava mosaic virus* (SLCMV) ไอโซเลต Prachinburi, Srisaket, Chanthaburi และ Buriram เทียบกับ ไอโซเลตอื่น ๆ จำนวน 8 ไอโซเลต

ไอโซเลต	DNA-A											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Buriram		99.9	99.8	99.8	99.8	99.7	99.3	99.3	99.3	99.2	99.2	99.2
Prachinburi	99.9		99.8	99.9	99.9	99.8	99.4	99.3	99.3	99.3	99.3	99.3
Khon Kaen	99.9	100		99.7	99.8	99.7	99.3	99.2	99.2	99.2	99.2	99.2
Chachoengsao	99.7	99.7	99.7		99.8	99.7	99.3	99.2	99.3	99.3	99.2	99.2
Chonburi	99.6	99.7	99.7	99.9		99.9	99.3	99.2	99.3	99.2	99.2	99.2
Rayong	99.6	99.6	99.6	99.7	99.7		99.2	99.2	99.2	99.1	99.1	99.1
Ubon Ratchathani	98.5	98.4	98.4	98.6	98.6	98.4		99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
Nakhon Ratchasima	98.5	98.4	98.4	98.5	98.4	98.4	99.7		99.8	99.8	100	99.8
Sa Kaeo	98.4	98.4	98.4	98.5	98.4	98.4	99.7	99.9		99.8	99.8	99.8
Srisaket	98.4	98.3	98.3	98.4	98.3	98.3	99.6	99.8	99.9		99.8	99.8
Surin	98.4	98.3	98.3	98.4	98.3	98.3	99.6	99.8	99.9	99.9		99.8
Chanthaburi	98.2	98.1	98.1	98.2	98.2	98.1	99.5	99.7	99.7	99.6	99.6	

DNA-B

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

เนื่องจากแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Burkholderia glumae*, *Ralstonia solanacearum* species complex, *Pseudomonas fuscovaginae*, ไวรัส *African Cassava Mosaic Virus*, *Sri Lankan cassava mosaic virus* และ รา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 เป็นศัตรูพืชกักกันของประเทศไทย จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ทันสมัยและมีประสิทธิภาพในการตรวจสอบศัตรูพืชเหล่านี้เพื่อป้องกันไม่ให้เข้ามาสู่การในประเทศไทยและเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบติดตามและตรวจหาศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทยเพื่อคงสภาพการเป็นศัตรูพืชกักกัน โดยจากผลการทดลองพบว่า สามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชให้ทันสมัย รวดเร็ว แม่นยำมากขึ้น โดยไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* และ Cmn probe ความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดย Cms probe มีความไวในการตรวจที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 25 pg/ปฏิกิริยา และ Cmn probe มีความไวในการตรวจที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 50 pg/ ปฏิกิริยา การพัฒนาตรวจสอบไวรัส ACMV สาเหตุโรคใบด่างเหลืองมันสำปะหลัง ได้ออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส ACMV เชื้อไวรัส CMVs รวมจำนวน 2 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1 ประกอบด้วยไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์คู่ที่ 1.1 และ ไพรเมอร์คู่ที่ 1.2 สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV และ CMVs ได้อย่างแม่นยำ และ ไพรเมอร์คู่ที่ 1.3 สามารถตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) และ SLCMV ชุดที่ 2 ประกอบด้วยไพรเมอร์ทั้งหมดจำนวน 4 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์คู่ที่ 2.1-2.4 ที่สามารถใช้สำหรับตรวจหาเชื้อไวรัส ACMV, ICMV, EACMV (EACMV-UG) และ SLCMV การตรวจหาแบคทีเรีย *B. glumae* ในข้าวได้ไพรเมอร์ BG1F/BG1R สำหรับตรวจด้วยเทคนิค Real-time PCR ที่มีความเฉพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจแบคทีเรียความเข้มข้นเซลล์ 15 โคโลนี/มิลลิลิตร การตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *R. solanacearum* species complex สาเหตุโรคเหี่ยวของกล้วย พบว่าไพรเมอร์ 121F/121R สามารถใช้ตรวจหาแบคทีเรีย *R. syzygii* subsp. *celebensis* ได้อย่างเฉพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจเซลล์ความเข้มข้น 2.6×10^3 โคโลนี/มิลลิลิตร และ ดีเอ็นเอความเข้มข้น 5 พิโคกรัม/ไมโครลิตร การทดสอบเทคนิค LAMP สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* ในข้าว พบว่าชุดไพรเมอร์ Pf8 เกิดผลบวกกับแบคทีเรีย *P. fuscovaginae* และ *B. glumae* มีความไวในการตรวจหาเชื้อที่ความเข้มข้นเซลล์ 15 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร วิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 โดยพบว่าไพรเมอร์ FocTR4-F/FocTR4-R2 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อรา Foc TR4 สามารถตรวจได้จากทั้ง DNA template ที่สกัดได้จากตัวอย่างสด และตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อต้นกล้วยที่แสดงอาการของโรคตายพรายจากเชื้อรา Foc TR4 จาก การตรวจสอบและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A และ DNA-B ของไวรัสใบด่างมันสำปะหลัง จำนวน 12 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Next generation sequencing และนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ SLCMV ด้วย phylogenetic tree พบว่าเชื้อ SLCMV ของไทยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับเชื้อ SLCMV ที่ก่อให้เกิดโรคใบด่างมันสำปะหลังที่พบรายงานในประเทศอินเดีย ศรีลังกา กัมพูชา เวียดนาม ลาว และจีน

กิจกรรมที่ 2

การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อป้องกันกำจัด
และการส่งออก

ชื่อผู้วิจัย

รุ่งนภา ทองเครื่อง
กาญจนา วาระวิชนี
พรพิมล อธิปัญญาคม
สิทธิศักดิ์ แสนไพศาล
แสนชัย คำหล้า
วาสนา รุ่งสว่าง
ภูวนารถ มณีโชติ
ยุวรินทร์ บุญทบ
ไตรเดช ชำยทอง
ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล
บุรณี พิววงศ์แพทย์
ทิพวรรณ กันหาญาติ
ชนินทร์ ดวงสอาด
มะโนรัตน์ สุดสงวน
ปรียพรรณ พงศาพิชณ์
ชลธิชา รักไคร่
วันเพ็ญ ศรีชาติ
วานิช คำพานิช
โสภา มีอำนาจ
พรรณนิภา เปี้ยศรี
ภานุวัฒน์ มูลจันทะ
นพรัตน์ จันท์หอม
ธิติยา สารพัฒน์
ชุตติกาญจน์ ใจแล
อังคณา พวงเงินมาก

คำสำคัญ (Key words)

การตรวจวินิจฉัย, การตรวจสอบ, ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป, เชื้อไฟโตพลาสมา, เชื้อไวรัส, เซรัมวิทยา, ทอสโฟไวรัส, เทคนิค real-time PCR, เทคนิคทางอณูชีววิทยา, เทคนิคแลมป์, โรคจุดดำของส้มโอ, โรคเน่าดำของคะน้า, โรคใบขาวอ้อย, โรคใบต่างลาย, ไล่เดือนฝอย, ไล่เดือนฝอยรากปม แอนติบอดีของโปรตีนลูกผสม
แมลงวันแตง แมลงวันทอง

protein genes (IDPs), LAMP, lateral flow strip Leaf Blight of corn, , Maize mosaic disease, Meloidogyne enterolobii, Membrane protein (Imp), Molecular Biology, Neoscytalidium dimidiatum, Pepper chat fruit viroid (PCFVd), Phyllosticta citriasiana, Phytoplasma, Plant Health, Plant quarantine, Pseudomonas fuscovaginae, Ralstonia solanacearum species complex, Ralstonia syzigii, real-time PCR, Real-time PCR technique, Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, rice, root-knot nematode, RT-PCR, SCMV, SecA translocate protein (SecA), seed borne pathogen, Serology, Sheath brown rot Sugarcane mosaic virus, Sugarcane White Leaf Diseases, Tan spot, Tomato seed, Tospovirus, Translocation Gene, Watermelon silver mottle virus (WSMoV), Xanthomonas campestris pv. campestris, Zeugodacus cucurbitae, Bactrocera correcta

บทคัดย่อ

การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก อยู่ภายใต้โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ดำเนินการในช่วงปี พ.ศ. 2560 – 2564 ประกอบไปด้วย 17 การทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรเพื่อการส่งออกและ นำไปใช้ในการนำไปใช้ในการตรวจศัตรูพืชอย่างรวดเร็วเพื่อการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ผลการทดลอง สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล ได้แก่ ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปจำนวน 4 ชุด สำหรับตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ในพืชตระกูลกะหล่ำ เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย เชื้อไวรัสทริสเทซ่าในพืชตระกูลส้ม เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคชีวโมเลกุลจำนวน 9 วิธี 10 ชนิดศัตรูพืช ได้แก่ วิธีการตรวจสอบเชื้อรา *Phyllosticta citriasiana* สาเหตุโรค Tan spot ของส้มโอ ราสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* สาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรด้วยเทคนิค PCR วิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ primer ที่มาจากยีน immunodominant membrane protein genes วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) วิธีการตรวจสอบ *X. campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค real-time PCR วิธีการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification วิธีการตรวจจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค multiplex PCR วิธีการตรวจสอบแมลงวันแตง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae) และ แมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง การผลิตแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงต่อเชื้อสาเหตุโรคพืช จำนวน 5 ชนิด ได้แก่แบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* เชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* เชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* และเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งชุดตรวจสอบสำเร็จรูป วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุล และแอนติบอดีที่เฉพาะต่อศัตรูพืชที่ได้ที่พัฒนาได้สามารถนำไปปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เพื่อการป้องกันกำจัด และ ใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศ เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย ย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์

Abstracts

Development of pest and natural enemies' detection In the country for pest control and export, 17 experiments were conducted during the year 2017-2021 with the aim of developing efficient, rapid and highly accurate pest detection methods using serology and molecular biology techniques for used as a pest certification tool for agricultural exports and rapid detection of pests for pest control. The results showed that methods for detecting pests at the serology and molecular biology method could be developed. Including four serological kits for the detection of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, phytoplasma caused sugarcane white leaf disease, *Citrus Tristeza virus*, *Leek yellow stripe virus* and 9 molecular detection methods, 10 pests: *Phyllosticta citriasiana*, *Neoscytalidium* sp. and *N. dimidiatum*, Phytoplasma caused sugarcane white leaf disease, *Pepper chat fruit viroid*, *X. campestris* pv. *campestris*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. Arenaria*, and *M. enterolobii*, Fruit flies: *Zeugodacus cucurbitae* and *Bactrocera correcta*. In addition, specific antibodies were produced against five plant pathogens: *X. campestris* pv. *campestris*, *Watermelon silver mottle virus*, *Leek yellow stripe virus*, *sugarcane mosaic virus* and the phytoplasma caused sugarcane white leaf disease. The serological test kit and methods for detecting pests by molecular techniques and specific antibodies against pest were developed in this activity can be used to detect pests for speed, accuracy and efficiency for the prevention and control of quarantine pests for international trade and accepted standardized method of pest detection. The methods can detect pests in small quantities and reduce the identification period to keep up with the international trade situation. and can planing for pest prevention and elimination in a timely manner.

บทนำ

ปัจจุบันศัตรูพืชมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการค้าระหว่างประเทศเนื่องจากการนำมาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตรแทนมาตรการกีดกันด้านภาษีศุลกากร โดยมีข้อตกลงว่าด้วยการใช้มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช (Agreement on Sanitary and Phytosanitary Measures: SPS Agreement) เป็นมาตรการบังคับที่ใช้ในการจำกัดการนำเข้าสินค้าเกษตรเพื่อปกป้องและคุ้มครองชีวิตและสุขภาพของมนุษย์พืช สัตว์ภายในประเทศของตนเอง ในด้านที่เกี่ยวข้องกับความเสี่ยงในการบริโภคหรือเสี่ยงต่อโรคที่เกิดจากสิ่งมีชีวิตที่ติดมากับพืช สัตว์และผลิตภัณฑ์รวมทั้งสารเจือปนในอาหาร สารพิษหรือจุลินทรีย์ที่เป็นพาหะของโรค ทั้งนี้การกำหนดระดับความปลอดภัยและการตรวจสอบมาตรฐานสินค้านำเข้าจะต้องสอดคล้องกับมาตรฐานระหว่างประเทศและตั้งอยู่บนพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์ที่เชื่อถือได้ โดยมาตรฐานระหว่างประเทศด้านพืชที่ใช้อ้างอิงคือ อนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ (International Plant Protection Convention, IPPC) โดยมีองค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (National Plant Protection Organization, NPPO) ของแต่ละประเทศเป็นผู้ดำเนินการตามข้อกำหนดของอนุสัญญาว่าด้วยการอารักขาพืชระหว่างประเทศ มาตรการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืชได้ถูกนำมาใช้ในการค้าระหว่างประเทศ โดยประเทศคู่ค้ามักนำมาตราการสุขอนามัยและสุขอนามัยพืช มาใช้เป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้ากับสินค้าเกษตร โดยอ้างการตรวจพบเชื้อโรคพืชแมลง และอื่นๆ ซึ่งส่งผลกระทบต่อภาพลักษณ์ทางการค้าของประเทศ และการออกกฎระเบียบใหม่ใช้ศัตรูพืชกักกันมาเป็นเงื่อนไขในการนำเข้าสินค้าเกษตร ประเทศไทยมีพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2542 และพระราชบัญญัติกักพืช (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2551 ซึ่งเป็นกฎหมายที่เกี่ยวข้องกับการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร โดยมีกรมวิชาการเกษตรในฐานะ องค์การอารักขาพืชแห่งชาติ (NPPO) ของประเทศไทย ทำหน้าที่กำกับดูแลต้องทำหน้าที่ในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศไทย และยังคงทำหน้าที่ในการตรวจรับรองการปลอดศัตรูพืชของสินค้าเกษตรในการส่งออก จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ทันสมัย ทันต่อสถานการณ์ มีประสิทธิภาพในการตรวจหาศัตรูพืช และต้องเป็นที่ยอมรับของประเทศคู่ค้า ศัตรูพืชโดยเฉพาะเชื้อสาเหตุโรคพืชมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดและสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้ คือ เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส ไวรอยด์ และไฟโตพลาสมา แต่ละกลุ่มของเชื้อก็ยังจำแนกออกเป็นสายพันธุ์ของเชื้อ (races หรือ strains) แต่ละชนิดของเชื้อโรคนั้นต้องใช้เทคนิคในการตรวจหาที่มีความเฉพาะเจาะจงแตกต่างกันไป การที่จะเลือกวิธีการตรวจหาให้เหมาะสมกับชนิดของเชื้อโรคศัตรูพืชและชนิดของพืชและผลผลิตพืชนั้นๆ จึงนับเป็นปัญหาหลักในการตรวจหาเชื้อโรคศัตรูพืช เพราะถ้าหากเลือกใช้วิธีการตรวจหาที่ไม่เหมาะสมหรือไม่มีประสิทธิภาพแล้ว จะก่อให้เกิดความเสียหายต่องานการป้องกันกำจัดศัตรูพืชและงานด้านกักกันพืช โดยเฉพาะงานกักกันพืช การตรวจหาศัตรูพืชจากผลผลิตทางการเกษตรที่ส่งออกและนำเข้า หากวิธีการตรวจหาศัตรูพืชไม่มีประสิทธิภาพ ผลผลิตที่ส่งออกจากประเทศไทยอาจถูกตีกลับมาจากตรวจพบศัตรูพืชตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ทำให้เสียภาพลักษณ์ของประเทศไทย

นอกจากนี้ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีการผลิตสินค้าทางการเกษตรที่มีศักยภาพในการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศหลายชนิดแต่ปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญคือปัญหาด้านศัตรูพืช เป็นปัญหาสำคัญทำให้เกิดความเสียหายแก่ขบวนการผลิตพืช ทำให้ผลผลิตไม่มีคุณภาพหรือมีการปนเปื้อนไม่สามารถส่งออกได้จำเป็นต้องหาวิธีการที่จะป้องกันกำจัดโรคพืชที่มีประสิทธิภาพ เพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดี การป้องกันกำจัดให้ได้ผลดีต้องมีวิธีการตรวจหาศัตรูพืชอย่างรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ วิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ใช้โดยทั่วไปใช้เวลาในการตรวจนานไม่ทันต่อสถานการณ์ วิธีการตรวจหาที่รวดเร็วจะทำให้แก้ไขหรือป้องกันกำจัดได้ทันสถานการณ์ ทำให้สามารถส่งออกสินค้าเกษตรไปยังต่างประเทศได้

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ พัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยอาศัยเทคโนโลยีชีวภาพ ได้แก่ วิธีการด้านเซรัมวิทยาและชีวโมเลกุล นำมาปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ โดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น PCR และ Real time PCR และ ทางเซรัมวิทยา เช่น การผลิตแอนติบอดีของไวรัสสาเหตุโรคพืชโดยใช้ระบบเซลล์แบคทีเรีย การพัฒนาชุดตรวจสอบศัตรูพืช Immuno strip และ lateral flow test strip เพื่อใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืช ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัด และการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูงเพิ่มขึ้น เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย และพัฒนาให้รวดเร็วยิ่งขึ้น สามารถย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

ระเบียบวิธีการวิจัย (Research Methodology)

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2564)

การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคน้ำตาของคะน้า (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2562)

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลิน

1.1 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ในบีกเกอร์ กวนด้วย magnetic stirrer ชั่วๆ เติม saturated ammonium sulfate 10 มิลลิลิตร ที่ละลายขณะกวนด้วย magnetic stirrer บ่มไว้ 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 20 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.5xPBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้ว dialysis ใน 0.5x PBS นาน 4 ชั่วโมง 3 ครั้ง จากนั้นนำไปวัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย spectrophotometer ที่ OD 280 แล้วคำนวณความเข้มข้น IgG ที่แยกได้จากสูตร $O.D._{280}/1.4 = 1$ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

1.2 การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ในการทำปฏิกิริยาเชื้อ Xcc

ตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี indirect ELISA เตรียมสารแขวนลอยเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมี PBS เป็น negative control สำหรับเคลือบในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน ล้างด้วย PBST (Phosphate buffer+0.05% Tween 20) หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม blocking solution (PBS+2% skim milk) หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ เริ่มจาก 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 90 พิโคกรัม/มิลลิลิตร โดยมีอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์เข้มข้น 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับ PBS เป็น negative control นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นานครั้งละ 3 นาที เติม Goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphates ที่เจือจางใน PBST อัตราส่วน 1 : 1000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST หลุมละ 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที แล้วเจือจางสาร PNPP ใน substrate buffer อัตราส่วน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 และ 60 นาที เมื่อครบเวลาดังกล่าววัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (Optical density ; OD) ด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

1.3 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

ทดสอบคุณภาพของ IgG ในการทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc โดยวิธี DIBA บดตัวอย่างใบคะน้าที่เป็นโรค ใบเน่าดำด้วย extraction buffer ในอัตรา 1:10 (ตัวอย่างพืช : บัพเฟอร์) เตรียมน้ำคั้นใบคะน้าปกติ เช่นเดียวกัน และเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร นำน้ำคั้นพืช และเซลล์แขวนลอยเชื้อมาหยดลงบนแผ่น NCM ปริมาตร 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำแผ่น NCM ที่หยด ตัวอย่างแล้วแช่ลงในกล่องที่มี blocking solution (2% skim milk) เป็นเวลา 30 นาที หลังจากครบเวลาแล้ว ย้ายแผ่น NCM ไปแช่สารละลาย IgG ที่เจือจาง 1:500 ใน TBS เขย่านาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำแผ่น NCM มาแช่ใน GAR เจือจาง 1:10,000 ใน TBS บ่มนาน 30 นาที ล้าง 3 ครั้ง ตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย BCIP/NP หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นเมื่อสังเกตเห็นปฏิกิริยาชัดเจน

2. การพัฒนาชุดตรวจ Immuno strip

2.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG)

ใช้สารละลายอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร (Biodot, USA) OD 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวน ด้วย magnetic stirrer นาน 45 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์ Bovine Serum Albumin กวนต่ออีก 45 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บ IgG ที่ติดฉลากด้วย อนุภาคทองที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2. การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad

การติดฉลากอนุภาคทองกับ IgG ใช้สารละลายอนุภาคทอง (Colloidal gold) ขนาด 40 นาโนเมตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนด้วย magnetic stirrer นาน 45 นาที เติม 10 เปอร์เซ็นต์ Bovine Serum Albumin กวนต่ออีก 45 นาที นำไป หมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสทิ้ง ละลายตะกอนด้วย gold diluted buffer pH 7.4 ให้มีปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นเจือจางอนุภาคทองใน gold diluted buffer แบบ 2 เท่า อีก 2 ความเจือจางคือ 1:2 (0.3 เท่า) และ 1:4 (0.6 เท่า) เติมน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เก็บ IgG ที่ติด ฉลากด้วยอนุภาคทองที่ 4 องศาเซลเซียส นำไประบายลงบนแผ่น CRP ประกอบเป็นชุดตรวจสอบ เปรียบเทียบความเข้มสีบนเส้น control line

2.3. การเตรียมแผ่น conjugate release pad (CRP)

นำแผ่น CRP (วัสดุเป็น cotton linters paper) ตัดให้มีขนาด กว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร (ขึ้นกับขนาดของ Backing pad ที่เลือกใช้) ใช้ฟู่กันเบอร์ 0 จุ่ม gold conjugated IgG ป้ายลงบนแผ่น CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ Gold conjugated IgG ประมาณ 90 ไมโครลิตร/15 เซนติเมตร คิดเป็นอัตรา 5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.4. การทำเส้น test line และ control line

ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส (NCM) วัสดุที่ใช้เป็น S&S-AE 99 size 8 ไมโครโมลาร์ มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร ตามขนาดของ backing pad ใช้ดินสอดำทำเครื่องหมายด้านบนแผ่น และเครื่องหมายตำแหน่งเส้น control line ที่จะอยู่ห่างจากริมบนของแผ่น NCM 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจากเส้น control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาด 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม Anti-rabbit IgG ที่อัตราความเข้มข้น 1:3 จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ใช้ไม้บรรทัดวางให้เป็นแนวเส้นตรง และปากกาแล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวาเพียงเบาๆ เป็นเส้น control line และใช้ปากกาหมึกซึมด้ามใหม่ จุ่มซับ IgG (เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ปฏิบัติเช่นเดียวกับทำเส้น control line เป็นเส้น test line นำไปอบแห้ง 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

2.5. การประกอบเป็นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

วางแผ่นเมมเบรนที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกการรองรับ (plastic backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร วางแผ่น CRP ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร วางแผ่นใยแก้วรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) เกยทับ CRP 1-2 มิลลิเมตร และวางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (wicking paper) เกยทับด้านบนของแผ่นเมมเบรน 1-2 มิลลิเมตร ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วออกเป็นเส้นที่มีความกว้างเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร บรรจุลงในถלבพลาสติก การเก็บชุดตรวจไว้ในระยะยาวต้องเก็บในถุงออลูมิเนียมฟอยด์ ที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น

3. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

การเตรียมตัวอย่างค่น้ำสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเก็บตัวอย่างค่น้ำที่แสดงอาการเน่าดำจากแปลงปลูกของเกษตรกร และตัวอย่างค่น้ำที่แสดงอาการเน่าดำที่ได้จากการปลูกเชื้อ ล้างทำความสะอาดตัวอย่างด้วยน้ำไหลผ่าน ตัดแบ่งตัวอย่างพืชบริเวณที่แสดงอาการออกเป็น 2 ส่วน ให้มีขนาดชิ้นละ 1 กรัม นำชิ้นพืชไปบดในสารละลายบัฟเฟอร์ (DOA Extraction buffer pH 5.6) อัตราส่วน 1 กรัม/10 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมนำไปทดสอบกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป และบดชิ้นพืชในน้ำนิ่งฆ่าอัตราส่วน 1 กรัม/10 มิลลิลิตร สำหรับนำไปตรวจสอบปริมาณเชื้อ Xcc บนอาหาร PSA

3.1 การทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.1.1 การทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์

ทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปในการตรวจเชื้อ Xcc บริสุทธิ์โดยเจือจางสารละลายเชื้อแบคทีเรีย Xcc ในสารละลายบัฟเฟอร์ ครึ่งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ และน้ำนิ่งฆ่าเชื้อเป็น negative control หยดสารละลายเชื้อแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงบนชุดตรวจสอบดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับชุดตรวจเชื้อ Xcc บริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบค่น้ำปกติให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบ 10 เท่า เหมือนข้างต้นและเปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA โดย

เคลือบหลุม ELISA ด้วยเชื้อบริสุทธิ์และเชื้อบริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบคะน้าปกติ นำไปทำปฏิกิริยากับโพลีโคลอนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc อ่านค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.1.2 การทดสอบความไวในการตรวจตัวอย่างคะน้าที่เป็นโรคเน่าดำ

เตรียมตัวอย่างพืชตามวิธีการเตรียมตัวอย่างคะน้า สำหรับทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปข้างต้น เจือจาง 1:10, 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 และ 1:2000 ทดสอบน้ำคั้นพืชแต่ละความเจือจางกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยมีน้ำคั้นใบคะน้าปกติเป็น negative control แล้วตรวจผลของการเกิดปฏิกิริยา เปรียบเทียบกับวิธีการ indirect ELISA โดยเคลือบหลุม ELISA ด้วยน้ำคั้นตัวอย่างใบคะน้าตามค่าความเจือจางข้างต้น นำไปทำปฏิกิริยากับโพลีโคลอนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ Xcc อ่านค่าปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3.2 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.2.1 ทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

เตรียมเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ได้แก่ *E. carotovora* subsp. *carotovora*, *Pantoea* sp., Xcc และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบคะน้าที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์นำมาละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ ให้มีปริมาณเชื้อ 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ เป็น negative control

3.2.2 ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างคะน้า

เตรียมตัวอย่างคะน้าที่ได้จากการปลูกเชื้อ และตัวอย่างคะน้าที่เก็บจากแปลงตามวิธีการเตรียมตัวอย่างคะน้าสำหรับทดสอบชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปข้างต้น โดยมีน้ำคั้นใบคะน้าปกติเป็น negative control

เวลาและสถานที่

- เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเทรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.2 การผลิตแอนติบอดีของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ในระบบเซลล์แบคทีเรีย (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2562)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างแดงโม่จากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น ที่แสดงลักษณะอาการโรคคล้ายทอสโพอไวรัสเข้าทำลายจากเชื้อไวรัส WSMoV โดยเก็บส่วนต่าง ๆ ของพืช ใส่ถุงพลาสติกที่ถูกหุ้มด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์พร้อมเขียนหมายเลขตัวอย่าง วันที่ สถานที่เก็บจากนั้นจึงนำตัวอย่างเก็บไว้ในกระติกน้ำแข็งตลอดเวลา เพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยที่ห้องปฏิบัติการ ต่อไป

2. การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป

สกัดอาร์เอ็นเอจากส่วนต่างๆ ของแมลงที่เก็บจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPreptm Total RNA Mini kit (FAVOGEN) ดังนี้ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างพืชแต่ละส่วนที่ต้องการทดสอบประมาณ 0.1 กรัม ใส่ในโถงแล้วเติมไนโตรเจนเหลวบดให้เป็นผงละเอียด เติม FARB buffer ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติม 2B-mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายสารละลายใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นเทสารละลายลงใน Filter Column (สีขาว) ที่บรรจุอยู่ใน Collection tube แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บสารละลายส่วนใสมาเติม 70 % ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ ด้วยไมโครปิเปตต์ทีป หลังจากนั้นเทสารละลายส่วนใสลงใน FARB Mini Column (สีแดง) ที่บรรจุอยู่ใน Collection tube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ เติม Wash Buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ เติม Wash Buffer 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที (ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง) แล้วย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอด Collection tube อันใหม่ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที หลังจากนั้นย้าย FARB Mini Column (สีแดง) ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ ขนาด 1.5 ไมโครลิตร แล้วเติม Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ได้สารละลายอาร์เอ็นเอและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

3. การสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) เชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

สังเคราะห์ N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้ครอบคลุม Nucleocapsid gene (N gene/CP gene) จำนวน 1 คู่ คือ ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3 (10 pmol) (5' ATG TCT AAC GTT AAG CAG CTT 3') และไพรเมอร์ WSMoV-N-R3 (10 pmol) (5' TTA CAC TTC CAA GGA AGT GCT 3') เพื่อใช้ประกอบปฏิกิริยา One step RT-PCR (Invitrogen) ดังนี้ น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อ (dH₂O) จำนวน 18 ไมโครลิตร, 2x buffer จำนวน 25 ไมโครลิตร, MgCl₂ (25 mM) จำนวน 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3 (10 pmol) จำนวน 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ WSMoV-N-R3 (10 pmol) จำนวน 1 ไมโครลิตร, เอนไซม์ SuperScript™ III /platinum Taqmix จำนวน 2 ไมโครลิตร (0.1 unit/μl) และอาร์เอ็นเอต้นแบบจำนวน 2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 50 ไมโครลิตร ทำการสังเคราะห์ WSMoV-CP gene ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD) ตั้งรอบปฏิกิริยา ดังนี้ ขั้นที่ 1: cDNA synthesis ที่ 48°C นาน 30 นาที ขั้นที่ 2: Pre-denature 94°C นาน 1 นาที ขั้นที่ 3 : denature 94°C นาน 15 วินาที ขั้นที่ 4 : annealing 60°C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 5: Extension 68°C นาน 1 นาที (วนซ้ำขั้นที่ 3 – 5 จำนวน

30 รอบ) Post-extension 68°C นาน 10 นาที และ Hold ที่ 15°C และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder ทำการวิเคราะห์และ บันทึกภาพด้วยเครื่อง ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD

4. เพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

เลือกเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่เหมาะสมนำมาออกแบบตำแหน่งจดจำบริเวณ 5' และบริเวณ 3' ของคู่ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3 /WSMoV-N-R3 และเพิ่มตำแหน่ง stop codon (TAA) บริเวณ 3' เพื่อใช้ประกอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ WSMoV-CP adapter ด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องเพิ่ม ปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD)

5. ตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและโคลนยีนเข้า Expression vector

นำชิ้นยีน WSMoV-CP adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector ตัดด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI แบบ Double digestion ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์(FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) และโคลนยีน digested WSMoV-CP adapter โดยเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ digested pBad/HisA Expression vector (Invitrogen) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ถ้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่คอมพีเทนซ์ *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) ทำการเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่มีพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค blue white colony และตรวจสอบยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค colony PCR

6. เตรียม starter gene ทดสอบกระตุ้นแสดงออกของโปรตีนลูกผสมและวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธีSDS-PAGE

การเตรียม starter gene โดยนำโคลนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จำนวน 1 โคโลนี ที่ตรวจสอบแล้วว่าพลาสมิดสายผสมของชิ้นยีน WSMoV-CP adapte/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector (WSMoV-CP recombinant protein) เลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 20% L-Arabinose ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ระดับ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนลูกผสม และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม หลังจากนั้นวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ด้วย TGX Stain-Free FastCast Acrylamine Kit, 12 % (BIO-RAD, Cat#1610185) ด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD, Cat#1658005) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 120 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นย้อมแถบโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยสารละลาย Destaining เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดโปรตีนลูกผสมกับแถบโปรตีนมาตรฐาน

BLUltra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIX, Cat#1BHC-PM001-0500) ตรวจสอบแถบโปรตีนและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

7. การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม WSMoV-CP-adapter gene/6xHisTag (WSMoV-CP recombinant protein) เพื่อนำมาใช้เป็น starter gene ตามวิธีการข้อ 6 จากนั้นนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) 500 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนด้วยสารละลาย 20% L-Arabinose ตามความเข้มข้นที่เลือกให้เหมาะสม เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามช่วงเวลาที่เลือกให้เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนมากที่สุด ทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บตะกอนมาละลายด้วย lysis buffer A นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultraschall BANDELIN SONOPULS HD และแยกสกัดโปรตีน WSMoV-CP recombinant protein ให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (Novex, Catalog Numbers R801-01) ทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

8. ผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSMoV-CP ในสัตว์ทดลอง โดยเตรียมแอนติเจนโปรตีนลูกผสมของ WSMoV-CP recombinant protein ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ให้ผสมเข้ากันเป็น emulsion ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (immunized intramuscular) ของกระต่าย (New Zealand White rabbit) ในครั้งแรก สำหรับการฉีดครั้งต่อไปผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA) ในอัตราส่วนและปริมาตรเท่าเดิม ใช้ฉีดสัตว์ทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ รวมอีก 3 ครั้ง หลังจากฉีดสัตว์ทดลองครั้งที่ 2 ทำการเก็บเลือดโดยเจาะเส้นเลือดบริเวณใบหู และดำเนินการเก็บเลือดต่อเนื่องทุก ๆ 1 สัปดาห์อีก 5 ครั้ง

9. ทดสอบประสิทธิภาพโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตด้วยเทคนิค ELISA

บดตัวอย่างพืชเป็นโรคนใน carbonate coating buffer, pH 9.6 หยดลงในหลุมของโครเพลท (96-microwell plate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างโครเพลทด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (1X PBST) 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เจือจางโพลีโคลนอลแอนติบอดีเชื้อไวรัส WSMoV ที่ผลิตได้ใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 หยดลงในหลุมของไมโครเวลเพลท 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง เพื่อเติม Goat anti-rabbit IgG with alkaline phosphatase (AP3074, formerly Roche 1814206) ที่เจือจางใน PBS 1 : 3,000 หยดลงในหลุมของไมโครเพลท 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย

1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เตรียม 1x PNP substrate solution เติมนลงในไมโครเพลท ปริมาตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดย อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm ด้วยเครื่อง Microplate Readers (Multiskan™ GO, ThermoFisher Scientific, USA)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา	ตุลาคม 2559-กันยายน 2562
สถานที่	กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรียนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.3 การตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous and Gruyter ด้วย เทคนิค Polymerase Chain Reaction (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2562)

วิธีการ

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana*

1. สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ รา *P. citriasiana*

ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม

2. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็น โรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา พืช และฐานข้อมูลนานาชาติ (2560-2561)

2.1.1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน genus *Phyllosticta*

เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศ ไทย บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการ ของโรค ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑ์โรคพืช ดิโกอิงคศรีศึกษา กลุ่มวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร

2.1.2 แยกราให้บริสุทธิ์

แยกราโดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมาคัดเป็นชิ้น สี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียม ไฮเปอร์คลอไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่า เชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน แยกเชื้อราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.1.3 จำแนกชนิดของรา *Phyllosticta*

โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Phyllosticta* ที่ศึกษากับคู่มือการจำแนกชนิดที่เกี่ยวข้อง

2.1.4 สกัดดีเอ็นเอของรา *Phyllosticta* (DNA extraction) จากตัวอย่างราที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* และจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เจียเส้นใยของรา *Phyllosticta* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัด

ดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Dungsard และคณะ (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

2.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของ

ตำแหน่ง ITS กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่ผู้ผลิตแนะนำ

2.1.6 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ

ที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาณ 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1.7 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้ มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

3. รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Phyllosticta* จาก GenBank

รวบรวมข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Phyllosticta* ที่มีใน GenBank ทั้งหมด เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 2.1

4. การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Phyllosticta*

นำข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Phyllosticta* ทั้งหมดที่ได้จากข้อ 2.1 และ 2.2 มาจัดเรียง และบันทึกเป็นชุดข้อมูลในรูปแบบ fasta ไฟล์ โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar et al., 2008) หรือใช้โปรแกรม online จากเว็บไซต์ www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/

5. ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *P. citriasiana*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *P. citriasiana* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ ใช้โปรแกรม GPRIME

6. ทดสอบไพรเมอร์ (Primers validation)

ทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอของรา *P. citriasiana* และราใน สกุล *Phyllosticta* โดยทำตามขั้นตอน 2.1.5 – 2.1.7

การตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* ในตัวอย่างต่างๆ ของพืชตระกูลส้ม โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ *P. citriasiana*

1. การเตรียมตัวอย่างต้นแบบดีเอ็นเอ (DNA templates) จากแหล่งตัวอย่างๆ พร้อมวิธีการสกัด ดังนี้

1.1 การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture หรือ mixed cultures ของรา *Phyllosticta*

เขี่ยเส้นใยของรา *Phyllosticta* ที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Dounsangard และคณะ (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบส้มสด และตัวอย่างใบส้มร่วง

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างใบส้มสด หรือใบร่วง จากใบที่ไม่แสดงอาการของโรค มาล้างน้ำให้สะอาด นำมาฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีกครั้งหนึ่ง และนำตัวอย่างใบส้มมาแช่น้ำนิ่งฆ่าเชื้อ เก็บที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รินน้ำออกแล้วซับด้วยกระดาษซับจนแห้ง นานประมาณ 5 นาที ย้ายชิ้นตัวอย่างใบส้มลงในถุงพลาสติก บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำตัวอย่างใบส้มออกมาผึ่งที่อุณหภูมิห้อง (22-26 องศาเซลเซียส) นานประมาณ 17 ชั่วโมง ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ จากนั้นประมาณ 4 วัน ทำการตรวจหาเส้นใยของราที่เจริญออกมา และอีกประมาณ 10 วัน ตรวจหา fruiting bodies ของราจากนั้นนำตัวอย่างใบพืชที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างมากทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Dounsangard และคณะ (2015)

1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างผลส้ม

นำตัวอย่างผลส้มมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการลนไฟ ฉีอนเอาผิวผลส้มบริเวณที่แสดง

อาการจุกตรวมถึงเนื้อเยื่อรอบแผล ขนาดประมาณ 2 x 2 mm ใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard และคณะ (2015)

1.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างกิ่งและยอดอ่อนของส้ม

นำตัวอย่างกิ่งหรือยอดอ่อนของส้มมาล้างน้ำให้สะอาด จากนั้นฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ 1.5 % นาน 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำนิ่งฆ่าเชื้ออีก จากนั้นใช้ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการลนไฟ ฉีดยาอบบริเวณผิวที่แสดงอาการจุกตรวมถึงเนื้อเยื่อรอบแผล ขนาดประมาณ 1-2 mm จากนั้นหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ เขย่าด้วย TissueLyser ที่ความเร็ว 30 รอบต่อวินาที นาน 6 นาที และทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard และคณะ (2015)

1.5 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินที่เก็บบริเวณรอบรากของต้นส้ม โดยแยกเอาส่วนของเศษซากพืชหรือใบพืชออกจากตัวอย่างดิน ประมาณ 0.1 กรัมใส่ลงในหลอดสกัดดีเอ็นเอ เขย่าด้วย TissueLyser ที่ความเร็ว 20 รอบต่อวินาที นาน 5 นาที และทำการสกัดตามวิธีของ Meyer และคณะ (2012) และ Doungsa-ard และคณะ (2015)

2. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS (ITS1/ITS4) กำหนดค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase และ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่คุณผลิตแนะนำ จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทำ PCR อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ รา *P. citriasiana* ที่ออกแบบได้

3. การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยังบริษัท Macrogen Korea เพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

4. การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบกัน โดยใช้โปรแกรม Geneious version 8.1.9 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence

- การบันทึกข้อมูล

เก็บรักษาสายพันธุ์ราที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง และเก็บรักษาดีเอ็นเอต้นแบบ

ราที่แยกได้จากการเก็บตัวอย่าง เก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้ จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.4 การตรวจหา immunodominant membrane protein genes (IMPs) ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค PCR (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2561)

วิธีการ

1. การสืบค้นข้อมูล

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับ immunodominant membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย จาก GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) และจากเอกสารที่เคยได้รายงานไว้เพื่อใช้ประกอบการวิจัย

2. ออกแบบหรือสืบค้นไพรเมอร์ต่อ *imp* gene

ค้นหาข้อมูลไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานหรือออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับ *imp* gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยโดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ จาก GenBank หาความจำเพาะของไพรเมอร์ด้วย BLASTN programs (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) และคำนวณค่า Annealing Temperature (T_m °C) โดยใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties Calculator (<http://www.basis.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>)

3. ตัวอย่างพืชสำหรับใช้ทดสอบ

เก็บตัวอย่างท่อนพันธุ์อ้อยที่แสดงอาการโรคใบขาวจากแปลงปลูกในพื้นที่ จ.นครราชสีมา และ จ.ขอนแก่น ปลูกในกระถางภายในเรือนทดลองเพื่อใช้เป็นแหล่งทดสอบเชื้อต่อไป

4. แยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany) ชั่งตัวอย่างพืช ประมาณ 0.1 กรัม บดให้เป็นผงละเอียด และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำใส่หลอด microcentrifuge tube ไปแช่ที่ 65 °C นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใส่ทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใส มาเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาณ 650

ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทำการเก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ในขั้นต่อไป

5. ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ส่วนประกอบปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 25 ไมโครลิตร ได้แก่

- น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH ₂ O)	17.0	ไมโครลิตร
- 10x buffer	2.5	ไมโครลิตร
- MgCl ₂ (25 mM)	1	ไมโครลิตร
- dNTP (10 mM)	1	ไมโครลิตร
- ไพร์เมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- ไพร์เมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- platinum Taqmix (Invitogen, 0.1 unit/ μ l)	0.5	ไมโครลิตร
- ดีเอ็นเอต้นแบบ	1	ไมโครลิตร
รวม	25.0	ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR แล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โปรแกรมการทำงาน ดังนี้

ขั้นที่ 1: 94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2: 94°C	นาน 1 นาที	
ขั้นที่ 3: 52-56°C	นาน 2 นาที	
ขั้นที่ 4: 72°C	นาน 3 นาที	(ขั้นที่ 2 - 4) 34 รอบ
ขั้นที่ 5: 72°C	นาน 10 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 6: 15°C	นาน 15 นาที	1 รอบ

จากนั้นนำ DNA PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis บน 1% gel agarose with red safe dry ที่เตรียมในสารละลาย 1X TAE buffer ผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที และนำแผ่น 1% agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง ChemiDoc™ Touch Imaging System (170-8370) โดยเปรียบเทียบขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder และทำการบันทึกภาพเพื่อสรุปผลที่เกิดขึ้น

6. การโคลนยีนเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy cloning vector

โดยเตรียมชิ้นยีนเป้าหมายให้บริสุทธิ์ด้วยการแยกขนาดดีเอ็นเอบนแผ่น 0.8% agarose gel ในสารละลาย 1X TAE buffer ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอเป้าหมายใส่หลอดไมโครทิวป์ ชั่งน้ำหนักเจลไม่เกิน 300 มิลลิกรัมและนำมาสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วยชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (FAVORGEN) แล้วเชื่อมต่อชิ้นยีนเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy cloning vector (Promega, USA.) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่คอมพีเท็นเซลล์ (competent cell) แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) เลือกพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค blue white colony และตรวจยืนยันชิ้นยีนเป้าหมายด้วยเทคนิค colony PCR

7. เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank

ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา	ตุลาคม 2559-กันยายน 2561
สถานที่	กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรียนทดลอง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.5 การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (ปีเริ่มต้น 2561 - สิ้นสุด 2562)

วิธีการ

1. สักรวจและเก็บตัวอย่างกระเทียมจากแปลงปลูกของเกษตรกร

เก็บตัวอย่างกระเทียมที่มีอาการของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เพื่อเตรียมแอนติเจนทำการเก็บตัวอย่างกระเทียมที่พบลักษณะอาการใบด่าง เป็นขีด จากแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ปลูกกระเทียม เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส LYSV และทำการเตรียมต้นพืชปลอดโรคและเป็นโรค รวมทั้งปลูกพืชทดสอบเพื่อเตรียมเพิ่มปริมาณเชื้อ

2. การเตรียมแอนติเจนด้วยการสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส LYSV จากฐานข้อมูล GenBank

เพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์โปรตีน จึงได้ทำการสังเคราะห์โปรตีน LYSV coat protein gene (LYSV-CP gene) โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank : *Leek yellow stripe virus*, complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_004011.1 ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein และจากนั้นจึงสังเคราะห์โคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene, CP) ที่ได้นั้นเข้าสู่ expression vector

pET100/D-TOPO® (Invitrogen) โดยบริษัท Invitrogen หลังจากได้โคลนที่มี LYSV-CP gene แทรกอยู่ใน pET100/D-TOP expression vector แล้วจึงนำพลาสมิดนั้นมาถ่ายฝากเข้าเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ K12 DH10B™T1R ด้วยวิธี heat shock transformation (Sambrook and Russel, 1989) นำไปเลี้ยงบนอาหาร 2XYT agar ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร คัดเลือกโคโลนีเพื่อตรวจสอบหาส่วนของ LYSV-CP gene โดยวิธี PCR ก่อนนำไปสังเคราะห์โปรตีนในขั้นต่อไป

3. การชักนำการสังเคราะห์ recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรียและ แยกโปรตีนของเชื้อให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* K12 DH10B™T1R ที่มี LYSV-CP gene แทรกอยู่ใน pET 100/D-TOP expression vector ในอาหารเหลว 2XYT 100 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร เขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็น starter จากนั้นแบ่งใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 1 ลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะ ampicillin 100 มิลลิกรัม/ลิตร ในอัตราส่วนของเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหาร เขย่าต่ออีก 3 ชั่วโมง (เก็บตัวอย่างเซลล์ก่อนเติม IPTG) จากนั้นเติม Isopropyl-β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อชักนำให้เกิดการสร้างโปรตีน โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ เลี้ยงเชื้อต่อโดยการเขย่าบนเครื่อง shaker เป็นเวลา 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนจากนั้นทำการเก็บเซลล์ที่เวลาต่างๆ โดยนำมาปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ 8,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 นาที ทั้งอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสและน้ำตะกอนมาผสมกับน้ำที่ผ่านการนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (ตะกอน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร) จากนั้นเติม lysozyme เพียงเล็กน้อยประมาณเท่าหัวไม้ขีดไฟ (ต่ออาหารเหลว 1 ลิตร) และกวนให้เข้ากันจนเหนียว เก็บที่ -20°C ช้ามคืน จากนั้นนำมาเติมด้วย lysis buffer (Buffer B: 50 mM NaH₂PO₄·H₂O, 10 mM Tris-HCl (MW= 121.1) และ 8 M Urea, pH 8.0) ในอัตรา 50 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร และนำมาทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง sonicator แบบ probe (power 45-50, cycle 50%) ครั้งละ 5 นาที จนกว่าเซลล์จะหายเหนียวและใส แล้วนำไปปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บน้ำใสไปแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column (อัตรา 2 มิลลิลิตร/อาหารเหลว 1 ลิตร) เริ่มจากการล้าง column หลังแพ็คแล้ว ด้วย buffer B จากนั้นเทส่วนน้ำใสให้ผ่าน column และล้าง column ด้วย buffer C (pH 6.3) และ buffer D (pH 5.9) ก่อนที่จะใส่ buffer E (pH 3.9) เพื่อแยกโปรตีนออกจากเจลใน column เก็บเป็น fraction หลอดละ 500 ไมโครลิตร เพื่อนำไปตรวจสอบขนาดของโปรตีนว่าอยู่ใน fraction ไດ โดยเทคนิค sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

4. การผลิตแอนติซีรัมในสัตว์ทดลอง

ผสมโปรตีนของเชื้อที่บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันเป็น emulsion สำหรับการฉีดครั้งแรก และใช้ incomplete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 สำหรับการฉีดครั้งต่อไปอีก 4 ครั้ง การฉีดทุกครั้งเป็นการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณคอ ประมาณ 4-5 จุดต่อการฉีดแต่ละครั้ง ทำการฉีดทุก 2 สัปดาห์ เริ่มทำการเจาะเลือดที่เส้นเลือด

บริเวณใบหู หลังจากการฉีดครั้งที่ 2 และดำเนินการเจาะเลือดทุก 1 สัปดาห์อีก 6 ครั้ง น้ำเลือดที่เจาะได้มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปเก็บที่ 4°C อีก 24 ชั่วโมง รินส่วนน้ำใสมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8000 g นาน 10 นาที เก็บน้ำใสที่เป็นส่วนของแอนติบอดีไว้ที่ -80 °C จากนั้นทำการทดสอบและหาค่าไทเทรต (titer) ของแอนติซีรัม โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากการหยอดแอนติเจน (recombinant protein 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBS-T buffer (PBS+0.05% Tween 20) 3 ครั้ง แล้วนำมาเติมด้วย Blocking buffer (1% BSA ใน PBS-T) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างอีก 3 ครั้ง ใส่แอนติบอดีที่ได้จากการเจาะเลือดกระต่าย 7 ครั้ง โดยทำการเจือจางจาก 1:10 ถึง 1:204,800 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาหยอดด้วย Goat anti-rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย alkaline phosphatase เจือจาง 1:2,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างเพลทอีก 3 ครั้งก่อนนำมาซับสเตรท p-nitrophenyl phosphatase หลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลด้วยเครื่องอ่าน ELISA ที่ค่าความดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร

5. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

การตรวจสอบเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) โดยวิธี Indirect ELISA เริ่มจากนำ positive control ที่มีจำหน่ายจากบริษัท เคลือบหลุมของไมโครเพลท (microplate) ตามคำแนะนำของบริษัทโดยใช้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 4°C ซ้ำมคืน แล้วนำไมโครเพลทมาล้างด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (PBS-Tween 20) 3 ครั้งๆละ 3 นาที หยอดแอนติซีรัมจากการเลือดครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน conjugate buffer 1:100 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย PBS-Tween 20 จำนวน 3 ครั้งๆละ 3 นาที แล้วหยอด Goat-Anti Rabbit อัตรา 1:2,000 ใน conjugate buffer 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37°C นาน 1 ชั่วโมง นำเพลทมาล้างอีก 3 ครั้งใน PBS-Tween 20 แล้วหยอด p-nitrophenyl phosphatase substrate (5 มิลลิกรัม/ substrate buffer 10 มิลลิตร) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และอ่านผลด้วยเครื่องอ่านอิลูซา (ELISA Reader) โดยใช้เพลทชนิด polysorp microplate

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

การทดลองที่ 2.6 การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2563)

วิธีการ

1. ข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum*

สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การจัดจำแนกโดยรหัสพันธุกรรม

2. การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Neoscytalidium*

2.1.1 รวบรวมราในสกุล *Neoscytalidium* จาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.1.2 รวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราในสกุล *Neoscytalidium*

2.1.2.1 เก็บตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราในสกุล *Neoscytalidium* จากแหล่งปลูกพืชในประเทศไทย บันทึกข้อมูลรายละเอียด วันที่ พิกัด สถานที่ที่เก็บตัวอย่าง ผู้เก็บ พืชอาศัย และลักษณะอาการของโรค ตัวอย่างแห้งจะจัดเก็บในพิพิธภัณฑิโรคพืช ตึกอสังคศรีสิการ กลุ่มวิจัยโรคพืชกรมวิชาการเกษตร

2.1.2.2 แยกราให้บริสุทธิ์โดยวิธี Tissue transplant โดยนำส่วนของพืชที่เป็นโรคมานำตัดเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 0.5x0.5 มิลลิเมตร ให้คาบต่อส่วนที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค แช่ในสารละลายโซเดียมไฮโปไคลไรท์ 10 % เป็นเวลา 3-5 นาที ล้างในน้ำนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ซับให้แห้งด้วยกระดาษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนำไปวางบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มที่ อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน แยกราให้บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ เลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.1.2.3 จำแนกชนิดของรา *Neoscytalidium* โดยเปรียบเทียบลักษณะของรา *Neoscytalidium* ศึกษากับคู่มือการจำแนกชนิดที่เกี่ยวข้อง (Alcorn, 1983; Carmichael *et al.*, 1980; Ellis, 1971; 1993; Sutton, 1980)

2.1.3 นำราที่ได้จากข้อ 2.1.1 และ 2.1.2 มาทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยเขียนเส้นใยของราที่เลี้ยงบน PDA จากนั้นย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีของ Dungsard, *et al.* (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

2.1.4 Polymerase Chain Reaction (PCR) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง the Internal Transcribed Spacer (ITS) และ the translation elongation factor 1-alpha (tef1) กำหนดใช้ค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี

Polymerase Chain Reaction(PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่คุณผลิตแนะนำ

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

the Internal Transcribed Spacer

(ITS)V9G: TTACGTCCCTGCCCTTTGTA (de Hoog and Gerrits van den Ende, 1998)

ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (White et al., 1990)

the translation elongation factor 1-alpha (tef1)

EF1-728F: CATCGAGAAGTTCGAGAAGG (Carbone and Kohn, 1999)

EF-2: GGARGTACCAGTSATCATGTT (O'Donnell et al., 1998)

2.1.5 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการ ด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาตร 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer) ส่งผลิตภัณฑ์ PCR ไปยัง บริษัท Macrogen Korea เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

2.1.6 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence) มาทำการวิเคราะห์ โดยนำ forward sequence และ reverse sequence ที่ได้มาเปรียบเทียบเทียบโดยใช้โปรแกรม Geneious Prime 2020 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) จะบันทึกข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ fasta ทำการตรวจสอบความถูกต้องของชนิดของจุลินทรีย์ที่ทำการศึกษากับฐานข้อมูลทางพันธุกรรม เช่น Mycobank GenBank โดยเลือกวิธีเปรียบเทียบกับ type sequence และจำแนกชนิดโดยวิธี phylogenetic reconstruction

2.1.7 รวบรวมข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Neoscytalidium* จาก GenBank โดยรวบรวมข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Neoscytalidium* ที่มีใน GenBank ทั้งหมด เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลรหัสพันธุกรรมที่ได้จากตัวอย่างราที่แยกได้จากตัวอย่างโรคพืช และจาก Culture Collection

2.2 การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Neoscytalidium*

นำข้อมูลลำดับเบสตำแหน่ง ITS ของราใน genus *Neoscytalidium* ทั้งหมดที่ได้จากข้อ 2.1 มาจัดเรียง และบันทึกเป็นชุดข้อมูลในรูปแบบ fasta ไฟล์ โดยวิธี MUSCLE ในโปรแกรม the MEGA (Kumar *et al.*, 2018) หรือใช้โปรแกรม online จากเว็บไซต์ www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/

2.3 ออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* โดยการพิจารณาชุดข้อมูลของราใน genus *Neoscytalidium* ใช้โปรแกรม Geneious Prime และวิธีพิจารณาลำดับของไพรเมอร์ด้วยสายตา

2.4 ทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์

ทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่ออกแบบได้กับดีเอ็นเอของรา *N. dimidiatum* และราในวงศ์ *Botryosphaeria* กับฐานข้อมูลรหัสพันธุกรรม

3. การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะกับดีเอ็นเอของราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria*

3.1 การเตรียมตัวอย่างต้นแบบดีเอ็นเอ (DNA templates)

การสกัดดีเอ็นเอจาก clean culture ของรา *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria* เชื้อเส้นใยของราที่เลี้ยงบน PDA แล้วย้ายลงในหลอดสำหรับสกัดดีเอ็นเอ เติม glass beads ลงในหลอดแล้วเขย่าด้วย TissueLyser ที่ความถี่ 30 รอบต่อวินาที นาน 3 นาที และทำการสกัดดีเอ็นเอ Doungsa-ard, et al. (2015) เก็บรักษาดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 หรือ -40 องศาเซลเซียส

3.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างมาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายของตำแหน่ง ITS (ITS1/ITS4) ด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ Taq DNA Polymerase โดยใช้ cycling และ condition ของปฏิกิริยาตามที่คุณผลิตแนะนำ โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* ที่ออกแบบได้กำหนดค่า annealing temperature ที่ 62 องศาเซลเซียส ซึ่งได้จากการทดสอบ primer optimization

3.3 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR โดยตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟรีซิส (Electrophoresis) ทำการผสมผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย loading dye และ stain ในปริมาณ 4 1 และ 1 ไมโครลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันจากนั้นหยอดลงใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1% ให้ผลิตภัณฑ์ PCR เคลื่อนที่ผ่านสารละลาย Lithium Borate buffer (LB buffer)

การบันทึกข้อมูล

ตัวอย่างราจะเก็บรักษาไว้ใน Culture Collection ของกลุ่มวิจัยโรคพืชโดยเลี้ยงบนอาหาร PDA Slant ในหลอดแก้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ข้อมูลของรหัสดีเอ็นเอ (DNA barcode) จะถูกเก็บบันทึก และรายงานเพื่อใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงสำหรับการจัดทำบัญชีรายชื่อโรคพืช รวมถึงสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบในการศึกษาด้านวิวัฒนาการต่อไป และดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จะจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส ณ พิพิธภัณฑ์โรคพืช กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

เวลาและสถานที่

ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.7 การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2562)

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับไวรอยด์ที่เข้าทำลายมะเขือเทศ และวิธีการตรวจวินิจฉัย *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) จากนั้น นำลำดับเบสมาสังเคราะห์ชุดไพรเมอร์ เพื่อใช้สำหรับการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

2. ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA) จากเมล็ด (seed)

2.1 การเตรียมเมล็ดมะเขือเทศ

เตรียมเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (สายพันธุ์ Rutgers) จำนวน 3,000 เมล็ด (sample size) โดยแบ่งเป็นตัวอย่างย่อย (sub sample) ตัวอย่างละ 1,000 เมล็ด (ISF, 2015; ISPM 27, 2015) และตัวอย่างย่อยละ 250 เมล็ด จำนวน 3 ตัวอย่าง จากนั้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเมล็ดพันธุ์ (Tube Mill Control, IKA®) และเติมสารละลาย General Extraction Buffer (GEB) ที่อัตราส่วน 1:5 (w/v) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยเมล็ดจำนวน 8 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 คือ tomato leave (negative control) ในสารละลาย GEB ที่อัตราส่วน 1:2 (w/v)

กรรมวิธีที่ 2 คือ seed sap (250 เมล็ด)

กรรมวิธีที่ 3 คือ seed sap (250 เมล็ด) ผสมกับ PCFVd sap ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

กรรมวิธีที่ 4 คือ seed sap (250 เมล็ด) ผสมกับ PCFVd sap ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

กรรมวิธีที่ 5 คือ seed sap (1,000 เมล็ด)

กรรมวิธีที่ 6 คือ seed sap (1,000 เมล็ด) ผสมกับ PCFVd sap ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

กรรมวิธีที่ 7 คือ seed sap (1,000 เมล็ด) ผสมกับ PCFVd sap ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

กรรมวิธีที่ 8 คือ PCFVd-tomato leave (positive control) ในสารละลาย GEB อัตราส่วน 1:2 (w/v)

หมายเหตุ : seed sap คือ สารแขวนลอยเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในสารละลาย GEB

PCFVd sap คือ น้ำคั้นใบมะเขือเทศที่มีเชื้อ PCFVd ในสารละลาย GEB ที่อัตราส่วน 1:2 (w/v)

หลังจากนั้น นำสารแขวนลอยเมล็ดทั้ง 6 กรรมวิธี ไปดำเนินการสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการต่าง ๆ

2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการต่าง ๆ จำนวน 4 วิธี ดังต่อไปนี้

2.2.1 สกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการของ Scottish Agricultural Science Agency (Jeffries and Tina, 2004)

2.2.1.1 นำสารแขวนลอยเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศผสมร่วมกับสารละลาย CTAB (2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 1% Na₂SO₃ และ 2% PVP-40 โดยที่ Na₂SO₃ และ PVP-40 เติวก่อนใช้งานเท่านั้น) ที่อัตราส่วน 1:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน (vortex mix)

2.2.1.2 นำไปปั่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

2.2.1.3 ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ เติมน้ำละลาย Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2.2.1.4 ดูดของเหลวส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ เติมน้ำละลาย Chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที

2.2.1.5 ดูดของเหลวส่วนบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ แล้วเติมน้ำละลาย 5M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และเติม Isopropanol (เย็น) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ -20°C นานข้ามคืน หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2.2.1.6 เก็บส่วนของตะกอน นำมาละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE (10mM Tris-HCl pH 8.0 และ 1mM EDTA pH 8.0) จากนั้นเติมน้ำ 1% SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และเติมน้ำ 5M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ Isopropanol (เย็น) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเบา ๆ โดยการกลับหลอดแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

2.2.1.7 ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งของเหลว และตากตะกอนให้แห้ง

2.2.1.8 ละลายตะกอนด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ไม่มี nuclease ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้คือ สารละลายอาร์เอ็นเอ (total RNA) นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C องศาเซลเซียส เพื่อนำไปดำเนินการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

2.2.2 สกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการของ Boonham (Boonham *et al.*, 2002)

2.2.2.1 นำสารแขวนลอยเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศผสมร่วมกับสารละลาย CTAB (2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 1% Na_2SO_3 และ 2% PVP-40 โดยที่ Na_2SO_3 และ PVP-40 เติวก่อนใช้งานเท่านั้น) ที่อัตราส่วน 1:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน (vortex mix)

2.2.2.2 นำไปปั่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมน้ำละลาย Chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

2.2.2.3 เก็บของเหลวส่วนบน ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และเติมน้ำ 4M LiCl ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20°C นานข้ามคืน

2.2.2.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 นาที เก็บของเหลวปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติม 5M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเติม Isopropanol (เย็น) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่ -20 °C เป็นเวลา 30 นาที

2.2.2.5 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนของตะกอนและล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งของเหลวและตากตะกอนให้แห้ง

2.2.2.6 ละลายตะกอนด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ไม่มี nuclease ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้คือ สารละลายอาร์เอ็นเอ (total RNA) นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปดำเนินการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

2.2.3 สกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN)

2.2.3.1 นำสารแขวนลอยเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศผสมร่วมกับสารละลาย FARB buffer ที่อัตราส่วน 1:1 (v/v) ผสมให้เข้ากัน (vortex mix)

2.2.3.2 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่ลงใน Filter Column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 1 นาที

2.2.3.3 ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์ใหม่ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติม 70% ethanol (เย็น) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน (vortex mix)

2.2.3.4 เทของเหลวใส่ลงใน FARB Mini Column ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลว

2.2.3.5 เติม Wash Buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลว

2.2.3.6 เติม Wash Buffer 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลว

2.2.3.7 เติม Wash Buffer 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลว

2.2.3.8 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ย้าย spin column ใส่ลงในหลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ จากนั้นเติม RNase-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยอดลงไปบริเวณกึ่งกลางเมมเบรน (membrane) ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที

2.2.3.9 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ของเหลวที่ได้คือ สารละลายอาร์เอ็นเอ (total RNA) ของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปดำเนินการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

2.2.4 การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

2.2.4.1 นำสารแขวนลอยเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศผสมร่วมกับบัฟเฟอร์ RLT (ซึ่งเติมสาร 2-mercaptoethanol แล้วก่อนใช้งาน) ด้วยปริมาตร 1:1 (V/V) แล้วใส่ลงใน QIA shredder mini spin column ปริมาตร 700 ไมโครลิตร

2.2.4.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเก็บของเหลว ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ แล้วเติมสารละลาย absolute ethanol ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอด 4-5 ครั้ง

2.2.4.3 ดูดของเหลวทั้งหมดใส่ลงใน RNeasy mini spin column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลว

2.2.4.4 เติมบัฟเฟอร์ RW1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลว

2.2.4.5 เติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลว

2.2.4.6 เติมบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้งของเหลว

2.2.4.7 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ย้าย spin column ใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ จากนั้นเติม RNase-free water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยอดลงไปบริเวณกึ่งกลางเมมเบรน (membrane) ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

2.2.4.8 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ของเหลวที่ได้คือ สารละลายอาร์เอ็นเอ (total RNA) ของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปดำเนินการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

3. นำสารละลายอาร์เอ็นเอ (total RNA) ของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สกัดได้ในแต่ละวิธีการ มาตรวจหาเชื้อไวรัส PCFVd ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยเตรียมสารองค์ประกอบดังต่อไปนี้

3.1 สารองค์ประกอบในการดำเนินปฏิกิริยาที่ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร ดังนี้

น้ำ (RNase-free water)	ปริมาตร	7.5	ไมโครลิตร
สารละลาย 2X reaction mix buffer	ปริมาตร	12.5	ไมโครลิตร
สารละลาย 10 μ M forward primer	ปริมาตร	1	ไมโครลิตร
สารละลาย 10 μ M reverse primer	ปริมาตร	1	ไมโครลิตร
เอนไซม์ SuperScriptIII/PlatinumTaq	ปริมาตร	1	ไมโครลิตร
สารละลาย total RNA	ปริมาตร	2	ไมโครลิตร

3.2 เมื่อเตรียมสารองค์ประกอบเรียบร้อยแล้ว นำไปเพิ่มปริมาณขึ้นยืนเป้าหมายโดยกำหนดโปรแกรมการทำงานดังนี้

3.2.1 โปรแกรมสำหรับคูไพโรเมอร์ NAD ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 cDNA synthesis	ที่อุณหภูมิ	45 °C	เป็นเวลา 30 นาที
ขั้นตอนที่ 2 pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	เป็นเวลา 5 นาที
ขั้นตอนที่ 3 denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 annealing*	ที่อุณหภูมิ	56 °C	เป็นเวลา 60 วินาที
ขั้นตอนที่ 5 extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	เป็นเวลา 60 วินาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 ถึงขั้นตอนที่ 5 เป็นจำนวน 40 รอบ			
ขั้นตอนที่ 6 post-extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	เป็นเวลา 5 นาที

3.2.2 โปรแกรมสำหรับคูไพโรเมอร์ Posp1 ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 cDNA synthesis	ที่อุณหภูมิ	48 °C	เป็นเวลา 45 นาที
ขั้นตอนที่ 2 pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	เป็นเวลา 2 นาที
ขั้นตอนที่ 3 denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 annealing	ที่อุณหภูมิ	62 °C	เป็นเวลา 90 วินาที
ขั้นตอนที่ 5 extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	เป็นเวลา 45 วินาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 ถึงขั้นตอนที่ 5 เป็นจำนวน 15 รอบ			
ขั้นตอนที่ 6 denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 7 annealing	ที่อุณหภูมิ	59 °C	เป็นเวลา 90 วินาที
ขั้นตอนที่ 8 extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	เป็นเวลา 45 วินาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 6 ถึงขั้นตอนที่ 8 เป็นจำนวน 30 รอบ			
ขั้นตอนที่ 9 post-extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	เป็นเวลา 7 นาที

3.2.3 โปรแกรมสำหรับคูไพโรเมอร์ PC2 ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 cDNA synthesis	ที่อุณหภูมิ	48 °C	เป็นเวลา 45 นาที
ขั้นตอนที่ 2 pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 3 denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 annealing	ที่อุณหภูมิ	56 °C	เป็นเวลา 45 วินาที
ขั้นตอนที่ 5 extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	เป็นเวลา 60 วินาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 ถึงขั้นตอนที่ 5 เป็นจำนวน 35 รอบ			
ขั้นตอนที่ 6 post-extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	เป็นเวลา 5 นาที

3.2.4 โปรแกรมสำหรับคูไพโรเมอร์ PCFVd ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 cDNA synthesis	ที่อุณหภูมิ	45 °C	เป็นเวลา 45 นาที
ขั้นตอนที่ 2 pre-denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 3 denaturation	ที่อุณหภูมิ	94 °C	เป็นเวลา 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 4 annealing	ที่อุณหภูมิ	58 °C	เป็นเวลา 45 วินาที
ขั้นตอนที่ 5 extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	เป็นเวลา 60 วินาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 ถึงขั้นตอนที่ 5 เป็นจำนวน 35 รอบ			
ขั้นตอนที่ 6 post-extension	ที่อุณหภูมิ	68 °C	เป็นเวลา 5 นาที

3.3 เมื่อสิ้นสุดการดำเนินปฏิกิริยา นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ (PCR product) มาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ดังนี้

3.3.1 เตรียม 1.5% อะกาโรสเจล โดยชั่งผงอะกาโรส 1.5 กรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 0.5X TBE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยการให้ความร้อน จากนั้นผสมสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ลงในสารละลายเจลก่อนการเทเจล

3.3.2 นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ 6X loading dye ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ใส่ลงในเจลที่เตรียมไว้และใช้ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder เป็นตัวเทียบในเจลด้วย จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

3.3.3 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation บันทึกภาพแล้วนำไปวิเคราะห์ผล และส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.3.4 นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูลของ GenBank

4. ทดสอบประสิทธิภาพของเทคนิค โดยการสุ่มเมล็ดมะเขือเทศตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association, 2017) นำไปสกัดอาร์เอ็นเอ และทำการตรวจสอบด้วยวิธีการ RT-PCR แล้วตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกภาพถ่ายเจลของผลการตรวจหาเชื้อไวรัส PCFVd โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT-PCR แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และดูผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documentation

2. บันทึกผลการตรวจพบเชื้อไวรัส PCFVd จากการวิเคราะห์ภาพถ่ายเจล

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2562 (2 ปี)

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.8 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบโรคใบต่างลายของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus (SCMV)* (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2562)

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวโพดที่เป็นโรค (ปี 2561)

เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่มีลักษณะอาการใบต่างประหรือต่างขีดเล็ก ๆ จากแหล่งปลูกข้าวโพด ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา นครปฐม กาญจนบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และลพบุรี โดยการสำรวจในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก ในกรณีในพื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจแถวเว้นแถว พร้อมทั้งถ่ายภาพในแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบในข้าวโพดและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2. การตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ในตัวอย่างข้าวโพดเทคนิค Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA

ตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ในตัวอย่างข้าวโพดเทคนิคด้วยวิธี DAS-ELISA โดยใช้ Anti-SCMV ที่มีจำหน่ายทางการค้าของบริษัท Agdia Inc. (USA) ตามวิธีการและคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้ เคลือบ capture antibody ลงในหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บดใบพืชหนัก 0.1 กรัม บดให้ละเอียดใน carbonate coating buffer (0.05 M sodium carbonate , pH 9.6 ที่เติม 0.2% sodium diethyl dithiocarbamate ก่อนใช้) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตู้น้ำคั้นพืชใส่ในหลุม ELISA plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วเติม enzyme conjugate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง และเติม substrate solution (10% diethanolamine, pH 9.8 ที่มี *p*-nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ด้วยเครื่อง Thermo Scientific Multiskan GO ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

3. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบข้าวโพด

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืชด้วยชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Mini Kit ตามคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

3.1 ชั่งใบข้าวโพดปริมาณ 100 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมบัฟเฟอร์ FARB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเติม β -ME ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

3.2 ย้ายส่วนของพืชใน ข้อ 1 มาใส่ Filter Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วเติม 70% Ethanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.3 ย้ายส่วนของเหลวใน ข้อ 2 มาใส่ใน FARB Mini Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที ทิ้งส่วนใส

3.4 เติม Wash Buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลวใส แล้วล้างด้วย Wash Buffer 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที

3.5 นำ FARB Mini Column มาวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บ RNA ที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

4. โพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณยีนห่อหุ้มอนุภาค (Coat protein: CP) ของเชื้อไวรัส SCMV

โพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน CP ของไวรัส ได้ใช้โพรเมอร์ที่รายงานโดย Gemechu *et al.* (2006) ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 942-966 คู่เบส

Forward primer SCP1 5'-CGGAAATTTTATGCGTGGCTTC-3'

Reverse primer SCP2 5'-CTAGTGGTGCTGCTGCACTC-3'

สังเคราะห์ยีน CP ของเชื้อไวรัส SCMV จากอาร์เอ็นเอรวมที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสมของ one step RT-PCR (QIAGEN) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย

nuclease free water	11	ไมโครลิตร
5x buffer	4	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
10 pmole SCP1	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole SCP2	0.5	ไมโครลิตร
enzyme mix	1	ไมโครลิตร
RNA template	2	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) First strand synthesis	50 °C	30 นาที
Pre-denaturation	94 °C	15 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	94 °C	30 วินาที
Annealing	58 °C	30 วินาที
Extension	72 °C	60 วินาที
3) Final extension	72 °C	10 นาที

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม RedSafe Nucleic Acid Straining Solution (iNtRON Biotechnology, South Korea) ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System นำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730XL DNA Analyzer (SolGent, South Korea)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ SCMV ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 10

6. การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส SCMV

การแยกเชื้อโดยนำตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ผลการตรวจทางซีรัมวิทยาเป็นบวก มาปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกลองบนข้าวฟ่างพันธุ์ UT432B ที่มีอายุ 14 วันหลังงอก โดยบดใบข้าวโพดในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 M potassium phosphate buffer, pH 7.2 ในอัตราส่วน 1 : 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในโถงที่นึ่งฆ่าเชื้อและแช่เย็น เติมน้ำคาร์บอนดำในน้ำคั้น ผสมให้เข้ากัน แล้วทาน้ำคั้นที่ได้ลงบนใบพืชให้ทั่วทั้งใบทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจึงล้างใบข้าวฟ่างด้วยน้ำ เมื่อพืชแสดงอาการหรือหลังทำการปลูกเชื้อ 7 วัน ตรวจ ยืนยันผลด้วยวิธี DAS ELISA และเก็บเชื้อไว้ในข้าวฟ่างในสภาพโรงเรือนกันแมลงเพื่อไว้ใช้ทดลองต่อไป

7. การเตรียมไวรัส SCMV บริสุทธิ์

ตัดใบข้าวฟ่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร น้ำหนัก 150 กรัม แช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 คืน นามาบดในเครื่องบด Blender โดยเติม 0.5 M sodium citrate buffer pH 8.0 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่ผสม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าขาวบางกำจัดเศษพืชเอาแต่ส่วนน้ำคั้น ปริมาตรประมาณ 300 มิลลิลิตร เติมน้ำคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 150 มิลลิลิตร กวนบนน้ำแข็ง นาน 45 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บน้ำใสปริมาตร 300 มิลลิลิตร ใส่ปีกเกอร์ แล้วเติม polyethylene glycol 6000 อัตรา 5% และ triton X-100 อัตรา 1% ของปริมาตรของเหลว กวนบนน้ำแข็ง นาน 1.30 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.5 M Potassium phosphate buffer pH 7.5 ที่เติม 0.5 M Urea ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บของเหลวที่มีไวรัส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 40,000 rpm นาน 1.30 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.05M Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

8. การผลิตและตรวจสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SCMV

นำสารแขวนลอยไวรัสคอนข้างบริสุทธิ์ ได้แก่ ไอโซเลต NSW (SCMV-NSW) ฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างภูมิคุ้มกันโดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white อายุประมาณ 3 เดือน ก่อนการกระตุ้น เก็บ normal serum โดยเข็ดหลังใบหูด้วย 70% ethanol และ เจาะเลือดปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อใช้เปรียบเทียบปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป เตรียมแอนติเจนเพื่อฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยไวรัสบริสุทธิ์ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ใน Complete Freund's Adjuvant (CFA) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันจนเป็น emulsion ฉีดกระตุ้นด้วยวิธี subcutaneous injection (SC) บริเวณต้นคอด้านหลัง เว้นระยะห่างหนึ่งสัปดาห์จึงกระตุ้นภูมิซ้ำ เตรียมแอนติเจนเพื่อฉีดครั้งที่ 2 ผสมไวรัสบริสุทธิ์ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ใน Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) จากนั้น 1 สัปดาห์ เจาะเลือดใส่บีกเกอร์ปลอดเชื้อเพื่อเก็บแอนติซีรัมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ นาน 4 สัปดาห์ แต่ละครั้งจะแยกแอนติซีรัมจากเม็ดเลือดโดยวางเลือดในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเก็บแอนติซีรัมซึ่งเป็นส่วนใสด้านบนในขวดซีรัมโดยเติม NaN_3 ความเข้มข้น สุดท้าย 0.02% โดยปริมาตร เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรีย เก็บแอนติซีรัมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. การตรวจสอบค่าไตเตอร์และความจำเพาะของแอนติซีรัมในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV

ตรวจสอบค่าไตเตอร์ (titer) ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ SCMV ด้วยวิธี PTA-ELISA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Clark and Adam (1977) เพื่อหาค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติซีรัมที่ยังคงให้ผลบวก (มากกว่า 2 เท่าของค่า A_{405} ของพีชปกติ) โดยใช้แอนติซีรัมแต่ละครั้งที่เก็บได้ทำปฏิกิริยากับไวรัสบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน carbonate coating buffer, pH 9.6 เป็นแอนติเจนสำหรับหยดลงในหลุม ELISA plate โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมแต่ละครั้งที่เก็บได้แบบ 2-fold dilutions เริ่มจากความเข้มข้น 1:200 ถึง 1:819,200 เพื่อใช้เป็น primary antibody และ Goat anti rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (GAR) เป็น secondary antibody เปรียบเทียบกับ normal serum

ทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ค่าความเจือจางที่เหมาะสมด้วยวิธี Indirect ELISA โดยพีชเป็นโรคที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV และเชื้อไวรัสสกุล *Potyvirus* อื่น ๆ ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect PTA-ELISA

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562

- สถานที่ทำการทดลอง
1. แปลงข้าวโพดในจังหวัดนครราชสีมา นครปฐม กาญจนบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และลพบุรี
 2. ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.9 พัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) จากแอนติบอดีของโปรตีนลูกผสม SecA ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย(ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2563)

วิธีการ

1. การผลิตแอนติบอดีจากโปรตีนลูกผสมของยีน SecA (partial SecA recombinant protein)

ทำการผลิตโพลีโคลอนแอนติบอดีจากโปรตีนลูกผสมของ partial SecA recombinant protein สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ในสัตว์ทดลองกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White Rabbit) อายุประมาณ 3 เดือน ทำการเก็บซีรัมปกติ (Normal serum, Ns) หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยสารละลายโปรตีนลูกผสมของ partial SecA recombinant protein ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันจนเป็นสารแขวนลอย (emulsion) แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลัง (intramuscular injection, IM) หลังจากนั้นทำการฉีดกระตุ้น อีก 2 ครั้ง ทุกสัปดาห์ โดยผสมสารละลาย partial SecA recombinant protein กับ Freund's incomplete adjuvant อัตรา 1:1 ส่วน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดใบหูหลังฉีดแล้ว 20 วัน แล้วนำมาแยกเก็บแอนติซีรัม (Nurhadi *et al.*, 2003; รัชนี้, 2558)

2. การผลิตชุดตรวจสอบ Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

2.1 การสกัด Immunoglobulin G (IgG) ของ SecA-IgG ให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ((NH₄)₂SO₄) นำแอนติซีรัมปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g นาน 5 นาที เพื่อขจัดตะกอนโปรตีนอื่นๆที่อาจปะปนอยู่ในซีรัม ทำการละลายตะกอน (pellet) ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (dH₂O) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆ เติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ที่ละลายจนพบตะกอนสีขาวขุ่นเกิดขึ้นและเติมให้ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร กวนสารละลายด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน SecA-IgG ที่ความเร็ว 10,000g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย ½ Phosphate buffer saline, pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นทำการไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ ½ Phosphate buffer saline pH 7.4 ภายใต้อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง μ Drop™ Plate (Thermo scientific, USA) เพื่อหาความเข้มข้นของ crude SecA-IgG ที่สกัดได้ในแต่ละครั้ง (สุรภิ และคณะ, 2551; Ching, 2015)

2.2 การเชื่อมต่อ SecA-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold, Denovation, USA) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายอนุภาคทองปริมาตร 1 มิลลิลิตรปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.0 – 8.0 และเติม SecA-IgG ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุภาคทองไม่เกิดการตกตะกอนแล้วผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยการกวนเบา ๆ ด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1% Bovine serum Albumin (1% BSA) แล้วทำการกวนสารละลายต่ออีก 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000g นาน 30 นาที จากนั้นละลายตะกอน Gold conjugated SecA-IgG ด้วย 20 mM Tris, pH 8.0 ที่มีส่วนผสม 1%BSA

แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000g นาน 30 นาที และละลายตะกอนด้วย 20 mM Tris, pH 8.0 ที่มี ส่วนผสม 0.25% BSA, 0.02% Sucrose ปริมาตร 100 ไมโครลิตร (Ching, 2015)

3 การประกอบชุดตรวจสอบ (Strip Test)

3.1 การเตรียมแผ่น Conjugated Release Pad (CRP) ตัดแผ่นเมมเบรน conjugated release pad ให้มีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับแผ่นพลาสติก backing pad ที่เลือกใช้งาน ใช้ สารละลาย Gold conjugated SecA-IgG ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ระบายลงบนแผ่น CRP ด้วยพู่กัน เบอร์ 1 (Fig 1) นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (force air drying oven) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่แห้ง

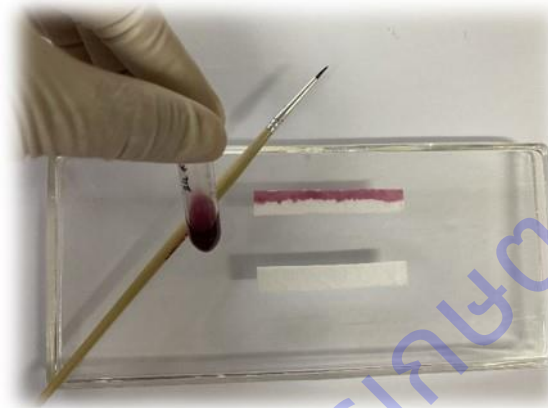


Fig 1 SecA-IgG labelling with colloidal gold was applied into conjugated release pad

3.2 การทำเส้น test line และ control line โดยตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane, NCM) ให้มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับแผ่นพลาสติก backing pad ที่เลือกใช้งาน โดยเป็นตำแหน่งเส้นควบคุม (control line, C) ที่อยู่ห่างจากริมด้านบนของแผ่น NCM ประมาณ 1 เซนติเมตร และ เส้นตรวจ (test line, T) อยู่ถัดลงมาจากริมด้านบนของแผ่น NCM ประมาณ 0.5 เซนติเมตร โดยใช้ส่วนปลายปากกาจุ่มลงในสารละลายแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่าย (GAR-IgG, Merk, USA) โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ลากเป็นแนวเส้นตรงด้วยไม้บรรทัด สำหรับเส้นตรวจ (test line, T) ปฏิบัติเช่นเดียวกัน แต่ใช้สารละลาย SecA-IgG แทน ที่ความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (force air drying oven) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บไว้ในที่แห้ง

3.3 การประกอบชุดตรวจ (Strip Test) วางแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose (NCM) ลงบนแผ่นพลาสติก Backing card แล้ววางแผ่นเมมเบรน Conjugated release pad ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ประมาณ 2 มิลลิเมตร ต่อมาวางแผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (Sample application pad , SAP) ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Conjugated release pad (CRP) ประมาณ 2 มิลลิเมตร และวางแผ่น Absorbent pad (AP) ทางด้านปลายของชุดตรวจโดยให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ประมาณ 2

มิลลิเมตร (Fig 2) (Ching, 2015) บรรจุชุดตรวจลงตลับ และทดสอบคุณภาพของชุดตรวจสอบที่ผลิตขึ้นใน ครั้งนี้ด้วยน้ำคั้นจากตัวอย่างอ้อยเป็นโรคใบขาวอ้อย (Fig 3)

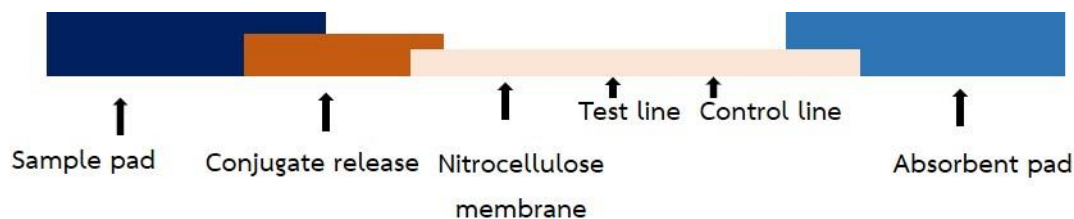


Fig 2. Schematic of a lateral flow immunoassay (Strip Test)

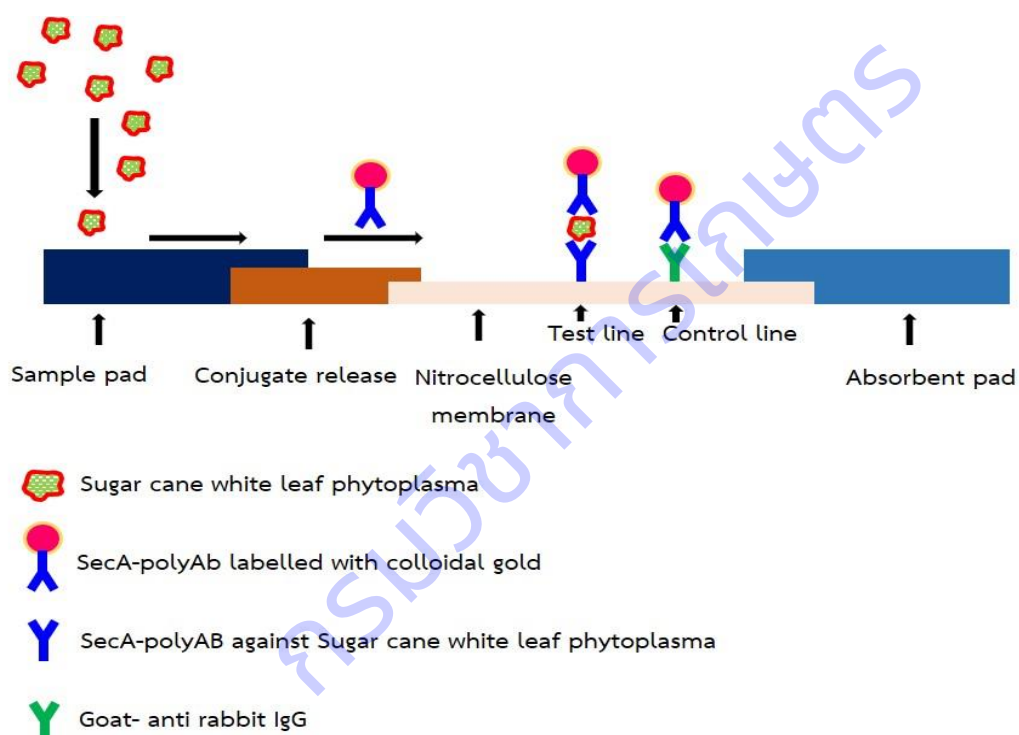


Fig 3 LFIA format, sample applied on sample pad and a labelled detector antibody flows through nitrocellulose membrane with immobilized antibody on test line and control line.

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือน ตุลาคม 2561 สิ้นสุดเดือน ตุลาคม 2563

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

การทดลองที่ 2.10 การพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซาของพืชตระกูลส้ม (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2563)

วิธีการ

1. การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CTV ในสัตว์ทดลอง (as-CTV)

ทำการเก็บซีรัมปกติ (Normal serum, Ns) จากกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White Rabbit) อายุประมาณ 5 เดือน เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมก่อนการฉีดแอนติเจน หลังจากนั้น 1 สัปดาห์ ฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยสารละลายโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV ซึ่งใช้เป็นแอนติเจน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวนรวม 3 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์ โดยผสมแอนติเจนกับ complete Freund's adjuvant ในอัตรา 1:1 ให้เข้ากันจนเป็นสารแขวนลอย (emulsion) แล้วฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลัง (intramuscular injection, IM) ปริมาตร 1 มล หลังจากนั้นทำการฉีดกระตุ้น อีก 2 ครั้ง ทุกสัปดาห์ โดยผสมสารละลายโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CTV กับ Freund's incomplete adjuvant อัตรา 1:1 ส่วน ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และเจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดใบหู 14 วัน เพื่อแยกเก็บซีรัมหลังจากฉีดแอนติเจนครั้งสุดท้าย 20 วัน (Nurhadi *et al.*, 2003; รัชนี้, 2558)

2. การผลิตชุดตรวจสอบ Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

2.1 การสกัด Immunoglobulin G (IgG) ของเชื้อไวรัส CTV

ใช้ as-CTV ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g นาน 5 นาที เพื่อขจัดตะกอนโปรตีนที่อาจปะปนอยู่ในซีรัมแล้วละลายตะกอน (pellet) ด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ (dH₂O) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) ลงไปให้สารละลายมีปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร จนมีตะกอนสีขาวขุ่นเกิดขึ้น แล้วนำสารละลายไปกวนด้วยเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้สารละลายเข้ากันดีแล้วนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน CTV-IgG ที่ความเร็ว 10,000g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วย ½ Phosphate buffer saline pH 7.4 ปริมาตร 300 – 500 ไมโครลิตร (0.3 – 0.5 เท่าของปริมาตรแอนติซีรัมที่ใช้เริ่มต้น) จากนั้นนำสารละลายไปกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH₄)₂SO₄) ด้วยวิธีการไดอะไลซิส (dialysis) โดยใช้ ½ Phosphate buffer saline pH 7.4 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ภายใต้อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน และทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ (½ Phosphate buffer saline pH 7.4) จำนวน 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ (CTV-IgG) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง μ Drop™ Plate (Thermo scientific, USA) เพื่อหาความเข้มข้นของ crude CTV-IgG ที่สกัดได้ในแต่ละครั้ง (สุรภิ และคณะ, 2551; Ching, 2015)

2.2 การเชื่อมต่อ CTV-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold)

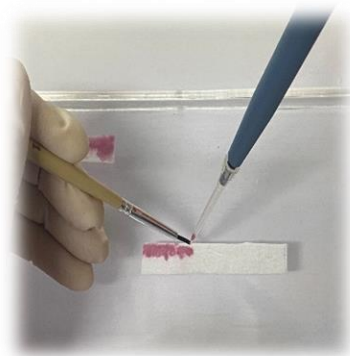
ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายอนุภาคทอง colloidal gold (Denovation, USA) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชด้วย 0.2M K₂CO₃ ให้ค่าเอชอยู่ในช่วง 7.0 – 8.0 โดยใช้กระดาษลิตมัส (PH Test Strip) จากนั้นเตรียม

สารละลาย IgG ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 5 – 50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร โดยใช้ปิเปตดูดสารละลาย IgG แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในสารละลายอนุภาคทองที่ได้ปรับค่าพีเอชเรียบร้อยแล้ว นำสารละลายไปกวนด้วยเครื่องกวนสาร (magnetic stirrer) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบเวลาทำการเติมสารละลาย 10% NaCl ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลอง และเลือกหลอดทดลองที่ใช้ความเข้มข้น IgG ต่ำสุด ที่สารละลายอนุภาคทองยังคงมีสีออกชมพู (pinkish) และไม่มีการตกตะกอนของอนุภาคทอง จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 523 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Thermal Scientific Go, Finland) ทำการเชื่อม asCTV-IgG กับอนุภาคทอง โดยใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายอนุภาคทองปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากขวดสต็อก ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 7.0 – 8.0 และเติม asCTV-IgG ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่อนุภาคทองไม่เกิดการตกตะกอนแล้วผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยการกวนเบา ๆ ด้วยเครื่อง magnetic stirrer นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1% Bovine serum Albumin (1% BSA) แล้วทำการกวนสารละลายต่ออีก 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายใส่ลงในไมโครทิวป์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000g นาน 30 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วย 20 mM Tris, pH 8.0 ที่มีส่วนผสม 1%BSA แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000g นาน 30 นาที ทำซ้ำจำนวน 2 รอบ จากนั้นละลายตะกอนด้วย 20 mM Tris, pH 8.0 ที่มีส่วนผสม 0.25% BSA, 2% Nuclease ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งจะได้สารละลายอนุภาคทองที่มี acCTV-IgG เชื่อมติดอยู่ สำหรับใช้ในขั้นตอนการทำชุดตรวจในขั้นตอนถัดไป (Ching, 2015)

3 การผลิตชุดตรวจแบบ Strip Test

3.1 การเตรียมแผ่น Conjugated Release Pad (CRP)

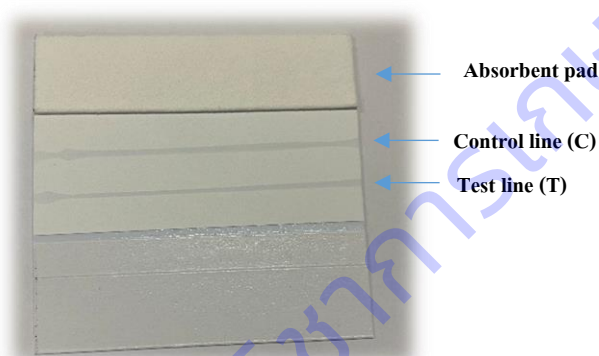
ตัดแผ่นเมมเบรน conjugated release pad 3 ชนิด Standard 14, Standard 17, และ Fusion5 (Cytiva, USA) ให้มีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับแผ่นพลาสติก backing pad ที่เลือกใช้ งาน ใช้พู่กันระบายสารละลายอนุภาคทองที่เชื่อมกับ asCTV-IgG (colloidal gold conjugated-asCTV-IgG) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/เซนติเมตร (ภาพที่ 1) หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (force air drying oven) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่บรรจุสารดูดซับความชื้น (silica gel) (Ching, 2015) เพื่อกันความชื้นในระหว่างรอประกอบชุดตรวจ (strip test)



ภาพที่ 1 ระบายสารละลาย asCTV-IgG-Gold conjugated บนเมมเบรน conjugated release pad

3.2 การทดสอบชนิดแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสสำหรับชุดตรวจ

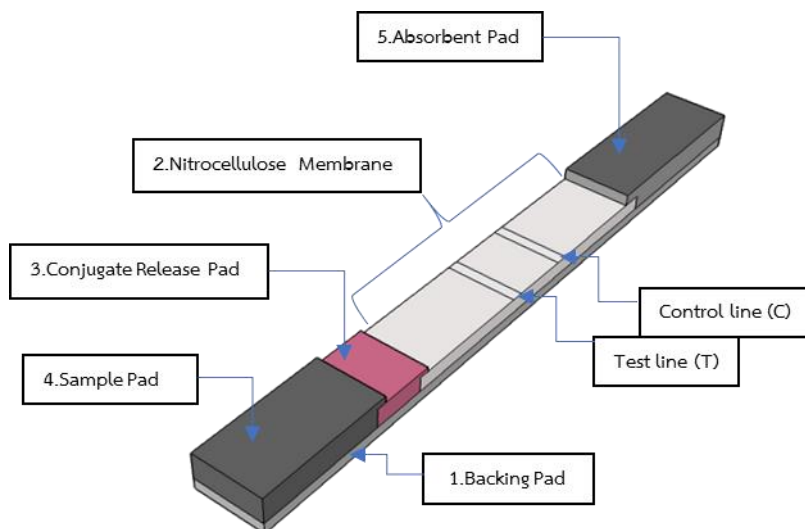
ตัดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane, NCM) ชนิด AE99 และ CN140 (Sartorius, USA) ให้มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ความยาวเท่ากับแผ่นพลาสติก backing pad ที่เลือกใช้งาน ทำการขีดเส้นควบคุม (control line, c) ด้วยปากกาหมึกซึม (fountain pen) โดยใช้ส่วนปลายปากกาจุ่มลงในสารละลายแอนติบอดีต่อ IgG ของกระต่าย (GAR-IgG, Merk, USA) โดยใช้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นใช้ปากกาแตะลงบนเมมเบรนเบาๆ แล้วขีดลากเส้นให้ห่างจากขอบด้านบนของแผ่นเมมเบรนประมาณ 1 เซนติเมตร และระวังไม่ให้เส้นที่ขีดขาด หรือหนามากเกินไป ควรให้มีความสม่ำเสมอตลอดทั้งแนวเส้น สำหรับเส้นตรวจ (test line, t) ทำเช่นเดียวกับเส้นควบคุมแต่ใช้สารละลาย as-CTV แทน และมีความเข้มข้น 1.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยตำแหน่งอยู่ถัดจากเส้นควบคุมทางด้านแผ่น conjugated release pad ประมาณ 0.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 2) จากนั้นพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วนำแผ่นเมมเบรนเข้าอบในตู้อบ (force air drying oven) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำไปเก็บไว้ในกล่องพลาสติกที่บรรจุสารดูดซับความชื้น (silica gel) เพื่อกันความชื้นในระหว่างรอประกอบชุดตรวจ (strip test)



ภาพที่ 2 การเตรียมเส้นตรวจ (T) และเส้นควบคุม (C)

3.3 การประกอบชุดตรวจ (Strip Test)

การประกอบชุดตรวจโดยวางแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ลงบนแผ่นพลาสติก Backing card แล้ววางแผ่นเมมเบรน Conjugated release pad ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ประมาณ 2 มิลลิเมตร ต่อมาวางแผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช Sample Pad ให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Conjugated release pad ประมาณ 2 มิลลิเมตร และวางแผ่น Absorbent sink ทางด้านปลายของชุดตรวจโดยให้เกยทับแผ่นเมมเบรน Nitrocellulose ประมาณ 2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 3) เมื่อประกอบเสร็จแล้วทำการตัดชุดตรวจสอบให้มีขนาดประมาณ 0.4 x 6 เซนติเมตร บรรจุขึ้น Strip Tests ลงในถלבพลาสติก (Ching, 2015)



ภาพที่ 3 ส่วนประกอบชุดตรวจสอบ Lateral Flow Immunoassay (LFIA) แบบ Strip Test

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือน ตุลาคม 2561 สิ้นสุดเดือน ตุลาคม 2563

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

การทดลองที่ 2.11 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบแมลงวันแดง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillet)

(Diptera: Tephritidae) ด้วยไฟร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (ปีเริ่มต้น 2561 - 2563)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด (Figure 1) ใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก (wet bucket trap) จาก Bugs for Bugs Pty Ltd, Australia ซึ่งประกอบด้วยสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 2 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจีนอล (Methyl Eugenol) และคิวลัวร์ (CUE lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2560 - กันยายน พ.ศ. 2561 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ Leica รุ่น M 165C (Leica Microsystems Ltd,

Switzerland) ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ของ Drew and Romig (2013, 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ลงในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้มาสกัดดีเอ็นเอ ตามกรรมวิธี Boontop *et al.*, (2017) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวน 3 ซ้ำของแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis Buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 20 ชั่วโมง ทำการย่อยสลายตัวอย่างโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอด ISOLATE II Genomic DNA และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ล้างตะกอน โดยการเติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ตามด้วย Wash Buffer GW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ที่ทิ้งของเหลวที่เหลือ ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ละลายดีเอ็นเอ โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000x g นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 เพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ universal primer จากยีน *cox1*: LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198 (TAAACTTCAGGGTGACC AAAAATCA) (Folmer *et al.*, 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 μ M ไพรเมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 μ M ไพรเมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อให้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation XR) รุ่น Universal Hood II (Biorad, USA) ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA และวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเปรียบเทียบระดับความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้จากงานวิจัยนี้กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ด้วยการ Blast (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) และเก็บบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ที่ทำการศึกษาค้นคว้า (ข้อ 2) และแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นศัตรูพืชที่กักกันจากฐานข้อมูล GenBank มาจัดลำดับและทำการตรวจสอบโดยใช้โปรแกรม chromas (version, 2.33, Technelysium Pty Ltd, Australia) และ BioEdit เพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* คัดเลือกตำแหน่ง single-nucleotide polymorphism (SNP) ซึ่งจะใช้ระบุชนิดของแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงโดยอาศัยโปรแกรม GeneFisher (<http://www.bibiserv.techfak.unibielefeld.de/genefisher/>) โดยเลือกความยาวของไพรเมอร์ที่มีขนาด 18 - 25 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบมาวิเคราะห์ dimer hairpin และ false priming sites ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) และนำไพรเมอร์ออกแบบไว้มาวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงโดยการ BLAST กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* กับแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการสำรวจในประเทศไทย

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ในระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ โดยทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ (laboratory samples) ในระยะไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations) จากตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่เก็บรวบรวมมาจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* กับตัวอย่างที่พบปนเปื้อนในพืช ผัก และผลไม้ที่พบจากการสุ่มตรวจผัก ผลไม้ (intercepted samples) จากเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

4.5 ยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดยการทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ให้บริสุทธิ์และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

- การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบ ให้สอดคล้องกับ ชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม 2560 - กันยายน 2563

สถานที่ : 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่างๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.12 การผลิตโปรตีนและแอนติบอดีที่จำเพาะ ต่อ immunodominant membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย (ปีเริ่มต้น 2562 - 2564)

วิธีการ

1. การเพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์โดยเพิ่มบริเวณจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะแบบ double digest restriction enzyme (adapter) ที่บริเวณ 5' และบริเวณ 3' ของคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ imp gene ของเชื้อไฟโตพลาสมา และเพิ่มตำแหน่ง stop codon (TAA) บริเวณ 3' เพื่อใช้ประกอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ imp gene-adapter ด้วยเทคนิค PCR ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000TM Thermal Cycler, BIO-RAD)

2. การสังเคราะห์ *imp* gene-adapter เชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการสังเคราะห์ *imp* gene-adapter เชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยเทคนิค PCR ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH₂O) จำนวน 21 ไมโครลิตร DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific™) จำนวน 25 ไมโครลิตร (0.1 unit/μl) ไพรมเมอร์ forward-*Xho*I และ reverse-*Eco*RI อย่างละ 1 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบจำนวน 2 ไมโครลิตร นำปฏิกิริยาที่เตรียมเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD) ตั้งโปรแกรม ดังนี้ ขั้นที่ 1: Pre-denature 94°C นาน 5 นาที ขั้นที่ 2: denature 94°C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 3: annealing 55°C นาน 30 วินาที ขั้นที่ 4: Extension 72°C นาน 1 นาที (วนซ้ำขั้นที่ 2 – 4 จำนวน 30 รอบ) ขั้นที่ 5: Post-extension 72°C นาน 10 นาที และขั้นที่ 6: Hold ที่ 15°C และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder แสดงผลและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

3. ตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและโคลนยีนเข้า Expression vector

นำชิ้นยีน *imp* gene-adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector (fig 1) ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ *Eco*RI แบบ Double digestion (FastDigest® enzyme, Fermentas, Canada) ปฏิกิริยารวม 20 ไมโครลิตร

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา Double digestion ดังนี้

1. ดีเอ็นเอเป้าหมาย (1 μg/μl) / pBAD/His A expression vector (1 μg/μl) จำนวน 5 ไมโครลิตร
2. 10X FastDigest™ Green Buffer จำนวน 5 ไมโครลิตร
3. FastDigest enzyme (*Xho*I) จำนวน 1 ไมโครลิตร
4. FastDigest enzyme (*Eco*RI) จำนวน 1 ไมโครลิตร
5. น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH₂O) จำนวน 8 ไมโครลิตร

ผสมส่วนประกอบปฏิกิริยาให้เข้ากันดี แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) นาน 5 นาที และตรวจสอบผลของปฏิกิริยา Double digestion ด้วยเทคนิค gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder แสดงผลและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

Map of pBAD/His The figure below summarizes the features of the pBAD/His vector. Complete sequences for all three pBAD/His vectors are available for downloading at www.invitrogen.com or by contacting Technical Support (see page 28). Details of each multiple cloning site are shown on pages 9–11.

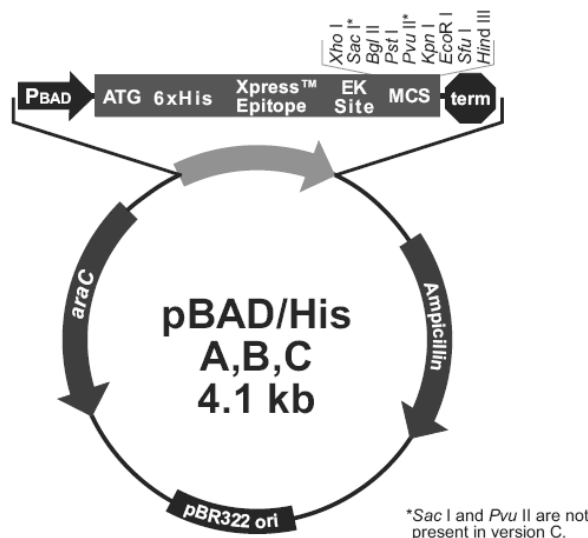


figure 1 Map of pBAD/His A, B, and C vector with the relevant features of the (source: www.biosubway.com)

4. การโคลนยีน digested *imp* gene-adapter กับ digested pBad/HisA Expression vector

สกัดชิ้นยีน digested *imp* gene-adapter ให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัดเจลและพีซีอาร์สำเร็จรูป FavorPreP GEL/PCR Purification Mini Kit (ตามคู่มือแนะนำ, FAVORGEN) นำมาเชื่อมต่อกับ พลาสมิดพาหะ digested pBad/HisA Expression vector ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase (Promega) ปฏิบัติกรรรวม 10 ไมโครลิตร ดังนี้


ส่วนประกอบของปฏิกิริยา

- | | |
|--|-------------------|
| 1. น้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH ₂ O) | จำนวน 5 ไมโครลิตร |
| 2. 2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase | จำนวน 2 ไมโครลิตร |
| 3. digested <i>imp</i> gene-adapter (8.3 ng) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |
| 4. digested pBad/HisA Expression vector (50 ng) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |
| 5. T4 DNA Ligase (3 Weiss units/μl) | จำนวน 1 ไมโครลิตร |

ผสมส่วนประกอบปฏิกิริยาให้เข้ากันดี แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และถ่าย พลาสมิดสายผสมเข้าสู่คอมพีเทนต์เซลล์ (competent cell) แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) และตรวจสอบโคลนแบคทีเรียที่คิดว่า ได้รับพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR โดยคู่ไพรเมอร์ pBAD-F/pBAD-R (**table 1**) และตรวจสอบ ขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค gel electrophoresis เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder แสดงผลและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่ตรวจแล้วว่าได้รับ พลาสมิดสายผสมดังกล่าวมาสกัดด้วยชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย เพื่อนำข้อมูลที่ได้ออกไปทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีนต่อไป

Table 1 Shows pBAD-F/pBAD-R Primers

Primer Name	Primer Sequences  3'	bp	Tm °C
pBAD forward primer	5' ATG CCA TAG CAT TTT TAT CC 3'	20	50
pBAD reverse primer	5'GAT TTA ATC TGT ATC AGG 3'	18	

5. การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน

วิเคราะห์และตรวจสอบคุณสมบัติการละลายน้ำของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtScale (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) และตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>)

6. กระตุ้นการแสดงออกโปรตีนลูกผสมและวิเคราะห์ขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE

การเตรียม starter gene โดยนำโคลนเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 จำนวน 1 โคลนีที่ตรวจสอบแล้วว่า มีพลาสมิดสายผสมของชิ้นยีน *imp* gene-adapter/6xHisTag ใน pBAD/His A expression vector (*Imp* recombinant protein) เลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 50 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย 20% L-Arabinose ความเข้มข้นแตกต่างกันอย่างน้อย 5 ระดับ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนลูกผสม และหาช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนลูกผสม หลังจากนั้นวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ด้วย TGX Stain-Free FastCast Acrylamine Kit, 12 % (BIO-RAD, Cat#1610185) ด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIO-RAD, Cat#1658005) ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 120 เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นย้อมแถบโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยสารละลาย Destaining เขย่าที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบขนาดโปรตีนลูกผสมกับแถบโปรตีนมาตรฐาน BLUltra Prestained Protein Ladder (BIO-HELIX, Cat#1BHC-PM001-0500) ตรวจสอบแถบโปรตีนและบันทึกภาพด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

7. การแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม *imp* gene-adapter /6xHisTag (Imp recombinant protein) เพื่อนำมาใช้เป็น starter gene ตามวิธีการข้อ 6 จากนั้นนำสารละลาย starter gene ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ผสมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน (เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 500 ไมโครลิตร เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีนด้วยสารละลาย 20% L-Arabinose ตามความเข้มข้นที่เลือกให้เหมาะสม เขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่เลือกให้เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนมากที่สุด ทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บตะกอนมาละลายด้วย lysis buffer A นำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultra schall BANDELIN SONOPULS HD และแยกสกัดโปรตีน IMP recombinant protein ให้บริสุทธิ์ด้วย ProBond™ Nickel-Chelating Purification System ตามคำแนะนำของผลิตภัณฑ์ (Novex, Catalog Numbers R801-01) ทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

8. การผลิตแอนติบอดีในสัตว์ทดลอง

การผลิตโพลีคลอนอลแอนติบอดีในสัตว์ทดลองโดยเตรียมแอนติเจนโปรตีนลูกผสมของ IMP recombinant protein ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 ให้ผสมเข้ากันเป็น emulsion ใช้ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (immunized intramuscular) ของกระต่าย (New Zealand White rabbit) ในครั้งแรก สำหรับการฉีดครั้งต่อไปผสมแอนติเจนกับ Incomplete Freund's adjuvant (IFA) ในอัตราส่วนและปริมาตรเท่าเดิม ใช้ฉีดสัตว์ทดลองทุก ๆ 2 สัปดาห์ รวมอีก 2 ครั้ง หลังจากฉีดสัตว์ทดลองครั้งที่ 2 ทำการเก็บเลือดโดยเจาะเส้นเลือดบริเวณใบหู

9. ตรวจสอบค่าไตเตอร์ที่เหมาะสมของโพลีคลอนอลแอนติบอดีที่ผลิต

นำโพลีคลอนอลแอนติบอดีต่อ IMP recombinant protein ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาว อ้อย ตรวจสอบค่าไตเตอร์ที่เหมาะสม ด้วยวิธี Indirect ELISA โดยดัดแปลงจากวิธีของ Clark และ Adam (1977) ทำการเจือจางด้วยสารละลาย coating buffer แบบ two-fold dilutions หลังจากนั้นนำมาอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (O.D. 405 nm) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Thermo Scientific Multiskan GO with cuvette port)

10. ทดสอบประสิทธิภาพโพลีคลอนอลแอนติบอดี

บดตัวอย่างพืชเป็นโรครัน carbonate coating buffer, pH 9.6 หยดลงในหลุมของโครเพลท (96-microwell plate) 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างโครเพลทด้วย phosphate buffer saline ที่มี tween 20 ผสมอยู่ (1X PBST) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เจือจางโพลีคลอนอลแอนติบอดี Imp ที่ผลิตได้ใน conjugate buffer 1: 500 และ 1 : 1,000 หยดลงในหลุมของไมโครเวลเพลท 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง เพื่อเติม Goat anti-rabbit IgG with alkaline phosphatase (AP3074, formerly Roche 1814206) ที่เจือจางใน PBS

1 : 3,000 หยดลงในหลุมของไมโครเพลท 50 ไมโครลิตร/หลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างไมโครเพลทด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที แล้วเคาะ plate ให้แห้ง จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 1X PBST จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที เตรียม 1x PNP substrate solution เติมนลงในไมโครเพลท ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (O.D. 405 nm) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Thermo Scientific Multiskan GO with cuvette port)

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2562-กันยายน 2564

สถานที่ ห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

การทดลองที่ 2.13 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR (ปีเริ่มต้น 2562 - 2564)

วิธีการ

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) (จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร)

2. การแยก genomic DNA ของเชื้อ Xcc ให้บริสุทธิ์

การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ Xcc สาเหตุโรคเน่าดำของคะน้า อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง NA (nutrient agar) ใช้ลูบฆ่าเชื้อ และเชื้อแบคทีเรียให้เต็มลูบ ละลายใน 1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งส่วนใสข้างบน เติมน้ำด้วย 100 ไมโครลิตร TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris และ 1mM EDTA pH 8.0) ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องปั่น (vortex) เติมน้ำด้วย 500 ไมโครลิตรของ Guanidine thiocyanate – EDTA – Sarkosyl solution ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำด้วย 250 ไมโครลิตร ของ 7.5 M ammonium acetate ที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันวางบนน้ำแข็ง 5 นาที เติมน้ำด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เย็นในตู้ -20 องศาเซลเซียส จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอน เพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH 8.0 ปริมาณ 100

ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้นและคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

3. การตรวจสอบ genomic DNA ของ Xcc ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การทดสอบทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DLH120 : 5'CCGTAGCACTTAGTGCAATG 3' DLH125 : 5'GCATTTCCATCGGTCACGATTG 3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* และใช้คู่ไพรเมอร์ DLH109 : 5'ATGTCGCTCAACACGCTTTC-3' DLH112 : 5'-GTTTTGCGTGTAGCCCTTGC-3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Brassica* spp. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (19 ul reaction mixture + 1 ul genomic DNA) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส นำ PCR product ที่ได้ไปรันเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

4. การเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา real-time PCR

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้ผลดี มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย Xcc คัดเลือกไพรเมอร์จากนั้นนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดโดยวิธี Real-time PCR โดย Berg et al. (2006) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* และออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* from brassica จากส่วนของยีน ITS นำไพรเมอร์มาทดสอบทำปฏิกิริยา real-time PCR

Xcc (*hrpF*)

DLH153 GTAATTGATACCGCACTGCAA

DLH154 CACCGCTCCAGCCATATT

Brassica spp. (ITS)

DLH155 CAACGGATATCTCGGCTCTC

DLH156 TTGCGTTCAAAGACTCGATG

5. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR

การทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ทำในภาตพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler®480 Multiwell Plate 96, Roche) ใช้ปริมาณรวมของปฏิกิริยา จำนวน 20 ul ประกอบไปด้วย 1X LightCycler 480 Probe Master, Roche Diagnostic (FastStart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP mix (with dUTP instead of dTTP) และ 6.4 mM MgCl₂) สำหรับคู่ probe primer Xcc (*hrpF*) และ Brassica spp. (ITS) ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.1- 0.4 uM (ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมของ

ปฏิกิริยา) และ 1-5 ul DNA ของ Xcc แล้วนำไปเข้าเครื่อง real-time PCR (LightCycler® 480 System, Roche) โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา real-time PCR ทดสอบหาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม เริ่มที่ 95 C 15 วินาที 95 C 3 วินาที และ 56-66 C 1 นาที (ปรับเปลี่ยนเพื่อให้ได้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา) จำนวน 40 รอบ

6. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

ในการตรวจเชื้อ Xcc เป็นการทดสอบ primer ที่สังเคราะห์ไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้ข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

6.1 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

นำดีเอ็นเอของ Xcc ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม และเซลล์เชื้อแบคทีเรีย Xcc 10^8 หน่วยโคลนี/มิลลิลิตร และเซลล์แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้แก่ *X. axonopodis* pv *citri*, *X. axonopodis* pv *vesicatoria*, *X. axonopodis* pv *glycines*, *X. axonopodis* pv *dieffenbachiae*, *X. oryzae* pv *oryzae*, *X. oryzae* pv *oryzicola*, *Erwinia* spp. และเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบคะน้า ทำปฏิกิริยา Real-time PCR กับทั้ง 2 คู่ไพรเมอร์ ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ เพื่อทดสอบความจำเพาะของปฏิกิริยา real-time PCR

6.2 ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

นำดีเอ็นเอของ Xcc มาทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์แบคทีเรีย Xcc ที่ความเข้มข้น 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1 10 หน่วยโคลนี/มิลลิลิตร นำไปทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์

7. ใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้า

ปลูกเชื้อ Xcc ลงเมล็ดคะน้าให้มีปริมาณเชื้อ 10^4 หน่วยโคลนี/เมล็ด จากนั้นนำเมล็ดคะน้าที่ติดเชื้อไปเพิ่มในเมล็ดคะน้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยเพิ่มในอัตราส่วน 1:100 1:1,000 และ 1:10000 ต่อจำนวนเมล็ดดี 10,000 เมล็ด นำเมล็ดคะน้าที่เตรียมเสร็จแล้วไปแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) และเติม 0.02 % Tween 20 แช่ 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง ตกตะกอน ละลายตะกอนด้วย 0.85% NaCl แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับวิธีการนำเมล็ดคะน้าบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใสหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทั้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค conventional PCR และการตรวจสอบเชื้อด้วยอาหาร semi-selective สำหรับแยกเชื้อ Xcc

8. ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคคะน้ำ

ปลูกเชื้อ Xcc ลงเมล็ดคคะน้ำให้มีปริมาณเชื้อ 10^4 หน่วยโคลน/เมล็ด จากนั้นนำเมล็ดคคะน้ำที่ติดเชื้อไปเพิ่มในเมล็ดคคะน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยเพิ่มในอัตราส่วน 1:100 1:1,000 และ 1:10000 ต่อจำนวนเมล็ดดี 10,000 เมล็ด นำเมล็ดคคะน้ำที่เตรียมเสร็จแล้วไปแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) และเติม 0.02 % Tween 20 แช่ 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ละลายตะกอนด้วย 0.85% NaCl แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution $10^{-1} - 10^{-8}$ นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับวิธีการนำเมล็ดคคะน้ำบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใสหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution $10^{-1} - 10^{-8}$ แล้วนำไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ เพื่อทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคคะน้ำ

9. ใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคคะน้ำที่สุ่มตรวจ

ตัวอย่างเมล็ดคคะน้ำที่จะสุ่มมาตรวจต้องมีจำนวนเมล็ดขั้นต่ำไม่น้อยกว่า 30,000 เมล็ด และทำการแบ่งออกเป็นตัวอย่างย่อย ตัวอย่างละ 10,000 เมล็ด ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association) นำเมล็ดแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) และเติม 0.02 % Tween 20 แช่ 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ละลายตะกอนด้วย 0.85% NaCl แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution $10^{-1} - 10^{-8}$ นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ เปรียบเทียบกับการนำตัวอย่างเมล็ดคคะน้ำบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใสหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค conventional PCR และการตรวจสอบเชื้อด้วยอาหาร semi-selective สำหรับแยกเชื้อ Xcc แช่ในบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใสหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR ตามสภาวะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสมกับแต่ละคู่ไพรเมอร์ และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค conventional PCR และการตรวจสอบเชื้อด้วยอาหาร semi-selective สำหรับแยกเชื้อ Xcc

เวลาและสถานที่ :

- เริ่มต้น ตุลาคม 2559 สิ้นสุด กันยายน 2562
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานแบคทีเรียวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.14 การตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิคแลมป์ (ปีเริ่มต้น 2562 - 2564)

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างและจำแนกไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้สัณฐานวิทยา

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่าเป็นพืชอาศัยของไส้เดือนฝอยรากปม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตร โดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดินเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติกบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปม

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน 250 กรัมโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำปริมาตร 2 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างดินที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างไส้ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยรากปมจากพืชโดยการคีบกลุ่มไข่จากรากหรือส่วนของพืชโดยตรง

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่ 1 กลุ่มจากรากด้วยปากคีบ นำไปแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนับตัวอย่าง ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอย่างรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อ

การตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา

ตรวจลักษณะรูปร่างส่วนกัน โดยแยกตัวเต็มวัยไส้เดือนฝอยรากปมเพศเมียจากรากมะเขือเทศ แขนใน lactic acid 45% นาน 30 นาที ตัดส่วนของผนังลำตัว (cuticle) บริเวณส่วนกันวางบนสไลด์ในหยดกลีเซอรอล ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง เตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐาน โดยคงสภาพไส้เดือนฝอยตามวิธีการของ Seinhorst (1959) ตรวจสอบรูปร่างลักษณะทางสัณฐาน วัดขนาดส่วนต่างๆ เปรียบเทียบกับลักษณะของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ในเอกสารวิชาการ (Yang and Eisenback, 1983; Rammah and Hirschmann, 1988) โดยตรวจสอบลักษณะต่างๆ เช่น ลักษณะส่วนหัวของตัวเต็มวัยเพศเมีย ส่วน hyaline region บริเวณหางของตัวอ่อนระยะที่สอง (EPPO, 2011)

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง และตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิค PCR

การสกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เขี่ยไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหยด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ pipette tip คูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่ อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟ เป็นเวลา 6 นาที ถ้าเตาไมโครเวฟเป็นชนิด 750 วัตต์ (สามารถปรับเวลาตามกำลังไฟของเตาไมโครเวฟให้ได้ 4,500 วัตต์-นาที ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม)

ตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MK7-F: 5'GATCAGAGGCGGGCGCATTGCGA 3' และ MK7-R : 5'CGAACTCGCTCGAACTCGAC 3' และคู่ไพรเมอร์ Me-F: 5'AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG 3' และ Me-R: 5'TCAGTTCAGGCAGGATCAACC 3' ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้ GoTaq® Green Master Mix (Promega) 10 ไมโครลิตร forward และ reverse primer (ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) อย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร ในหลอด PCR ขนาด 0.2 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สำหรับคู่ไพรเมอร์ MK7-F/MK7-R ,และอุณหภูมิ 54 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที สำหรับคู่ไพรเมอร์ Me-F/Me-R, อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทั้งหมด 40 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที

3. การทดสอบเทคนิคแลมป์พีซีอาร์

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสม

ทำปฏิกิริยาแลมป์ตามวิธีการของ Notomi *et al.* (2000) โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบโดย Niu *et al.* (2012) ซึ่งตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน 5S rDNA-IGS2 ในปฏิกิริยาปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x *Bst* DNA polymerase buffer 2.5 μ L, 1.4mM dNTP, FIP และ BIP primers อย่างละ 1.6 μ M, F3 และ B3 outer primers อย่างละ 0.2 μ M, LF and LB primers อย่างละ 0.8 μ M, 0.8 M betaine, 8 U *Bst* DNA polymerase และ 1 μ L purified genomic DNA ซึ่งมีดีเอ็นเอประมาณ 10 นาโนกรัม สภาวะที่เหมาะสมโดยทำปฏิกิริยาที่ 60-65 องศาเซลเซียส นาน 30 45 60 หรือ 75 นาที และหยุดปฏิกิริยาโดยบ่มที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำผลผลิตปฏิกิริยาที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอีแอกโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30 นาที หรือตรวจสอบโดยเติมสาร 1:10 fluorescent dye SYBR Green I ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และตรวจภายใต้แสง UV

การทดสอบความไว (sensitivity)

ทดสอบความไวของปฏิกิริยา โดยการทำให้ 10-fold dilution ของดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR (ใช้ไพรเมอร์ MeF3/B3) โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์พีซีอาร์ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่นๆ ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่นๆ เช่น *Radopholus Pratylenchus Hirschmaniella Rotylenchulus Tylenchorhynchus Helicotylenchus* รวมทั้งไส้เดือนฝอยที่ไม่ใช่ศัตรูพืชชนิดต่างๆ ที่มักพบในตัวอย่างดิน ซึ่งเป็นตัวอย่างไส้เดือนฝอยจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์ เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR ที่ใช้ universal primers สำหรับไส้เดือนฝอย เช่น VRF1/F2 และไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* เช่น SCAR marker Mk7-F/R ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลของปฏิกิริยาแลมป์ที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ ผลการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์เปรียบเทียบกับ conventional PCR ผลการตรวจพบรากมะเขือเทศด้วยเทคนิคแลมป์เปรียบเทียบกับ conventional PCR ผลการตรวจพบรากพืชจากแปลงปลูกของเกษตรกรด้วยเทคนิคแลมป์เปรียบเทียบกับ conventional PCR

- การวิเคราะห์ผลการทดลอง
- เปรียบเทียบผลของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างๆ กัน

- เปรียบเทียบความไวของเทคนิคแลมป์กับ conventional PCR โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่างๆ

เวลาและสถานที่ : - เริ่มต้น ตุลาคม 2562 สิ้นสุด กันยายน 2563

- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.15 การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) เพื่อนำเข้าและส่งออกด้วยไฟร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (ปีเริ่มต้น 2562 - 2564)

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้

รวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ตัวเต็มวัยจากพื้นที่การเกษตร โดยเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ 6 ภูมิภาคของประเทศไทย (ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้) โดยเลือกพื้นที่เพื่อเป็นตัวแทนในการเก็บตัวอย่างภูมิภาคละ 3 จังหวัด ใช้กับดักล่อแมลงวันผลไม้แบบถังเปียก ซึ่งประกอบด้วยสารล่อ (pheromone) แมลงวันผลไม้ 3 ประเภท ได้แก่ เมทิลยูจินอล (Methyl Eugenol) คิวลัวร์ (CUE lure) และลาติลัวร์ (Lati lure) ผสมสารฆ่าแมลง malathion ในอัตราส่วน 4 : 1 และภายในกับดักบรรจุสารโพโรไลนไกลคอล เพื่อรักษาสภาพดีเอ็นเอของตัวอย่างแมลงวันผลไม้ติดกับดัก 5 กับดักต่อสารล่อหนึ่งประเภทต่อหนึ่งพื้นที่ เก็บรวบรวมตัวอย่างระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 - กันยายน พ.ศ. 2562 จำแนกชนิดแมลงวันผลไม้จากลักษณะภายนอกภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ร่วมกับแนวทางการวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้ Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia (Drew and Romig, 2013) และ Keys to the Tropical Fruit Flies of South-East Asia (Tephritidae: Dacinae) (Drew and Romig, 2016) นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้ดองในแอลกอฮอล์ 95% และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้เก็บรักษาอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1 นำตัวอย่างแมลงวันผลไม้มาสกัดดีเอ็นเอ ตามกรรมวิธี Boontop *et al.*, (2016) ร่วมกับคำแนะนำของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (ISOLATE II Genomic DNA kit; Bioline, Australia) ที่แนบมากับผลิตภัณฑ์บริษัท โดยนำขาด้านขวาจำนวน 3 ข้างของแมลงวันผลไม้ (25 มิลลิกรัม) มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Lysis Buffer GL ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และสารละลาย Proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 - 20 ชั่วโมง ทำการย่อยสลายตัวอย่างโดยเขย่าอย่างรวดเร็ว และเติม Lysis Buffer G3 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เขย่าอย่างสม่ำเสมอ เติมแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (ethanol 100%) ปริมาตร 210 ไมโครลิตร เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอด ISOLATE II Genomic DNA และตกตะกอน

ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ล้างตะกอน โดยการเติม Wash Buffer GW1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วย เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ตามด้วย Wash Buffer GW2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ที่ทิ้งของเหลวที่เหลือ ตกตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 11,000x g นาน 1 นาที ย้ายหลอด ISOLATE II Genomic DNA tube มาใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ละลายดีเอ็นเอ โดยการเติม Elution Buffer G ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง 11,000x g นาน 1 นาที นำดีเอ็นเอที่ได้เก็บในตู้เก็บรักษา อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในวิธีการต่อไป

2.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ universal primer จากยีน *cox1*: LCO1490 (GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG) และ HCO2198

(TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA) (Folmer *et al.*, 1994) ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 1 ไมโครลิตร 10 μ M ไพรเมอร์ LCO1490 1 ไมโครลิตร 10 μ M ไพรเมอร์ HCO2198 1 ไมโครลิตร สารละลาย GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อให้ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยนำปฏิกิริยา PCR ใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยกำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้ 1) initial-denaturing 94 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที 2) denaturing ที่ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที 3) annealing ที่ 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที 4) extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (จำนวน 35 รอบ) (โดยในขั้นตอน 2-4 ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ) และ 5) final extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที จำนวน 1 รอบ

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) ที่อะกาโรสเจลความเข้มข้น 2% ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยส่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ABI BigDye terminator chemistry ตามกรรมวิธีของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้

2.3 นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน *cox1* ของแมลงวันผลไม้ที่นำมาศึกษาทั้งหมด ทำการวิเคราะห์ โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (sequence assembly) ด้วยโปรแกรม Bioedit Sequence Alignment Editor Version 7.2.5 (Hall, 1999) และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในรูปแบบไฟล์ FASTA เปรียบเทียบกับ นิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ด้วยการBlast

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) เพื่อยืนยันความถูกต้องลำดับนิวคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ เก็บบันทึกลำดับ

วคลีโอไทด์ของแมลงวันผลไม้ไว้ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank ในรูปแบบ accession number เพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* จากแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และสืบค้นข้อมูลแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นศัตรูพืชกักกันที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genebank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม chromas (version, 2.33, Technelysium Pty Ltd, Australia) และ BioEdit เพื่อตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เริ่มจากการหาตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เป้าหมายที่มีความแตกต่างกัน (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ระหว่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ จากนั้นออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงโดยอาศัยโปรแกรม Vector NTI (Invitrogen) (<https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>) โดยเลือกความยาวของไพรเมอร์ที่มีขนาด 18 - 25 คู่เบส และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ออกแบบมาวิเคราะห์ dimer hairpin และ false priming sites ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) และนำไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้มาวิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงโดยการ BLAST กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล สังเคราะห์คู่ไพรเมอร์จำนวนสองคู่ไพรเมอร์เพื่อใช้จำแนกแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยเทคนิค PCR

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำไพรเมอร์ที่เหมาะสมมาทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานดังต่อไปนี้

4.1 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับแมลงวันผลไม้ชนิดต่าง ๆ ที่ได้จากการสำรวจในประเทศไทย

4.2 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ โดยทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการ (laboratory samples) ในระยะ ไข่ ตัวหนอน ดักแด้และตัวเต็มวัย

4.3 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations) จากตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เก็บรวบรวมมาจากภูมิภาคต่าง ๆ ของประเทศไทย

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอย่างที่พบปนเปื้อนในพืช ผัก และผลไม้ที่พบจากการสุ่มตรวจผัก ผลไม้ (intercepted samples) จากเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชที่มีการส่งออก

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ที่อะกาโรสเจลความเข้มข้น 1.5% ผสม RedSafe dye (iNtRON Biotechnology, USA) ในสารละลาย 1X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอ

เล็ด (UV) บันทึกผลด้วยเครื่องถ่ายภาพเจลพร้อมโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ยืนยันความถูกต้องของตัวอย่างที่เพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอด้วยคูปิปรเมอร์ที่ออกแบบโดยการทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ให้บริสุทธิ์และตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730 x 1 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) ตามกรรมวิธีของบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

- การบันทึกข้อมูล

- 1) บันทึกข้อมูลดีเอ็นเอบาร์โค้ดในรูปแบบของ FASTA ไฟล์
- 2) บันทึกข้อมูลของดีเอ็นเอต้นแบบให้สอดคล้องกับชนิดแมลงวันผลไม้ที่ใช้เป็นต้นแบบงานวิจัย ซึ่งประกอบด้วยพิกัดทางภูมิศาสตร์ วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่างแมลงวันผลไม้แต่ละชนิด และชื่อผู้เก็บตัวอย่าง

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลาการทดลอง : ตุลาคม พ.ศ. 2561 - กันยายน พ.ศ. 2564

สถานที่: 1) แหล่งปลูกพืชจังหวัดต่าง ๆ ในภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้

- 2) ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานอนุกรมวิธานแมลง กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.16 การใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* (ปีเริ่มต้น 2563 - 2564)

วิธีการ :

1. เตรียมไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* สำหรับการทดสอบ

ประชากรไล่เดือนฝอยรากปม 4 ชนิด คือ *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* ที่ใช้ในการทดลองบางส่วนจะนำมาจากงานเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชของกรมวิชาการเกษตร และการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติมจากพื้นที่เพาะปลูกที่มีการระบาดของไล่เดือนฝอยรากปม

การเก็บตัวอย่างดิน และรากพืช

เก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกพืชที่มีรายงานว่า เป็นพืชอาศัยของไล่เดือนฝอยรากปม โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 20 จุดต่อแปลง ความลึก ประมาณ 15-20 เซนติเมตรโดยใช้ท่อเก็บตัวอย่างดินเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 นิ้ว คลุกเคล้าเข้าด้วยกันให้ได้ตัวอย่างดินอย่างน้อยแปลงละ 1 กิโลกรัม ใส่ในถุงพลาสติกบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์ และชนิดพืชปลูก รวมทั้งเก็บตัวอย่างราก หรือส่วนของพืชที่แสดงอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของไล่เดือนฝอยรากปมหากพบในพื้นที่

การแยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดินและพืช

แยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน 250 กรัมโดยวิธีการกวนตัวอย่างดินในน้ำสะอาด และกรองน้ำส่วนบนผ่านตะแกรงโลหะที่มีขนาดช่อง 850 ไมโครเมตร วางบนตะแกรงที่มีขนาดช่อง 38 ไมโครเมตร ล้างตัวอย่างที่ค้างอยู่บนตะแกรงอันล่างและนำตัวอย่างใส่ลงบนกระดาษกรอง ที่วางอยู่บนตะแกรงไนลอน วางลงในจานรองที่มีน้ำสะอาด (Decanting and Sieving with Baermann's Tray Technique) ตรวจไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แยกไส้เดือนฝอยรากปมจากพืชโดยการคีบกลุ่มไข่จากรากหรือส่วนของพืชโดยตรง

การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม และเตรียมประชากรไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์

นำต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาที่อายุ 1 เดือนปลูกในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปมในกระถาง หลังจากนั้น 45 วัน ล้างรากมะเขือเทศด้วยน้ำสะอาด เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม โดยเริ่มเลี้ยงจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยใช้ปากคีบๆ กลุ่มไข่ 1 กลุ่มแช่ในน้ำสะอาดในถ้วยนับตัวอย่าง ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ นำตัวอ่อนไส้เดือนฝอยและไข่ใส่ลงในกระถางที่ปลูกต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือน เลี้ยงไว้ประมาณ 60 วัน เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมชนิดเดียวกันที่บริสุทธิ์ หากเป็นตัวอย่างรากที่มีกลุ่มไข่ จะเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมจากกลุ่มไข่ 1 กลุ่ม โดยคีบกลุ่มไข่มาแช่ในน้ำกลั่น ตรวจสอบการฟักของตัวอ่อนระยะที่สอง แล้วนำไปเทใส่ในต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์สีดาอายุ 1 เดือนที่ปลูกในกระถางในดินอบฆ่าเชื้อ เตรียมตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สองเพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ โดยคีบกลุ่มไข่วางลงบนตะแกรงไนลอนที่แช่อยู่ในน้ำสะอาดในจานเลี้ยงเชื้อ ได้ตัวอ่อนระยะที่สองในน้ำสะอาดสำหรับนำไปสกัดดีเอ็นเอ

การจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐาน

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานโดยเปรียบเทียบลักษณะรูปร่างส่วนกันของตัวเต็มวัยเพศเมีย (perineal patterns) เปรียบเทียบลักษณะ ความกว้างยาวและสัดส่วนของอวัยวะต่างๆ ของไส้เดือนฝอยรากปมเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สองประกอบในกรณีที่ไม่สามารถใช้ลักษณะรูปร่างส่วนกันในการจำแนกได้ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากตำราและรายงานตีพิมพ์

จำแนกตัวอ่อนระยะที่สองด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

จำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมด้วยวิธีการทางอณูชีววิทยา โดยใช้ Molecular Diagnostic Key ที่จัดทำขึ้นโดย Adam *et al.* (2007) การสกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) ตามเอกสารที่แนบมากับผลิตภัณฑ์ เชื้อไส้เดือนฝอย 1 ตัว ใส่ลงบนหลอด PCR Buffer II (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8.3) 20 ไมโครลิตรบนสไลด์แก้ว ตัดตัวไส้เดือนฝอยออกเป็น 2-3 ท่อน โดยใช้ส่วนปลายของ pipette tip ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 500 ไมโครลิตร นำหลอดแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 10 นาที เติม proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในหลอดและบ่มที่ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่ใน heating block ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 5 นาที

เพื่อหยุดการทำงานของ proteinase K ใส่ GeneReleaser® 20 ไมโครลิตรลงในหลอด นำหลอดใส่ในเตาไมโครเวฟชนิด 750 วัตต์ เป็นเวลา 6 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ตามรายงานของ Adam *et al.* (2007)

2. ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่างๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii*

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่างๆ ตามตารางที่ 1 กับตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด และทดสอบหาสภาวะปฏิกิริยาที่เหมาะสมในการทำ multiplex PCR โดยการปรับองค์ประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา จำนวนรอบของปฏิกิริยา ปรับ annealing temperature ในช่วง 58-66°C โดยเพิ่มขึ้นทีละ 1°C และแต่ละ annealing temperature ปรับ extension time 30, 60, 90 และ 120 วินาที ปรับความเข้มข้นของไพรเมอร์ในช่วง 0.02-0.4 mM และ dNTP 0.02, 0.06, 0.1, 0.2 0.3, 0.4 และ 0.5 mM (Hu *et al.*, 2011)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ multiplex PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม 4 ชนิด

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างระยะที่สองของไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* ชนิดละอย่างน้อย 5 ไอโซเลต ตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของ multiplex PCR ที่ได้ โดยมีไส้เดือนฝอยรากปม *M. graminicola* เป็นตัวเปรียบเทียบ

ทดสอบความสามารถในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืช

ปลูกเชื้อต้นมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่พยายุ 1 เดือน ที่ปลูกในกระถางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 15 เซนติเมตรบรรจุดินอบฆ่าเชื้อ ด้วยตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่ 2 จำนวน 200 ตัวต่อกระถาง โดยใช้ไส้เดือนฝอยรากปมทั้ง 4 ชนิด และใช้การปลูกเชื้อโดยใช้น้ำเปล่าเป็นวิธีการเปรียบเทียบ สกัดดีเอ็นเอจากปมมะเขือเทศ 15 20 และ 30 วันหลังปลูกเชื้อ 10 ปมต่อราก ของต้นมะเขือเทศที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด สำหรับวิธีการที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำเปล่า จะตัดชิ้นส่วนรากมาสกัดดีเอ็นเอ ตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วย multiplex PCR

การบันทึกข้อมูล

บันทึกผลการจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปมทั้งทางสัณฐานวิทยาและอนุชีววิทยา ผลการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมและ ความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยา multiplex PCR ผลการตรวจปมรากพืชที่เกิดจากการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดต่างๆ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

- เปรียบเทียบผลขององค์ประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา จำนวนรอบของปฏิกิริยา annealing temperature, extension time และ dNTP
- เปรียบเทียบผลการตรวจไส้เดือนฝอยรากปมชนิดต่างๆ ด้วย multiplex PCR
- เปรียบเทียบผลการตรวจปมรากพืชที่ระยะเวลาต่างๆด้วย multiplex PCR

เวลาและสถานที่ :

- เริ่มต้น ตุลาคม 2563 สิ้นสุด กันยายน 2564
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไส้เดือนฝอย กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

การทดลองที่ 2.17 การผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (ปีเริ่มต้น 2563 - 2564)

วิธีการ

1. การเตรียมแอนติซีรัมและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

นำแอนติซีรัม polyclonal antibody ของกลุ่มงานไวรัสวิทยาที่ได้ผลิตไว้ใช้ในงานวิจัยมาทำการสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้น IgG ของเชื้อ LYSV โดยนำแอนติซีรัมมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในอัตรา 1:10 ผสมให้เข้ากัน แล้วเติม ammonium sulphate ที่อิ่มตัวในอัตราส่วน 1:1 กวนเบาๆ แล้วบ่มปฏิกิริยารวมไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนโปรตีนของ IgG ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แล้วละลายตะกอนด้วย ½ phosphate buffer saline (PBS) แล้ว dialyse ใน ½ PBS ปริมาตร 1 ลิตร ที่เติม Sodium azide (NaN₃) อัตรา 0.05% ทำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งนาน 4 ชั่วโมง เก็บสารละลาย IgG และนำไปวัดความเข้มข้นปริมาณโปรตีนของ IgG ด้วย Spectrophotometer ที่ O.D. 280 nm แล้วปรับให้ IgG มีความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปทดสอบคุณภาพในการทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสในน้ำคั้นใบพืช ด้วยเทคนิค NCM-ELISA (nitrocellulose ELISA) ก่อน นำ IgG ไปติดผลลากกับอนุภาคทอง (สุรณีและคณะ, 2532 ก.; สุรณีและคณะ, 2532 ข.)

2. การทดสอบประสิทธิภาพ IgG ของ LYSV ด้วยเทคนิค Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno

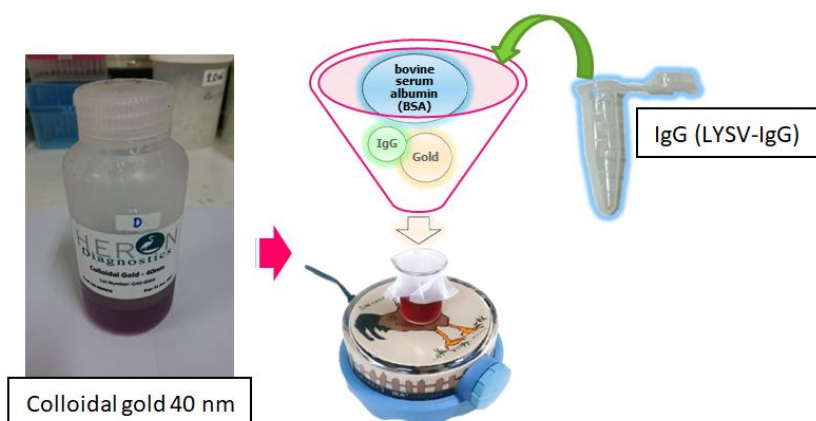
sorbent assay (NCM-ELISA)

นำตัวอย่างใบพืชที่ต้องการตรวจสอบใส่ในถุงพลาสติก เติม Extraction buffer (0.02 M Tris, 0.2 M NaN₃, 0.2% Na₂SO₃, pH 7.5) ในอัตราส่วน (ใบพืช : บัพเฟอร์ = 1:5) แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด ทำการวางรูปแบบของแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) ขนาด 0.45 µm ชนิด High bone N⁺ ด้วยการตีเป็นช่องตารางสี่เหลี่ยม (ขนาด 1X1 ตารางเซนติเมตร) ทำเครื่องหมายที่ตารางของตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงลำดับตัวอย่างจาก 1 ถึงตัวอย่างสุดท้าย นำแผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM แช่ใน TBS (0.02M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นคืบแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่แช่ไว้ด้วยกัน วางลงบนแผ่นกระดาษกรองแผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า โดยใช้ pasteur pipette ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง ทำการหยดตัวอย่างน้ำคั้นพืช 1 หยด หรือประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วคืบแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดผึ่งไว้ประมาณ 10-20 นาที นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้วแช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี blocking buffer (2% non fat milk ใน TBS pH

7.5) อยู่ 10 มิลลิลิตร + 0.8 มิลลิลิตร ของ 25% titonx100 แช่นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C หลังจากนั้นเท blocking buffer ออก ใส่ส่วนผสมของ IgG ของ LYSV ที่ละลายอยู่ใน blocking buffer ใหม่ ในอัตรา 1:500 แช่แผ่น NCM นั้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C แล้วจึงล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เทส่วนผสม Goat anti-rabbit conjugated Alkaline phosphatase (SIGMA A7778) ที่เจือจางเป็น 1:3000 ในสารละลาย blocking buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TBS-Tween 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที แล้วเทส่วนผสม substrate (ละลาย 0.25% AS- MX จำนวน 1 มิลลิลิตร ใน 5 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl, pH 8.2 และละลายสาร Fast red TR-salt (FR-TR) ใน 6 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl, pH 8.2 เทส่วนผสมทั้ง 2 รวมกัน แล้วเทลงในกล่องแช่แผ่น NCM เขย่าเบาๆ รอดูผลของปฏิกิริยาประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจนแล้วเท substrate ออก แล้วเทน้ำกลั่นลงแทน เพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

3. การติดสลาก IgG ของ LYSV ด้วยอนุภาคทอง

ติดฉลาก IgG (LYSV-IgG) ด้วยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร ตามวิธีการของสุรภีและคณะ (2547) โดยกวนผสมสารแขวนลอยอนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร (บริษัทแปซิฟิกไบโอเทค ประเทศไทย) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร กับ IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องแล้วเติมสารละลาย 10% bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กวนต่อไปอีก 1 ชั่วโมง นำสารแขวนลอยไปปั่นเพื่อตกตะกอน gold labeled IgG ที่ความเร็ว 9,000 รอบ/นาที นาน 40 นาที ละลายตะกอนด้วยบัฟเฟอร์ (passive gold diluent buffer) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร วัดความเข้มข้นของ gold labeled IgG ที่ O.D. 540 ให้มีค่าเท่ากับ 0.48-0.5 ทำการเติม sucrose ในอัตรา 20 เปอร์เซ็นต์ เขย่าเบาๆให้ละลายจนหมด ทำการเตรียม Conjugate Release pad (CRP) ด้วยการพ่นปริมาณ Gold labeling IgG ของ LYSV ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ในปริมาณ 2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำ CRP ของ Gold labeling IgG ของ LYSV มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x1.5 เซนติเมตร เก็บในสภาพแห้งที่มีความชื้นไม่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปประกอบเป็น dipstick



ภาพที่ 1 อนุภาคทองขนาด 40 นาโนเมตร และการเตรียม Gold conjugated IgG

4. การเตรียม test line

เตรียมแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยพ่น LYSV-IgG (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นแถบทดสอบ (test line)



ภาพที่ 2 สเปรย์ LYSV-IgG (ความเข้มข้น 1 มก.ต่อมล.) ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร (เส้น test line) และสเปรย์ goat anti-rabbit IgG หรือ GAR (SIGMA Co.) เจือจางอัตรา 1:3 เท่า ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร (เส้น control line) ด้วยหัวสเปรย์ Bio jet

5. การเตรียม control line

พ่น goat anti-rabbit IgG หรือ GAR (SIGMA Co.) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:3 เท่า ที่ตำแหน่งถัดจากแถบทดสอบขึ้นไปประมาณ 0.5 เซนติเมตร ในอัตรา 1.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร สำหรับใช้เป็นแถบควบคุม (control line) นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปอบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (สุรกี และคณะ, 2547)



ภาพที่ 3 สเปรย์ Gold labeling IgG ของ LYSV ลงบนแผ่น Conjugate Release pad (CRP) ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ด้วยหัวสเปรย์ Air jet

6. การทดสอบคัดเลือกชนิดของเมมเบรนที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาของ LYSV บนเส้น test line

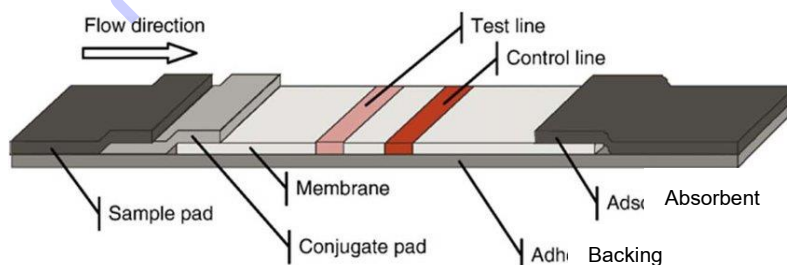
ได้ทดลองใช้แผ่น nitrocellulose membrane (NCM) 3 ชนิด ได้แก่ AE 98 Fast, AE 99 และ AE 100 ใช้เครื่องพ่นสารละลายควบคุมปริมาณ ทำการพ่น IgG ของ Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 ปริมาณ 1.0 ไมโครลิตร/ไมโครลิตร/เซนติเมตร เป็นเส้น control line ใช้ IgG ของ LYSV พ่นเป็น test line ในปริมาณ 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ตามลำดับ ลงบนแผ่นเมมเบรน โดยเส้นทั้ง 2 มีระยะห่างกัน 0.5 เซนติเมตร และจัดให้อยู่กึ่งกลางของแผ่น NCM ที่มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร นำแผ่นที่พ่น IgG แล้วไปอบที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบ (เส้น control line เป็นเส้นที่มีไว้ตรวจสอบการไหลของสารละลายทั้งหมดในชุดตรวจสอบว่ามีความสมบูรณ์ โดยปรากฏเป็นเส้นสีแดงเกิดจากปฏิกิริยาของ GAR กับ IgG ที่ผลิตมาจากกระต่ายและติดสลาگونูภาคทอง)

7. การเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ในการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

ทดลองใช้บัฟเฟอร์ ที่แตกต่างกัน 7 ชนิด บดตัวอย่างพืช คือ PBS pH 7.4, PBS-T pH 7.4, TBS pH 7.4, TBS-T pH 7.4, extraction buffer 1 pH 8.6, extraction buffer 2 pH 7.5, general extraction buffer pH 7.4 (Agdia)

8. การประกอบและตรวจสอบ

นำ NCM บน Plastic Backing polyester ที่อบแห้งแล้ว มาลอกกระดาษปิดกาออก วางแผ่น Conjugate Release pad (CRP) ที่เป็น fiber glass ที่มี Gold labeled IgG และอบแห้งแล้วเกย ด้านล่างให้เกยทับแผ่น NCM 1 มิลลิเมตร ปิดทับ Conjugate Release pad ด้วย แผ่นรองรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) ที่เป็น fiber glass โดยให้เกยแผ่น CRP ประมาณ 1 มิลลิเมตร ปิดลงไปจนถึงปลายของแผ่น Backing พอดี วางแผ่นซับน้ำอย่างหนา (Wicking paper) เกยทับไว้ด้านบนของแผ่น nitrocellulose membrane (NCM) ประมาณ 1 มิลลิเมตร ทาบไปจนสุดปลายด้านบนของ Backing ตัดออกเป็น strip ด้วยเครื่องตัดแบบอัตโนมัติ ให้มีความกว้าง 0.4 เซนติเมตร และเก็บไว้ในถุงอลูมิเนียมฟอล์ยที่อุณหภูมิห้องและแห้ง



ภาพที่ 4 ประกอบและตรวจสอบ lateral flow test strip (Eric *et al.*, 2020)



ภาพที่ 5 เครื่องตัดแบบอัตโนมัติ Bio dot ตัดให้มี strip มีความกว้าง 0.4 เซนติเมตร

9. การทดสอบประสิทธิภาพของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ LYSV

ทำการทดสอบประสิทธิภาพความไว (sensitivity) ของ Lateral flow test strip ในการตรวจสอบเชื้อ LYSV โดยบดใบกระเทียมที่เป็นโรคในบัพเฟอร์สำหรับบดตัวอย่าง (grinding buffer ประกอบด้วย คือ PBS pH 7.4, PBS-T pH 7.4, TBS pH 7.4, TBS-T pH 7.4, extraction buffer 1 pH 8.6, extraction buffer 2 pH 7.5, general extraction buffer pH 7.4 (Agdia)) เจือจางน้ำคั้นของใบกระเทียมที่เป็นโรคด้วย บัพเฟอร์ เริ่มจาก 1:10, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1,600 จนถึง 1:3,200 เท่า รวม 7 ระดับความเจือจาง นำ Lateral flow test strip มาจุ่มตรวจสอบ อ่านผลของปฏิกิริยาใน 3-5 นาที

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2563 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2564

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ

ผลการทดลองและอภิปราย (Results and Discussion)

กิจกรรมที่ 2 การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2564)

การทดลองที่ 2.1 การพัฒนาชุดตรวจสอบ Immuno Strip เพื่อตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* สาเหตุโรคน้ำดำของคะน้า (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2562)

1. การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลิน

1.1 การเตรียมแอนติบอดีให้บริสุทธิ์

การเตรียม IgG บริสุทธิ์จากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ Xcc โดยใช้แอนติซีรัมครั้งที่ 5 ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและทำ dialysis แล้ว นำสารละลาย IgG ที่ได้จากการทำ dialysis มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ (ตารางที่ 1) ปรับความเข้มข้นของ IgG ให้มีค่า O.D. เท่ากับ 1.4 เพื่อให้มีปริมาณโปรตีน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก่อนนำไป conjugate กับ Colloidal gold

1.2 การทดสอบหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์

จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของอิมมูโนโกลบูลินด้วยวิธี indirect ELISA โดยเจือจางอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ เริ่มจาก 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนถึง 90 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่าอิมมูโนโกลบูลินบริสุทธิ์ที่เจือจาง 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรได้ มีค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร เท่ากับ 1.405 โดยไม่มีปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ

1.3 การทดสอบคุณภาพของอิมมูโนโกลบูลินโดยวิธี Dot immunobinding assay (DIBA)

อิมมูโนโกลบูลินทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นตัวอย่างใบคะน้าที่มีอาการโรคน้ำดำ และแบคทีเรีย Xcc ความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งให้ผลของปฏิกิริยาเป็นสีม่วง และพบว่าอิมมูโนโกลบูลินไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบคะน้าปกติ เมื่อเจือจางที่ 1:500

2. การพัฒนาชุดตรวจ Immuno strip

2.1 การติดฉลากแอนติบอดีด้วยอนุภาคทอง (Gold conjugated IgG)

สารละลาย Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร แสดงการเกิดปฏิกิริยาชัดเจนบน test line และ control line มีสีม่วงคมชัด จึงเป็นความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad (CRP) สำหรับการพัฒนาชุดตรวจอิมมูโนสตริปสำหรับตรวจแบคทีเรีย Xcc

2.2 การหาความเข้มข้นของอนุภาคทองที่เหมาะสมในการระบายลงบน Conjugate release pad

เมื่อนำสารละลาย Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร มาเจือจางแบบ 2 เท่า อีก 2 ความเจือจางคือ 1:2 และ 1:4 แล้วนำไประบายลงบนแผ่น CRP จากผลการทดลองพบว่า Gold conjugated IgG ที่มีค่า O.D. เท่ากับ 0.5 ที่ช่วงคลื่นแสง 540 นาโนเมตร จะเกิดปฏิกิริยา

เป็นสีม่วงชัดเจนบน test line และ control line ในขณะที่ Gold conjugated IgG ที่ทำการเจือจาง 1:2 และ 1:4 จะเกิดปฏิกิริยาสีชมพูอ่อนข้างชัดเจนบน test line แต่จะเกิด ปฏิกิริยาเป็นสีชมพูอ่อนไม่ชัดเจนบน control line

2.3 การเตรียมแผ่น conjugate release pad (CRP)

นำแผ่น CRP ตัดให้มีขนาด กว้างประมาณ 0.8-1.0 เซนติเมตร ยาวประมาณ 15-18 เซนติเมตร ใช้ ฟุ้งกันเบอร์ 0 จุ่ม gold conjugated IgG ป้ายลงบนแผ่น CRP ตรงกึ่งกลางแผ่น โดยใช้ Gold conjugated IgG ประมาณ 90 ไมโครลิตร / 15 เซนติเมตร อัตรา 5 ไมโครลิตร / เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้แผ่น CRP พร้อมนำไปประกอบเป็นชุดตรวจสอบ Immuno strip

2.4 การทำเส้น test line และ control line

ใช้แผ่นไนโตรเซลลูโลส (NCM) วัสดุที่ใช้เป็น S&S-AE 99 size 8 ไมโครโมลาร์ มีความกว้าง 2.5 เซนติเมตร ตัดให้มีความยาว 18 เซนติเมตร ตามขนาดของ backing pad ใช้ดินสอทำเครื่องหมายด้านบนแผ่น และเครื่องหมายตำแหน่งเส้น control line ที่จะอยู่ห่างจากริมบนของแผ่น NCM 1 เซนติเมตร และเส้น test line อยู่ถัดลงมาจากเส้น control line 0.5 เซนติเมตร ใช้ปากกาหมึกซึม (ขนาด 0.5-0.7 มิลลิเมตร) จุ่ม Anti-rabbit IgG ที่อัตราความเข้มข้น 1:3 จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ใช้ไม้บรรทัด วางให้เป็นแนวเส้นตรง ตะปากกาแล้วลากเส้นจากด้านซ้ายไปทางขวาเพียงเบาๆ เป็นเส้น control line และใช้ปากกาหมึกซึมด้ามใหม่ จุ่มซับ IgG (เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) จำนวน 40 ไมโครลิตร/แผ่น ปฏิบัติเช่นเดียวกับทำเส้น control line เป็นเส้น test line นำไปอบแห้ง 2 ชั่วโมงที่ 37 องศาเซลเซียส

2.5 การประกอบเป็นชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

วางแผ่นเมมเบรนที่มี test line และ control line ลงในช่องที่กำหนดบนแผ่นพลาสติกการรองรับพื้น (plastic backing polyester) ที่มีขนาด 6x18 เซนติเมตร วางแผ่น CRP ให้เกยทับแผ่น

เมมเบรนประมาณ 1-2 มิลลิเมตร วางแผ่นใยแก้วรับตัวอย่างน้ำคั้นพืช (sample pad) เกยทับ CRP 1-2 มิลลิเมตร และวางแผ่นกระดาษซับชนิดหนา (wicking paper) เกยทับด้านบนของแผ่นเมมเบรน 1-2 มิลลิเมตร ตัดชุดที่ประกอบเสร็จแล้วออกเป็นเส้นที่มีความกว้างเท่ากับ 0.4 เซนติเมตร การเก็บชุดตรวจไว้ใน ระยะยาวต้องเก็บในถุงอลูมิเนียมฟอยด์ ที่ปิดสนิทเพื่อป้องกันความชื้น

3. การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.1 ทดสอบความไว (sensitivity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.1.1 ทดสอบความไวในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์

จากการทดสอบความไวของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป โดยการเจือจางสารละลายเชื้อ แบคทีเรีย Xcc ในสารละลายบัฟเฟอร์ ครึ่งละ 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 และ 10^1 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจเชื้อปริมาณต่ำสุดที่ 10^4

หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย Xcc บริสุทธิ์ที่ผสมในน้ำคั้นใบคะน้าปกติให้มีความเข้มข้น 10^8 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางแบบ 10 เท่าเหมือนข้างต้น พบว่าสามารถตรวจเชื้อปริมาณต่ำสุดที่ 10^4 หน่วยโคโลนีต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกัน

3.1.2 ทดสอบความไวในการตรวจตัวอย่างใบคะน้าที่เป็นโรค

ทำการเจือจางน้ำคั้นใบคะน้าที่แสดงอาการของโรคเน่าดำแบบ 10 เท่า โดยมีน้ำคั้นใบคะน้าปกติเป็น negative control พบว่าชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสามารถตรวจพบเชื้อได้ในน้ำคั้นพืชที่แสดงอาการของโรคที่เจือจาง 1: 2,000

3.2 การทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป

3.2.1 ทดสอบความจำเพาะกับเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปที่พัฒนาขึ้นให้ผลการทดสอบเป็นลบกับเชื้อแบคทีเรีย

E. carotovora subsp. *carotovora*, *Pantoea* sp., และเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบบนผิวใบคะน้าที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน

3.2.2 ทดสอบความจำเพาะกับตัวอย่างคะน้า

เมื่อนำตัวอย่างคะน้าที่มีลักษณะอาการต่างๆ มาทดสอบกับชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริป พบว่ามีเฉพาะอาการโรคเน่าดำที่เกิดจากเชื้อ Xcc เท่านั้นที่ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปเกิดปฏิกิริยาเป็นบวก เมื่อเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาที่ได้จากคั้นใบคะน้าที่มีลักษณะอาการต่างๆ และใบคะน้าปกติ

การทดลองที่ 2.2 การผลิตแอนติบอดีของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ในระบบเซลล์แบคทีเรีย (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2562)

1. ผลการเก็บตัวอย่างพืช

ตัวอย่างแดงโมจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น โดยเก็บส่วนต่าง ๆ ของพืชที่แสดงอาการจุดเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำและไหม้ตายเป็นสีน้ำตาลสีดำบริเวณยอด ใบ กิ่งก้าน และขั้วผล (ภาพที่ 1A-C) ผิวผลระยะเริ่มแรกแสดงอาการเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำเป็นจุดนูนใส ผิวผลสีไม่สม่ำเสมอลักษณะต่างเหลือง ต่อมาจุดเนื้อเยื่อเป็นแผลไหม้ดำลึกเข้าเนื้อผลขยายติดกันจนเป็นแผลขนาดใหญ่ และแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้มหรือสีขาวกระจายทั่วผล (ภาพที่ 2A-D) ซึ่งลักษณะอาการโรคที่พบจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น คล้ายกับอาการโรคจากเชื้อไวรัส WSMoV เข้าทำลาย (กาญจนา และคณะ, 2558) จึงนำมาตรวจยืนยันเชื้อสาเหตุในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค RT-PCR ก่อนใช้ทดลองต่อไป

2. ผลการสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) เชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR

นำตัวอย่างแดงโมส่วน ยอด ใบ กิ่งก้าน ขั้วผล และผิวผล ที่เก็บจากแปลงปลูกเกษตรกร จ. ขอนแก่น มาสกัดชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป FavorPreptm Total RNA Mini kit (FAVOGEN) ได้สารละลายอาร์เอ็นเอมาสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) เชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยคู่ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3/ WSMoV-N-R3 เมื่อตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า ทุก

ส่วนของพีซีที่ใช้ทดสอบสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดที่ประมาณ 800 bp ซึ่งเป็นส่วนของ Nucleocapsid gene (N gene/CP gene) ของเชื้อไวรัส WSMoV เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder (ภาพที่ 3) ดังนั้น คู่ไพรเมอร์ WSMoV-N-F3/ WSMoV-N-R3 ที่ออกแบบสำหรับการทดลองครั้งนี้สามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV ได้

3. ผลการเพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่บริเวณ 5' และบริเวณ 3' ได้แก่ *Pst*I (5'-CTGCA↓G-3' 3'-G↑ACGTC-5') และ *Eco*RI (5'-G↓AATTC-3' 3'-CTTAA↑G-5') ตามลำดับ และเพิ่มตำแหน่ง stop codon (TAA) บริเวณ 3' จำนวน 1 คู่ (ตารางที่ 1) สำหรับใช้เป็นส่วนประกอบปฏิกิริยาการสังเคราะห์ WSMoV-CP gene adapter ด้วยเทคนิค PCR ทำการตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1,100 bp เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

4. ผลตัดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและโคลนยีนเข้า Expression vector

ตัดชิ้นยีน WSMoV-CP adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I และ *Eco*RI แบบ Double digestion ทำการเชื่อมต่อดำเนินการด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase โคลนยีนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 คัดเลือกด้วยเทคนิค colony PCR โดยคู่ไพรเมอร์ pBAD-F/pBAD-R พบว่า โคลนแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของยีน WSMoV-CP gene/6xHisTag จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ ~ 950 เบส เมื่อเทียบกับโคลนแบคทีเรียปกติที่ได้รับเฉพาะพลาสมิด Expression vector จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 300 เบส (ภาพที่ 4) ซึ่งเป็นขนาดของลำดับเบสบางส่วนของ pBAD/HisA expression vector เมื่อส่งวิเคราะห์หาลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่ FIRST BASE LABORATORIES SDN BHD ประเทศมาเลเซีย พบว่า WSMoV-CP gene/6xHisTag มีจำนวน 954 นิวคลีโอไทด์ และพบลำดับเบสทั้ง start codon (ATG) และ stop codon (TAA) เมื่อตรวจตำแหน่ง frame shift ของการแปลรหัสลำดับแอมิโนพบการจัดเรียง กรดแอมิโนได้ถูกต้องจำนวน 318 เรซิดิวส์ และพบตำแหน่งแอมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) เพื่อประโยชน์สำหรับการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.)

5. ผลการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

เลี้ยงแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 ที่มีพลาสมิดสายผสม WSMoV-CP gene/6xHisTag/pBAD-HisA expression vector (fusion protein) เหนี่ยวนำโปรตีนลูกผสมให้แสดงออกด้วยสารละลาย 20% L-(+)-Arabinose จำนวน 2 เท่า ในสารแขวนลอยเซลล์แบคทีเรียที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลินเข้มข้น 50 ไมโครกรัมในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ทดสอบการสกัดโปรตีนด้วยวิธี Native condition และ denature condition และวิเคราะห์การแสดงออกโปรตีนลูกผสมด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า การสกัดโปรตีนลูกผสมแบบ denature condition ได้ผลผลิตโปรตีนออกมาได้มากกว่าแบบ Native condition จากนั้นเก็บส่วนน้ำใส (supernatant) จากการสกัดโปรตีนลูกผสมแบบ denature

condition ทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ProBond™ Nickel-Chelating Purification System แบบวิธี affinity column chromatography หลังจากวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบ fusion protein ที่ขนาดประมาณ 36 กิโลดาลตัน (โปรตีน WSMoV-CP-Protein ขนาดประมาณ 31 กิโลดาลตัน และโปรตีน pBAD/HisA-6xHisTag ขนาดประมาณ 5 กิโลดาลตัน) แต่มีปริมาณน้อยเนื่องจากมีโปรตีนอื่น ๆ ปนเปื้อนค่อนข้างมาก และวัดความเข้มข้นของ fusion protein ด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Multiskan™ Go, Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ได้ความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเพียง 0.244 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยทั่วไปความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการฉีดกระจายเพื่อแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 0.3 – 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร [300 – 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร] สำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองให้ผลิตแอนติบอดีต่อ Coat protein ของเชื้อไวรัส WSMoV

6. ผลการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและการตรวจเชื้อไวรัส WSMoV

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ WSMoV โดยใช้ recombinant WSMoV coat protein ฉีดเข้าสู่กระต่ายบริเวณกล้ามเนื้อ (immunized muscular) แล้วทำการเก็บแอนติซีรัมทั้งหมด 5 ครั้ง ปริมาณรวม 50 มิลลิลิตร จากการตรวจหาค่าไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่เก็บมาทั้งหมด 5 ครั้ง ด้วยเทคนิค indirect ELISA พบว่ามีค่าไตเตอร์สูงสุด 16,384 เท่า เมื่อนำแอนติบอดีมาตรวจสอบความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส โดยใช้ตรวจตัวอย่างแดงโม ส่วนยอด ใบ กิ่งก้าน ข้าวผล และผิวผล จากจังหวัดขอนแก่น ที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัส WSMoV พบว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีสามารถตรวจเชื้อไวรัส WSMoV ได้ แต่พบที่เกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับตัวอย่างแดงโมปกติค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดตรวจแบบ DAS-ELISA Kit ยี่ห้อ Agdia (ตารางที่ 2) ดังนั้นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ในครั้งนี้จึงยังไม่มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับแอนติบอดีที่มีจำหน่ายเพื่อการค้าเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างพืชปกติซึ่งอาจทำให้มีการแปลผลการตรวจผิดพลาดได้ หากผู้ทดสอบไม่คุ้นเคยกับเชื้อไวรัส WSMoV หรือเพื่อลดการการปฏิกิริยากับตัวอย่างพืชปกติอาจมีความจำเป็นต้องการเจือจางแอนติบอดีกับตัวอย่างพืชปกติ (cross-absorption) ก่อนนำไปใช้

Table 1 Primers for WSMoV-CP adapter synthesis (WSMoV-CP-F3 (PstI)/WSMoV-CP-F3 (EcoRI)

Primer Name	Primer Sequences 5' → 3'	bp	Tm °C	Product Size (bp)
WSMoV-CP-F3 (PstI)	GAG AT <u>CTGCAG</u> C ATG TCT AAC GTT AAG CAG CTT	33	72-73	~ 950
WSMoV-CP-F3 (EcoRI)	TGC TTA <u>GAATTC</u> C TTA CAC TTC CAA GGA AGT GCT	34		

Table 2 Efficiency of Polyclonal Antibody Ab-WSMoV-CP Against WSMoV Viruses in Watermelon Samples with Indirect ELISA Technique

Samples	Ab-WSMoV-CP ^{/1}	Ab-WSMoV ^{/2}
Shoots	1.460 ^{/3}	3.056
Leaves	1.384	2.871
Vines	0.673	2.521
Rinds	0.442	1.643
WSMoV samples (Agdia®) (positive control)	1.803	3.299
Buffer (negative control)	0.138	0.018
Healthy watermelon (negative control)	0.364	0.103

Note

^{/1} means: an antibody produced using a recombinant WSMoV coat protein in this experiment

^{/2} means: WSMoV antibody purchased from Agdia® Inc.

^{/3} means: Absorbance (optical density) at 405 nm

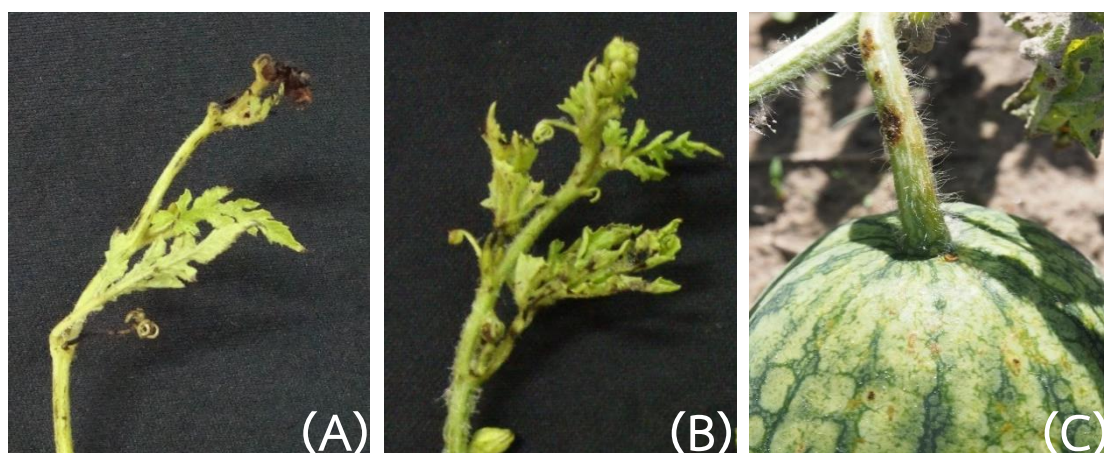


Figure 1 Watermelon infected by WSMoV (A-C) showed water-soaked, black necrotic patches on shoots, leaves, vines, tendrils tissues



Figure 2 Watermelon fruit exhibited water-soaked transparent raised spot and uneven yellow mosaic rind (A-B), Necrotic spots coalesced and turned into dark brown or white spots

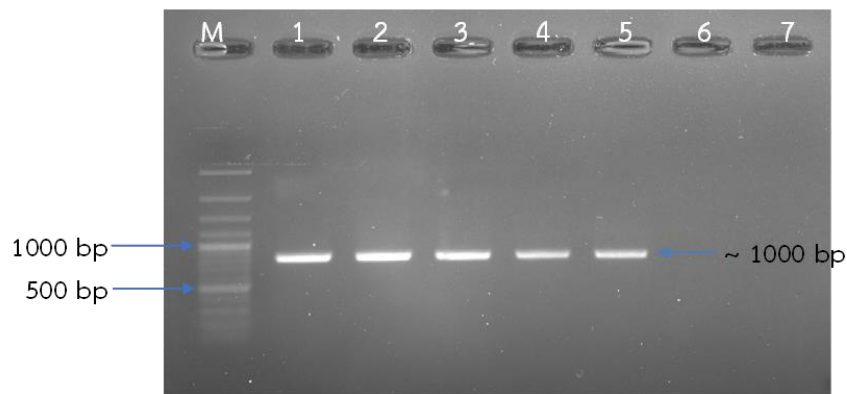


Figure 3 Gel electrophoresis of RT-PCR products of WSMoV N gene using WSMoV-N-F3/ WSMoV-N-R3 primers

M = 100 bps DNA ladder (fermentas®) 1 = infected watermelon shoots
 2 = infected watermelon leaves 3 = infected watermelon vines
 4 = infected watermelon tendrils 5 = infected watermelon rinds
 6 = healthy watermelon (negative control) 7 = dH₂O (negative control)

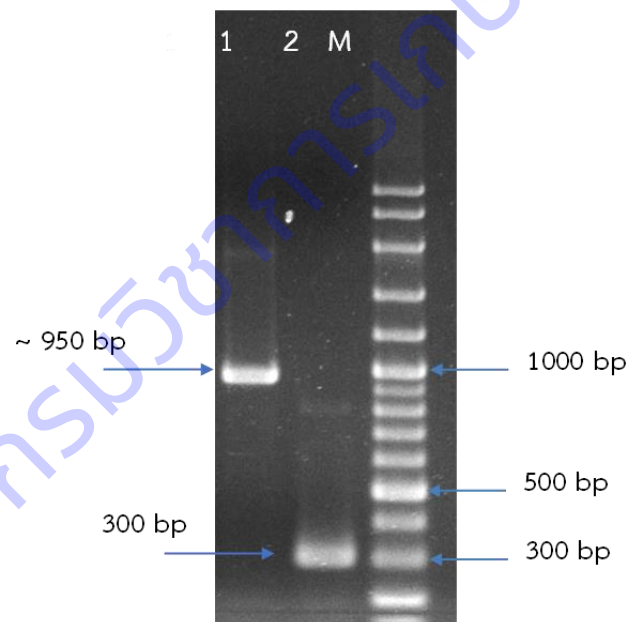


Figure 4 Gel electrophoresis of WSMoV-CP gene/6xHisTag plasmid using pBad-F / pBad-R primers by colony PCR

M = 1 kb DNA Ladder (fermentas®)
 1 = pBad/HisA Expression vector inserted with WSMoV-CP gene/6xHisTag ~ 950 bp
 2 = pBad/HisA Expression vector without WSMoV-CP gene/6xHisTag ~ 300 bp

การทดลองที่ 2.3 การตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous and Gruyter ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2562)

การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana*

1. สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ รา *P. citriasiana*

สืบค้นข้อมูลของราในสกุล *Phyllosticta* และ รา *P. citriasiana* ได้แก่ รายละเอียดของเชื้อ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา

รายละเอียดของรา *Phyllosticta* ดังนี้

Scientific name	<i>Phyllosticta</i>
Kingdom	Fungi
Division	Ascomycota
Class	Dothideomycetes
Subclass	Incertae sedis
Order	Botryosphaerales
Family	Botryosphaeriaceae
Genus	<i>Phyllosticta</i>
Perfect state	<i>Guignardia</i>

ราสกุลนี้เจริญอยู่บนใบพืชทำให้เกิดโรคใบจุดกับพืชหลายชนิด โดยราสร้าง pycnidia บนใบพืชและที่ผล conidia มี 1 เซลล์ นอกจากอยู่บนใบพืชแล้วรายังเจริญอยู่บนกิ่ง ลำต้น ของพืชด้วย และที่สำคัญรานี้เป็นสาเหตุของโรคจุดดำหรือ Citrus Black Spot ของพืชตระกูลส้มสาเหตุเกิดจาก *Guignardia citricarpa* (anamorphic state: *Phyllosticta citricarpa*) (Kiely, 1949; Sutton and Waterston, 1966) ราสกุล *Phyllosticta* เป็นสาเหตุโรคพืชแล้วยังเป็นราเอ็นโดไฟท์ซึ่งเป็นสกุลเด่นที่พบเจริญอยู่ในพืชแทบทุกชนิด โดยเฉพาะโรคจุดดำของส้ม ซึ่งมีสาเหตุเกิดจาก มักพบรา *P. capitalensis* (Teleomorph state: *G. mangiferae*) เจริญอยู่ในผลส้มด้วยแต่ไม่แสดงลักษณะอาการ (Glienke-Blanco et al., 2002; Baayen et al., 2002) เช่นเดียวกับโรคจุดน้ำตาล (Tan spot) ของส้มโอ สาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citriasiana* (Figure 1) ก็พบรา *P. capitalensis* เจริญอยู่ด้วย และเมื่อทำการแยกเชื้อก็มักพบราทั้งสองชนิดนี้ รา *P. citriasiana* เป็นราที่พบในประเทศจีน เวียดนาม และ ไทย จากรายงาน ไม่พบราชนิดนี้ในสหภาพยุโรปและสหรัฐอเมริกา (Wang et al., 2012; Wikee et al., 2011; Wulandari et al., 2009) แต่ในขณะเดียวกันมีรายงานพบรา *Phyllosticta citribrazillensis* C. Glienke & Crous ที่แยกได้จากแผล necrotic spots บนผลส้มโอในประเทศบราซิล ดังนั้นการส่งออกส้มโอไปประเทศเหล่านี้และการนำเข้าส้มมาจากประเทศบราซิลจะต้องมีมาตรการในการควบคุมการระบาดของโรค นอกจากนั้นโรค Black rot ขององุ่น สาเหตุเกิดจาก *Guignardia bidwelli* (anamorphic state: *Phyllosticta ampellicida*) (Sivanesan and Holliday, 1981) โรคใบจุดของกล้วยสาเหตุเกิดจาก *Guignardia musae* (anamorphic state: *Phyllosticta musarumi*)

(Punithalingam and Holliday, 1975) โรคผลเน่าของฝรั่ง สาเหตุเกิดจาก *Guignardia psidii* (anamorphic state: *Phyllosticta psidiicola*) (Gonzlez and Rondn, 2005) เป็นต้น

2. รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta*

2.1 รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราในสกุล *Phyllosticta* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และฐานข้อมูลนานาชาติ

รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราใน genus *Phyllosticta* ที่แยกได้จากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและจาก Culture Collection ได้ทั้งหมด 10 ไอโซเลต (DOA 009, 010, 011, 018, 019 058, 040, 088, 090 และ 201) (Table 1) ของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช และนำมาเลี้ยงเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร V-8 agar เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ

รวบรวมข้อมูลรหัสพันธุกรรมของราสกุล *Phyllosticta* จากฐานข้อมูลนานาชาติ ของรา *Phyllosticta* จาก Wikee et al., 2013 (Table 2) โดยจะศึกษาลำดับเบสเพื่อหาความแตกต่างที่เฉพาะเจาะจงต่อ *Phyllosticta citriasiana* บนตำแหน่ง ITS

2.1.1. เก็บและรวบรวมตัวอย่างโรคพืชที่เกิดจากราใน genus *Phyllosticta*

เก็บตัวอย่างโรคพืชมาแยกเชื้อสาเหตุ ดังนี้ ที่เกิดจาก *Phyllosticta* มาแยกเชื้อ

1. โรคจุดน้ำตาล (tan spot) ของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม จาก อำเภอปากพ่อง จังหวัดนครศรีธรรมราช มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้รา 2 ไอโซเลต จำแนกเชื้อราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของราบนอาหาร PDA จำแนกชนิดเป็นราในสกุล *Phyllosticta* ทั้ง 2 ไอโซเลต พบว่าราสร้างสปอร์ในระยะ anamorph state ทั้ง 2 ไอโซเลต และเก็บตัวอย่างส้มโอโรคจุดน้ำตาล จากอำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงราย มาแยกเชื้อและจำแนกชนิดได้รา *Phyllosticta citriasiana* (Figure 2)

2. โรคผลจุดดำของผลฝรั่ง มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้ราสกุล *Phyllosticta* 1 ไอโซเลต

3. อาการใบจุดของใบวาสนา มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้ราสกุล *Phyllosticta* 1 ไอโซเลต

4. อาการใบจุดของส้มโอ จังหวัดนครปฐม มาแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ ได้ราสกุล *Phyllosticta* จำนวน 2 ไอโซเลต (จากวัดไร่ขิง อำเภอสสามพราน จังหวัดนครปฐม และอำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม) (Figure 3)

5. อาการใบจุดส้มโอ อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 4 ไอโซเลต

6. ใบจุดกล้วยไม้ อำเภอเมือง จังหวัดยะลา

2.1.2 แยกราให้บริสุทธิ์

แยกราจากข้อ 2.1.1 บริสุทธิ์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

2.1.3 จำแนกชนิดของรา *Phyllosticta*

จากตัวอย่างโรคจุดน้ำตาลของส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม โรคผลจุดดำของฝรั่ง อาการใบจุดของใบวาสนา อาการใบจุดส้มโอ อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ และใบจุดกล้วยไม้ อำเภอเมือง จังหวัดยะลา ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์และจำแนกชนิดเป็นรา *Phyllosticta* spp. ทั้งหมด

2.1.4 สกัดดีเอ็นเอของรา *Phyllosticta* (DNA extraction)

จากตัวอย่างราที่ แยกได้จากตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากราในสกุล *Phyllosticta* และจาก Culture Collection ของกลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

2.1.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.1.6 การตรวจสอบปฏิกิริยา PCR

2.1.7 การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์

โดยเลี้ยงรา *Phyllosticta* จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ *Phyllosticta mangifera-indica* (018) แยกได้จากมะม่วง *Phyllosticta* sp (040) แยกได้จากขนุน *P. captitalensis* (058) แยกได้จากต้นวาสนา *P. captitalensis* (201) แยกได้จากทับทิม *Phyllosticta* sp (118) แยกได้จากกล้วยไม้ *Dendrobium* และ *Phyllosticta* sp (121) แยกได้จากฝรั่ง และแยกได้จากกล้วย 2 ไอโซเลต (Table 1) และสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของรา *Phyllosticta* spp. จำนวน 10 ไอโซเลต โดยใช้ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 และส่ง Sequencing จากนั้นทำการวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และจัดเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบชุดข้อมูลเพื่อทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการจำแนก และวิเคราะห์หาตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อ *Phyllosticta citriasiana* เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไป

การวิเคราะห์ และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ และจัดเรียงลำดับของนิวคลีโอไทด์เพื่อเปรียบเทียบชุดข้อมูลเพื่อทำการวิเคราะห์เพื่อยืนยันการจำแนก และวิเคราะห์หาตำแหน่งที่มีความจำเพาะต่อ *Phyllosticta citriasiana* เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไป

ทำการออกแบบและได้คู่ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ เพื่อใช้ทดสอบความจำเพาะในการตรวจคัดเลือกรววิเคราะห์รา *Phyllosticta citriasiana* และทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับข้อมูลลำดับเบสของราในสกุล *Phyllosticta* ในฐานข้อมูล GenBank (Figure 4)

2.1.8 ทดสอบความจำเพาะและความสามารถของคู่ไพรเมอร์ในการตรวจจำรา *P. citriasiana* จากตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่างโดยปฏิกิริยา PCR

ดำเนินการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบในการทดลองนี้ต่อรา *Phyllosticta* spp. จำนวน 6 เส้น คือ PcDOAF1, PcDOAR1, PcDOAF2, PcDOAR2, PcDOAF3 และ PcDOAR3 พบว่าไพรเมอร์ PcDOAF1 และ PcDOAF2 จำเพาะต่อ *P. citriasiana* เพียงชนิดเดียว แต่ PcDOAF3 สามารถ align ได้ทั้งรา *P. citriasiana* และ *P. citrimaxima* (Figure 5) ทั้งนี้ reverse ไพรเมอร์ทั้ง 3 แบบ (PcDOAR1 PcDOAR2 และ PcDOAR3) มีความจำเพาะต่ำ ซึ่งสามารถ anneal กับ *Phyllosticta*

หลายชนิด ได้แก่ *P. citriasiana*, *P. citrimaxima*, *P. citricarpa*, *P. brazilianiae*, *P. citrichinaensis*, *P. citribrazilliensis* และ *P. brazilianiae*

ทำการ optimize ไพร์เมอร์จำนวน 8 คู่ ต่อรา *P. citriasiana* isolate M0086 ได้แก่ PcDOAF1/PcDOAR1, PcDOAF1/ITS4, PcDOAF2/PcDOAR2, PcDOAF2/ITS4, PcDOAF3/PcDOAR3, PcDOAF3/ITS4 (ออกแบบในการทดลองนี้), Pca8-F/ITS4 และ Pca9-F/ITS4 (ออกแบบโดย Wang et al., 2011) ได้ annealing temperature อยู่ระหว่างอุณหภูมิ 46-60 โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 56-60 องศาเซลเซียส (Figure 6)

ผลการทดสอบ primer จำนวน 8 คู่ ต่อ DNA ที่สกัดจาก culture ของ รา *Phyllosticta* ไอโซเลตต่างๆ ได้แก่ M0085, M0086, M0089, M0387, M0413, M0414 M0415 และ *Colletotrichum* sp. isolate M0301 พบว่า PcDOAF1/ITS4, PcDOAF3/PcDOAR3, PcDOAF3/ITS4, Pca8-F/ITS4 และ Pca9-F/ITS4 มีความจำเพาะต่อ *P. citriasiana* (Figure 7)

ผลการทดสอบไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4, PcDOAF3/ITS4, Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 ต่อ DNA ที่สกัดจากแผลจุดสีน้ำตาลที่ตัดจากเนื้อเยื่อผิวส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล พบว่าไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4, PcDOAF3/ITS4, Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 สามารถตรวจจับได้ (Figure 8)

ผลการทดสอบไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 ต่อ DNA ที่สกัดจากใบส้มโอที่มีระยะห่างจากแผลจุดสีน้ำตาลที่ระยะ 0 0.5 1 1.5 2 2.5 และ 3 เซนติเมตร (Figure 9) พบว่าเบื้องต้น ไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 สามารถตรวจจับรา *P. citriasiana* ได้ ในเนื้อเยื่อใบส้มโอที่มีระยะห่างจากแผลจุดสีน้ำตาลได้ห่างสุดประมาณ 1.5-3 เซนติเมตร (Figure 9)

ทำการทดสอบไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 กับตัวอย่างผลส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างผลปกติ ตัวอย่างใบส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างใบปกติ และกิ่งของส้มโอ โดยสกัดจากตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวจากผลส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างผลปกติ ตัวอย่างใบส้มโอที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาล ตัวอย่างใบปกติ และกิ่งของส้มโอ รวมจำนวน 138 ตัวอย่าง และดำเนินการทดลองไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 ต่อ DNA ที่สกัด พบว่าไพร์เมอร์ PcDOAF1/ITS4 สามารถตรวจจับรา *P. citriasiana* บนใบและผลที่แสดงอาการจุดสีน้ำตาลได้ แม้แผลจุดสีน้ำตาลจะอยู่ในระยะเริ่มต้นและยังไม่พบการสร้าง fruiting body (Figure 10A) และให้ผลการตรวจจับที่ชัดเจนขึ้นเมื่อแผลจุดสีน้ำตาลพบโครงสร้างของ fruiting body (Figure 10B)

ทั้งนี้ได้ทดสอบไพร์เมอร์กับตัวอย่างปกติที่ไม่แสดงอาการเพื่อยืนยันความประสิทธิภาพ ของไพร์เมอร์ที่ได้ ไม่พบหรือไม่แสดงผลบวกในการตรวจจับรา *P. citriasiana* บนตัวอย่างปกติใด ๆ ดังนั้นจากการทดลองนี้ ได้ไพร์เมอร์ที่มีประสิทธิภาพและจำเพาะต่อในการตรวจจับรา *P. citriasiana* จำนวน 3 คู่คือ PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ PcDOAR3 PcDOAF3/ITS4 รวมถึงไพร์เมอร์ Pca8/ITS4 และ Pca9/ITS4 ที่ออกแบบโดย Wang et al. (2012)

Table 1: List of *Phyllosticta* collected in this study

Isolate	<i>Phyllosticta</i>	Host	Location	Source
009	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Wiang Kaen, Chiang Rai	collection
010	<i>P. citriasiana</i>	<i>Citrus maxima</i>	Wiang Kaen, Chiang Rai	collection
011	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Wiang Kaen, Chiang Rai	collection
018	<i>P. mangifera-indica</i>	<i>Mangifera indica</i>	Chanthaburi	collection
019	<i>P. citriasiana</i>	<i>Citrus maxima</i>	Nakhon Pathom	collection
040	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	Bangkok	collection
058	<i>P. captitalensis</i>	<i>Dracaena goldieana</i>	Bangkok	collection
201	<i>P. captitalensis</i>	<i>Punica granatum</i>	Chiang Rai	collection
088	<i>P. citriasiana</i>	<i>Citrus maxima</i>	Chiang Dao, Chiang Mai	collection
090	<i>P. citriasiana</i>	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	collection
	<i>P. captitalensis</i>	<i>Dendrobium</i> sp.	Chiang Rai	collection
091	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	isolation
092	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	isolation
093	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	isolation
094	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Kasetsombun, Chaipayum	isolation
116	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Samparn, Nakhon Pathom	isolation
117	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Phutthamonthon, Nakhon Pathom	isolation
118	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Dendrobium</i> sp.	Sai Noi, Nonthaburi	isolation
119	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Phanang, Nakhon Sri Thammarat	isolation
120	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Citrus maxima</i>	Phanang, Nakhon Sri Thammarat	isolation
121	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Guava psidii</i>	Samparn, Nakhon Pathom	isolation
	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Dendrobium</i> sp.	Mae Tang, Chiang Mai	isolation
	<i>Phyllosticta</i> sp.	<i>Musa</i> sp.	Mae Tang, Chiang Mai	isolation

Table 2 *Phyllosticta* isolates from Wikee *et al.*, 2013

Species	Culture no. ¹	Host	Country	GenBank no. ²				
				ITS	LSU	TEF1	ACT	GPDH
	CPC 20258	<i>Ophiopogon japonicus</i>	Thailand	KC291339	KF206245	KC342559	KC342536	KF289094
	CPC 20259	<i>Orchidaceae</i>	Thailand	KC291340	KF206244	KC342560	KC342537	KF289104
	CPC 20263	<i>Magnoliaceae</i>	Thailand	KC291341	KF206241	KC342561	KC342538	KF289085
	CPC 20265	<i>Euphobiaceae</i>	Thailand	KF206194	KF206239	KF289182	KF289297	KF289105
	CPC 20266	<i>Polyscias</i> sp.	Thailand	KC291342	KF206238	KC342562	KC342539	KF289109
	CPC 20267	<i>Baccaurea ramiflora</i>	Thailand	KF206195	KF206237	KF289173	KF306233	KF289078
	CPC 20268	<i>Hibiscus syriacus</i>	Thailand	KC291343	KF206236	KC342563	KC342540	KF289117
	CPC 20269	<i>Ophiopogon japonicus</i>	Thailand	KC291344	KF206235	KC342564	KC342541	KF289118
	CPC 20270	<i>Tectona grandis</i>	Thailand	KC291345	KF206234	KC342565	KC342542	KF289110
	CPC 20271	<i>Crinum asiaticum</i>	Thailand	KF206196	KF206233	KF289183	KF289298	KF289106
	CPC 20272	<i>Orchidaceae</i>	Thailand	KC291346	KF206232	KC342566	KC342543	KF289079
	CPC 20274	<i>Mangifera indica</i>	Thailand	KF206197	KF206231	KF289188	KF289299	KF289119
	CPC 20275	<i>Polyalthia longifolia</i>	Thailand	KC291347	KF206230	KC342567	KC342544	KF289107
	CPC 20278	<i>Euphorbia milii</i>	Thailand	KC291348	KF206227	KC342568	KC342545	KF289113
	CPC 20423	<i>Philodendron</i> sp.	Thailand	KC291349	KF206226	KC342569	KC342546	KF289116
	CPC 20508	<i>Ixora chinensis</i>	Thailand	KF206198	KF206225	KF289185	KF289302	KF289111
	CPC 20509	<i>Cordyline fruticosa</i>	Thailand	KF206199	KF206224	KF289186	KF289303	KF289112
	CPC 20510	<i>Pyrosia adnascens</i>	Thailand	KF206200	KF206223	KF289174	KF289304	KF289080
	CPC 21035	<i>Citrus</i> sp.		KF206201	-	-	KF289305	-
	LGMF 219	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	KF206202	KF206220	JF261490	KF289306	JF343737
	LGMF 220	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	KF206203	KF206219	JF261488	KF289307	JF343735
	LGMF 222	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	KF206204	KF206218	JF261492	KF289308	JF343739
<i>P. citriasiana</i>	CBS 120486	<i>Citrus maxima</i>	Thailand	FJ538360	KF206314	FJ538418	FJ538476	JF343686
	CBS 120487	<i>Citrus maxima</i>	China	FJ538361	KF206313	FJ538419	FJ538477	JF343687
	CBS 120488	<i>Citrus maxima</i>	Thailand	JN692545	KF206312	JN692533	JN692521	KF289144
	CBS 123370	<i>Citrus maxima</i>	Vietnam	FJ538355	KF206310	FJ538413	FJ538471	JF343689
	CBS 123371	<i>Citrus maxima</i>	Vietnam	FJ538356	KF206309	FJ538414	FJ538472	JF343690
	CBS 123372	<i>Citrus maxima</i>	Vietnam	FJ538357	KF206308	FJ538415	FJ538473	KF289145
<i>P. citribraziliensis</i>	CBS 100098	<i>Citrus limon</i>	Brazil	FJ538352	KF206221	FJ538410	FJ538468	JF343691
	CPC 17464	<i>Citrus</i> sp.	Brazil	KF170300	KF206263	KF289224	KF289280	KF289159
	CPC 17465	<i>Citrus</i> sp.	Brazil	KF170301	KF206262	KF289225	KF289281	KF289160
	CPC 17466	<i>Citrus</i> sp.	Brazil	KF170302	KF206261	KF289226	KF289282	KF289161
<i>P. citricarpa</i>	CBS 102374	<i>Citrus aurantium</i>	Brazil	FJ538313	KF206324	GU349053	FJ538429	JF343679
	CBS 120489	<i>Citrus sinensis</i>	Brazil	FJ538315	KF206311	FJ538373	FJ538431	KF289150
	CBS 127454	<i>Citrus limon</i>	Australia	JF343583	KF206306	JF343604	JF343667	JF343771
	CBS 127452	<i>Citrus reticulata</i>	Australia	JF343581	KF206307	JF343602	KF289241	JF343769
	CBS 127455	<i>Citrus sinensis</i>	Australia	JF343584	KF206305	JF343605	JF343668	JF343772
	CBS 122482	<i>Citrus sinensis</i>	Zimbabwe	FJ538317	KF306230	FJ538375	KF289265	KF289146
	CPC 16586	<i>Citrus limon</i>	Argentina	KF170293	KF206274	KF289220	KF289269	KF289155
	CPC 16587	<i>Citrus limon</i>	Argentina	KF170294	KF206273	KF289219	KF289270	KF289154
	CPC 16603	<i>Citrus limon</i>	Uruguay	KF170295	KF206269	KF289213	KF289274	KF289147
	CPC 16604	<i>Citrus limon</i>	Uruguay	KF206191	-	-	KF289292	-
	CPC 16605	<i>Citrus limon</i>	Uruguay	KF170296	KF206268	KF289214	KF289275	KF289148
	CPC 16606	<i>Citrus limon</i>	Uruguay	KF170297	KF206267	KF289215	KF289276	KF289149
	CPC 16609	<i>Citrus</i> sp.	Argentina	KF170298	KF206266	KF289217	KF289277	KF289152
	CPC 16149	<i>Citrus</i> sp.	Argentina	KF170290	KF206277	KF289216	KF289266	KF289151
	CPC 16151	<i>Citrus</i> sp.	South Africa	KF170291	KF206276	KF289221	KF289267	KF289156
	CPC 16152	<i>Citrus</i> sp.	South Africa	KF170292	KF206275	KF289218	KF289268	KF289153
<i>P. citrichinaensis</i>	ZJUC 200956	<i>Citrus reticulata</i>	China	JN791620	-	JN791459	JN791533	-
	ZJUC 200964	<i>Citrus maxima</i>	China	JN791611	-	JN791461	JN791535	-

Table 2 *Phyllosticta* isolates from Wikee *et al.*, 2013 (Continued)

Species	Culture no. ¹	Host	Country	GenBank no. ²				
				ITS	LSU	TEF1	ACT	GPDH
	ZJUCC 2010150	<i>Citrus maxima</i>	China	JN791662	-	JN791514	JN791582	-
	ZJUCC 2010152	<i>Citrus sinensis</i>	China	JN791664	-	JN791515	JN791589	-
<i>P. citrimaxima</i>	CPC 20276 = MFLUCC10-0137 = CBS 136059	<i>Citrus maxima</i>	Thailand	KF170304	KF206229	KF289222	KF289300	KF289157
<i>P. concentrica</i>	CBS 937.70	<i>Hedera helix</i>	Italy	FJ538350	KF206291	FJ538408	KF289257	JF411745
	CBS 134749 = CPC 18842	<i>Hedera</i> sp.	Spain	KF170310	KF206256	KF289228	KF289288	KF289163
<i>P. cordylinophila</i>	CPC 21880 = MUCCJ 521	<i>Cordyline fruticosa</i>	Japan	AB454357	AB454357	-	AB704244	-
	CPC 20261 = MFLUCC10-0166 = WK024	<i>Cordyline fruticosa</i>	Thailand	KF170287	KF206242	KF289172	KF289295	KF289076
	CPC 20277 = MFLUCC12-0014 = WK048	<i>Cordyline fruticosa</i>	Thailand	KF170288	KF206228	KF289171	KF289301	KF289075
<i>P. cornicola</i>	CBS 111639	<i>Cornus florida</i>	USA	KF170307	-	-	KF289234	-
<i>P. cussonia</i>	CPC 13812	<i>Cussonia</i> sp.	South Africa	KF170311	KF206282	KF289223	KF289262	KF289158
	CPC 14873	<i>Cussonia</i> sp.	South Africa	JF343578	KF206279	JF343599	JF343662	JF343764
	CPC 14875	<i>Cussonia</i> sp.	South Africa	JF343579	KF206278	JF343600	JF343663	JF343765
<i>P. elongata</i>	CBS 126.22	<i>Oxycoccus macrocarpos</i>	USA	FJ538353	AB095508	FJ538411	FJ538469	KF289164
<i>P. ericarum</i>	CBS 125354 = CPC 19744	<i>Erica gracilis</i>	South Africa	KF206170	KF206253	KF289227	KF28291	KF289162
<i>P. eugeniae</i>	CBS 445.82	<i>Eugenia aromatica</i>	Indonesia	AY042926	KF206288	KF289208	KF289246	KF289139
<i>P. foliorum</i>	CBS 174.77	<i>Cryptomeria japonica</i>	USA	KF170308	KF206290	KF289200	KF289245	KF289131
	CBS 447.68	<i>Taxus baccata</i>	Netherlands	KF170309	KF206287	KF289201	KF289247	KF289132
<i>P. gaultheriae</i>	CBS 447.70	<i>Gaultheria humifusa</i>	USA	JN692543	KF206298	JN692531	KF289248	JN692508
<i>P. hamamelidis</i>	MUCC 149	<i>Hamamelis japonica</i>	Japan	KF170289	-	-	KF289309	-
<i>P. hostae</i>	CGMCC 3.14355	<i>Hosta plantaginea</i>	China	JN692535	-	JN692523	JN692511	JN692503
	CGMCC 3.14356	<i>Hosta plantaginea</i>	China	JN692536	-	JN692524	JN692512	JN692504
	CGMCC 3.14357	<i>Hosta plantaginea</i>	China	JN692537	-	JN692525	JN692513	JN692505
<i>P. hubeiensis</i>	CGMCC 3.14986	<i>Viburnum odoratissimum</i>	China	JX025037	-	JX025042	JX025032	JX025027
	CGMCC 3.14987	<i>Viburnum odoratissimum</i>	China	JX025038	-	JX025043	JX025033	JX025028
	CGMCC 3.14988	<i>Viburnum odoratissimum</i>	China	JX025039	-	JX025044	JX025034	JX025029
<i>P. hymenocallidicola</i>	CBS 131309	<i>Hymenocallis littoralis</i>	Australia	JQ044423	JQ044443	KF289211	KF289242	KF289142
	CPC 19331	<i>Hymenocallis littoralis</i>	Australia	KF170303	KF206254	KF289212	KF289290	KF289143
<i>P. hypoglossi</i>	CBS 101.72	<i>Ruscus aculeatus</i>	Italy	FJ538365	KF206326	FJ538423	FJ538481	JF343694
	CBS 167.85	<i>Ruscus hypoglossum</i>	Italy	FJ538366	KF206302	FJ538424	FJ538482	JF343696
	CBS 434.92	<i>Ruscus aculeatus</i>	Italy	FJ538367	KF206299	FJ538425	FJ538483	JF343695
<i>P. ilicis-aquifolii</i>	CGMCC 3.14358	<i>Ilex aquifolium</i>	China	JN692538	-	JN692526	JN692514	-
	CGMCC 3.14359	<i>Ilex aquifolium</i>	China	JN692539	-	JN692527	JN692515	-
	CGMCC 3.14360	<i>Ilex aquifolium</i>	China	JN692540	-	JN692528	JN692516	-
<i>P. leucothoicola</i>	MUCC 553 = CBS 136073	<i>Leucothoe catesbaei</i>	Japan	AB454370	AB454370	-	KF289310	-
<i>P. mangifera-indica</i>	CPC 20274 = MFLUCC10-0029	<i>Mangifera indica</i>	Thailand	KF170305	KF206240	KF289190	KF289296	KF289121
<i>P. minima</i>	CBS 585.84 = IFO 32917	<i>Acer rubrum</i>	USA	KF206176	KF206286	KF289204	KF289249	KF289135
<i>P. neopyrolae</i>	CPC 21879 = MUCC 125	<i>Pyrola asarifolia</i>	Japan	AB454318	AB454318	-	AB704233	-
<i>P. owaniana</i>	CBS 776.97 = CPC 1009	<i>Brabejum stellatifolium</i>	South Africa	FJ538368	KF206293	FJ538426	KF289254	JF343767
	CPC 14901	<i>Brabejum stellatifolium</i>	South Africa	JF261462	KF206303	JF261504	KF289243	JF343766
<i>P. pachysandricola</i>	MUCC 124 = NBRC 102276	<i>Pachysandra terminalis</i>	Japan	AB454317	AB454317	-	AB704232	-
<i>P. paxistimae</i>	CBS 112527	<i>Paxistima mysinites</i>	USA	KF206172	KF206320	KF289209	KF289239	KF289140
<i>P. philoprina</i>	CBS 587.69	<i>Ilex aquifolium</i>	Spain	KF154278	KF206297	KF289206	KF289250	KF289137
	CBS 616.72	<i>Ilex aquifolium</i>	Germany	KF154279	KF206296	KF289205	KF289251	KF289136
<i>P. podocarpicola</i>	CBS 728.79	<i>Podocarpus maki</i>	USA	KF206173	KF206295	KF289203	KF289252	KF289134

Table 2 *Phyllosticta* isolates from Wikee *et al.*, 2013 (Continued)

Species	Culture no. ¹	Host	Country	GenBank no. ²				
				ITS	LSU	TEF1	ACT	GPDH
<i>P. podocarpi</i>	CBS 111646	<i>Podocarpus falcatus</i>	South Africa	AF312013	KF206323	KC357671	KC357670	KF289169
	CBS 111647	<i>Podocarpus lanceolata</i>	South Africa	KF154276	KF206322	KF289232	KF289235	KF268168
<i>P. pseudotsugae</i>	CBS 111649	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	USA	KF154277	KF206321	KF289231	KF289236	KF289167
<i>P. raphiolepidis</i>	MUCC 432	<i>Raphiolepis indica</i>	Japan	DQ632660	-	DQ632724	AB704242	-
<i>P. rubra</i>	CBS 111635	<i>Acer rubrum</i>	USA	KF206171	EU754194	KF289198	KF289233	KF289129
<i>P. sphaeropsoides</i>	CBS 756.70 = IFO 32905	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Germany	AY042934	KF206294	KF289202	KF289253	KF289133
<i>P. spinarum</i>	CBS 292.90	<i>Chamaecyparis pisifera</i>	France	JF343585	KF206301	JF343606	JF343669	JF343773
<i>P. styracicola</i>	CGMCC 3.14985	<i>Styrax gradiflorus</i>	China	JX052040	-	JX025045	JX025035	JX025030
	CGMCC 3.14989	<i>Styrax gradiflorus</i>	China	JX052041	-	JX025046	JX025036	JX025031
<i>P. telopeae</i>	CBS 777.97	<i>Telopea speciosissima</i>	Tasmania	KF206205	KF206285	KF289210	KF289255	KF289141
<i>P. vaccinicola</i>	CPC 18590	<i>Vaccinium macrocarpum</i>	USA	KF170312	KF206257	KF289229	KF289287	KF289165
<i>P. yuccae</i>	CBS 112065	<i>Yucca elephantipes</i>	USA	KF206175	-	-	KF289237	-
<i>Phyllosticta</i> sp.	CPC 11336	<i>Eucalyptus globulus</i>	Spain	KF206177	KF206284	KF289199	KF289258	KF289130
	MUCC 147	<i>Rhododendron keiskei</i>	Japan	AB454319	AB454319	-	AB704234	-
	CPC 17454	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KF206206	KF206265	KF289192	KF289278	KF289123
	CPC 17455	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	KF206207	KF206264	KF289191	KF289279	KF289122

¹**CPC**: Culture collection of P.W. Crous, housed at CBS; IFO: Institute For Fermentation, Osaka, Japan; IMI: International Mycological Institute, CABI-Bioscience, Egham, Basingstoke, U.K.; LGMF: Culture collection of Laboratory of Genetics of Microorganisms, Federal University of Parana, Curitiba, Brazil; CBS: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, the Netherlands; ZJUCC: Zhejiang University Culture Collection, China; MFLUCC: Mae Fah Luang University Culture Collection; CGMCC: China, General Microbiological Culture Collection, Beijing, China; MUCC: Culture Collection, Laboratory of Plant Pathology, Mie University, Tsu, Mie prefecture, Japan. Type and ex-type cultures are in bold. ²**ITS**: Internal transcribed spacers 1 and 2 together with 5.8S nrDNA; LSU: large subunit 28S nrDNA; TEF1: partial translation elongation factor 1- α gene; ACT: partial actin gene; GPDH: partial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. (Wikee *et al.* 2013)

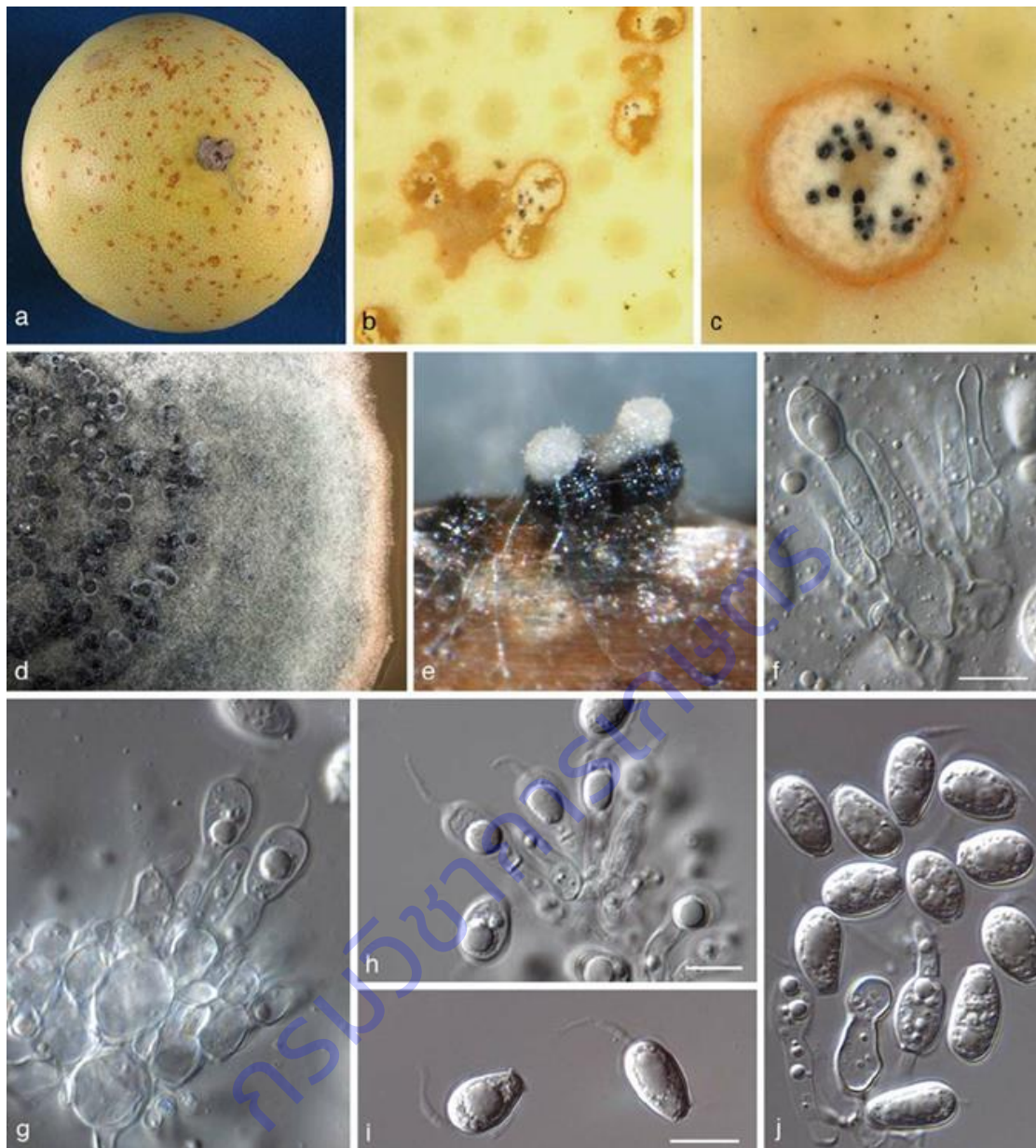


Figure 1 *Phyllosticta citriasiana*. (Photo by: Wulandari *et al.*, 2009)

a–c) Symptoms on fruit of *Citrus maxima*.

d) Colony on malt extract agar.

e) Pycnidia sporulating on sterile pine needles on tap-water agar. f–h)

Conidiogenous cells giving rise to solitary conidia.

i, j) Conidia with mucoid sheath and apical mucilaginous appendage visible. Scale

bars = 10 μ m

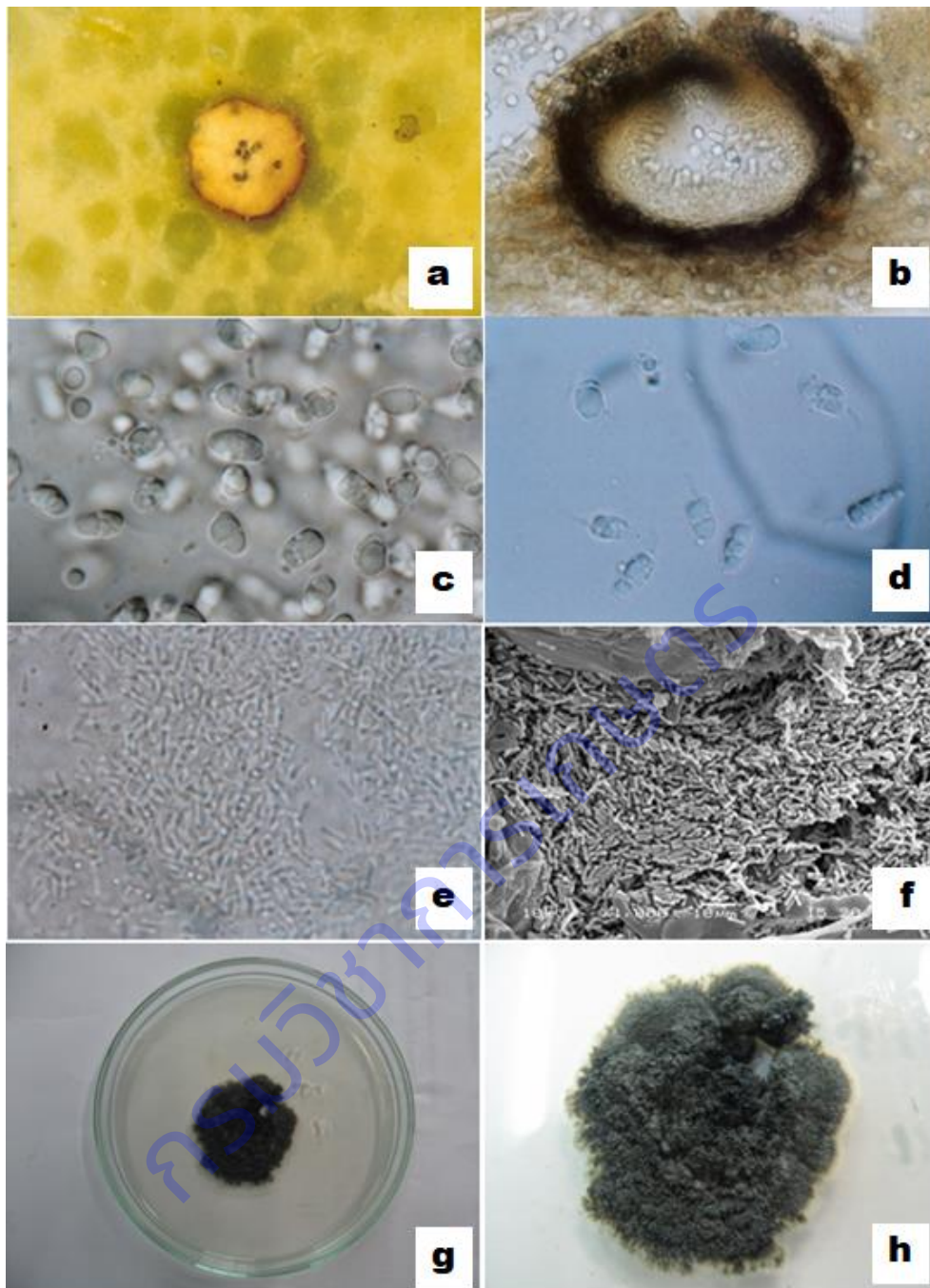


Figure 2 *Phyllosticta citriasiana* isolated from tan spot of Pummelo.

- a) Hard spot lesions with pycnidia in the center of the tissue
- b) Pycnidia (400X)
- c) Conidium (1000X)
- d) Conidium with mucoid sheath and apical mucilaginous appendag (1000X)
- e) Spermatial state, spermogonium 1000X
- f) SEM photomicrograph of spermatia 1000X
- g) Colony on PDA, 7 days at 30+2°C
- h) Colony with loab margin

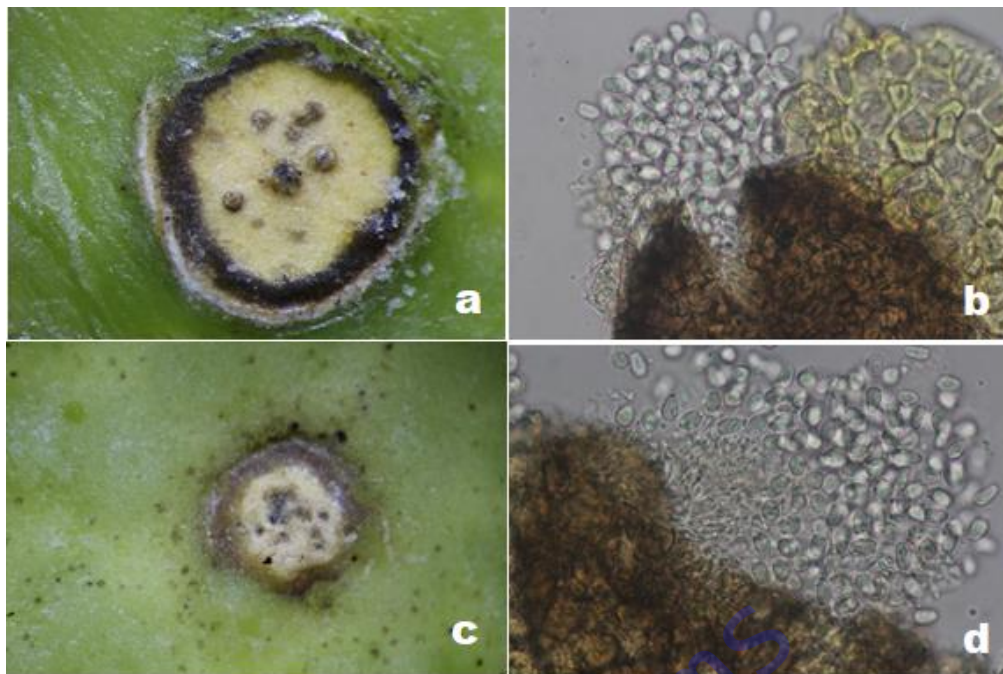


Figure 3 *Phyllosticta* sp. Isolated from fruit of pummelo at Nakhon Pathom province.

- a) Tan spot on pummelo fruit at Wae Rai-Khing, Nakhon Pathom province
- b) conidium
- c) Tan spot on pummelo fruit at Phutthamonthon, Nakhon Pathom province
- d) conidium

CBS120486_ *Phyllosticta_citriasiana* ITS region from TYPE material

TCGTAACAAGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATACGTAATCCTGAAAGGTAAT

GGAAGGGGAGGCCGTAAAAAGCCGCCAACCTACCTTCACACCCCTTGTGTATCTACCACGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTTTGACCCG
GGCGGTCCGTGCCCCAGCCTAGTTTATGGCCAGGACGCCTGGCTAAGTGCCCGCAGTATACAAAACCAAGCGATTATTTGTGTAGTCC
TGAGAATTCATTTAATGAAGTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA
ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCC
TCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGACGTCCGCTGCCGACGCGCCTGGAAGACCTCGGCGACGGCGTCTCAGCCTCGAGCGTAGTAGTAAAA
TATCTCGCTTTGGAGGAGGGAGGCGCTGGCCGCCGACAATCGACCTTCGGTCACTATTTTTCCAAGGTTGACCT

M0086 *Phyllosticta citriasiana*

GAGTAAAAGTCGTAACAAGTTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAAATACGTAATCCTGAAAGGTAATGGAAGGGGAGGCCG
TAAAAAGCCGCCAACCTACCTTCACACCCCTTGTGTATCTACCACGTTGCTTTGGCGGGCCGACCCGGTTTTGACCCGGGCGGTCCGTGCCC
CCAGCCTAGTTTATGGGCCAGGACGCCTGGCTAAGTGCCCGCAGTATACAAAACCAAGCGATTATTTGTGTAGTCTCGAGAATTCATTTA
ATGAAGTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAG
TGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCTGCTTG
GTATTGGGCGACGTCCGCTGCCGACGCGCCTGGAAGACCTCGGCGACGGCGTCTCAGCCTCGAGCGTAGTAGTAAAAATCTCGCTTTGGA
GGAGGGAGGCGCTGGCCGCCGACAATCGACCTTCGGTCACTATTTTTCCAAGGTTGACCTCGGATCAGG

Figure 4 Aligning sites of specific primers on ITS region of *Phyllosticta citriasiana*

1. MG956794_Phylosticta_citriasiانا_LSM1147	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
2. MG956793_Phylosticta_citriasiانا_LSM1146	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
3. KR025415_Phylosticta_citriasiانا_GZAAS6210	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
4. KF367453_Phylosticta_citriasiانا_HP201209_1	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
5. JN128951_Phylosticta_citriasiانا_P820_1	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
6. GU001816_Phylosticta_citriasiانا_GC200801	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
7. NR145217_Phylosticta_citriasiانا_CBS120486_TYPE	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
8. FJ538355_Phylosticta_citriasiانا_CBS123370	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
9. FJ538354_Phylosticta_citriasiانا_CBS120488	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
10. M0086_Phylosticta_citriasiانا_270_3_ITS	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
11. M0089_Phylosticta_citriasiانا_597_ITS	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
12. NR147343_Phylosticta_citriasiانا_CPC20276_TYPE	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
13. KF170304_Phylosticta_citriasiانا_CPC20276	AAGGTAATGGAA	GGGAGGCCGTA	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
14. NR144914_Phylosticta_capitalensis_CPC_18848_TYPE	AAGGTTCC	AGTAGGCCTCA	AA	CCGCCAA	TGACC
15. M0085_Phylosticta_capitalensis_009_ITS	AAGGTTCC	AGTAGGCCTCA	AA	CCGCCAA	TGACC
16. M0090_Phylosticta_capitalensis_598_ITS	AAGGTTCC	AGTAGGCCTCA	AA	CCGCCAA	TGACC
17. M0088_Phylosticta_272_ITS	AAGGTTCC	AGTAGGCCTCA	AA	CCGCCAA	TGACC
18. JF343583_Phylosticta_citricarpa_CBS_127454	AAGGTTTGGAA	GGGAGGCCCTT	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
19. JN791620_Phylosticta_citrichinaensis_ZJUCC200956	AAGGTTTGGAA	GGGAGGCCCTT	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
20. JF343583_Phylosticta_citricarpa_CBS_127454	AAGGTTTCC	AGTAGGCCTCA	AA	CCGCCAA	TGACC
21. JF343583_Phylosticta_citricarpa_CBS_127454	AAGGTTTGGAA	GGGAGGCCCTT	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
22. JF343572_Phylosticta_brazilianaie_LGMF330	AAGGTTTGGAA	GGGAGGCCCTT	AAAAAG	CCGCCAA	CTACC
1. MG956794_Phylosticta_citriasiانا_LSM1147	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
2. MG956793_Phylosticta_citriasiانا_LSM1146	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
3. KR025415_Phylosticta_citriasiانا_GZAAS6210	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
4. KF367453_Phylosticta_citriasiانا_HP201209_1	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
5. JN128951_Phylosticta_citriasiانا_P820_1	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
6. GU001816_Phylosticta_citriasiانا_GC200801	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
7. NR145217_Phylosticta_citriasiانا_CBS120486_TYPE	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
8. FJ538355_Phylosticta_citriasiانا_CBS123370	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
9. FJ538354_Phylosticta_citriasiانا_CBS120488	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
10. M0086_Phylosticta_citriasiانا_270_3_ITS	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
11. M0089_Phylosticta_citriasiانا_597_ITS	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
12. NR147343_Phylosticta_citriasiانا_CPC20276_TYPE	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
13. KF170304_Phylosticta_citriasiانا_CPC20276	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
14. JF343583_Phylosticta_citricarpa_CBS_127454	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
15. NR144914_Phylosticta_capitalensis_CPC_18848_TYPE	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
16. M0085_Phylosticta_capitalensis_009_ITS	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
17. M0090_Phylosticta_capitalensis_598_ITS	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
18. M0088_Phylosticta_272_ITS	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
19. JN791620_Phylosticta_citrichinaensis_ZJUCC200956	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
20. JF343583_Phylosticta_citricarpa_CBS_127454	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
21. JF343583_Phylosticta_citricarpa_CBS_127454	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC
22. JF343572_Phylosticta_brazilianaie_LGMF330	CCCGTAAAAAG	CCGCCAA	CCTACCTTC	ACACCC	TTGTGATC

Figure 5 The specificity of primers to *Phylosticta citriasiانا*

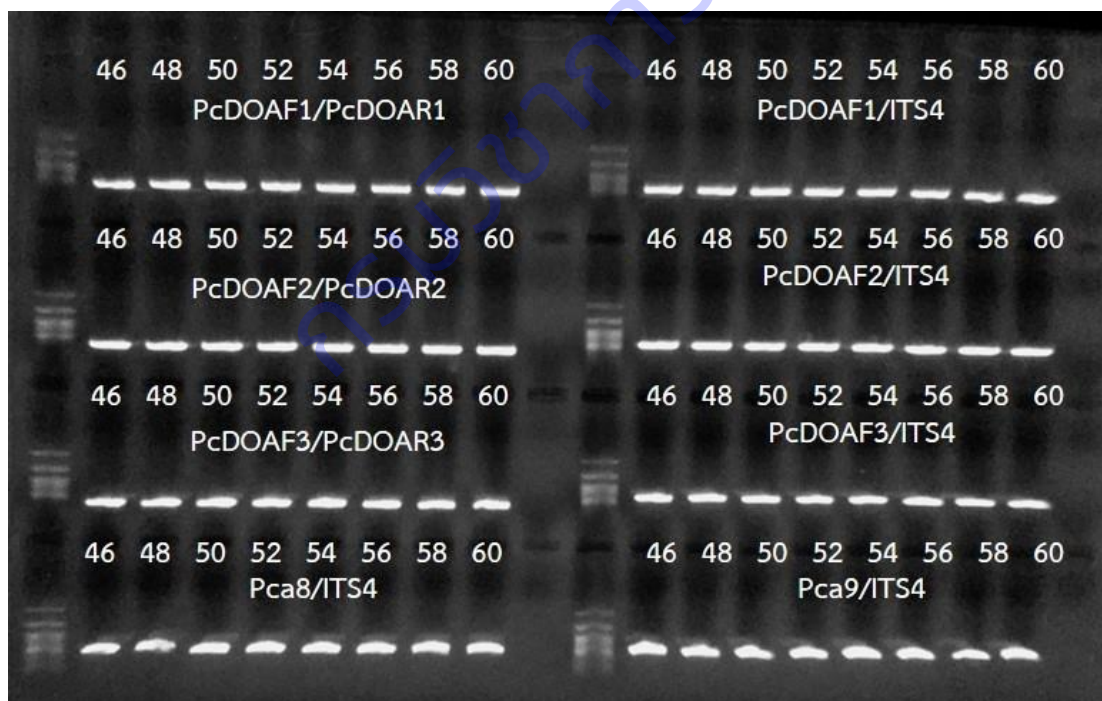


Figure 6 The PCR optimization of 8 pairs of primer

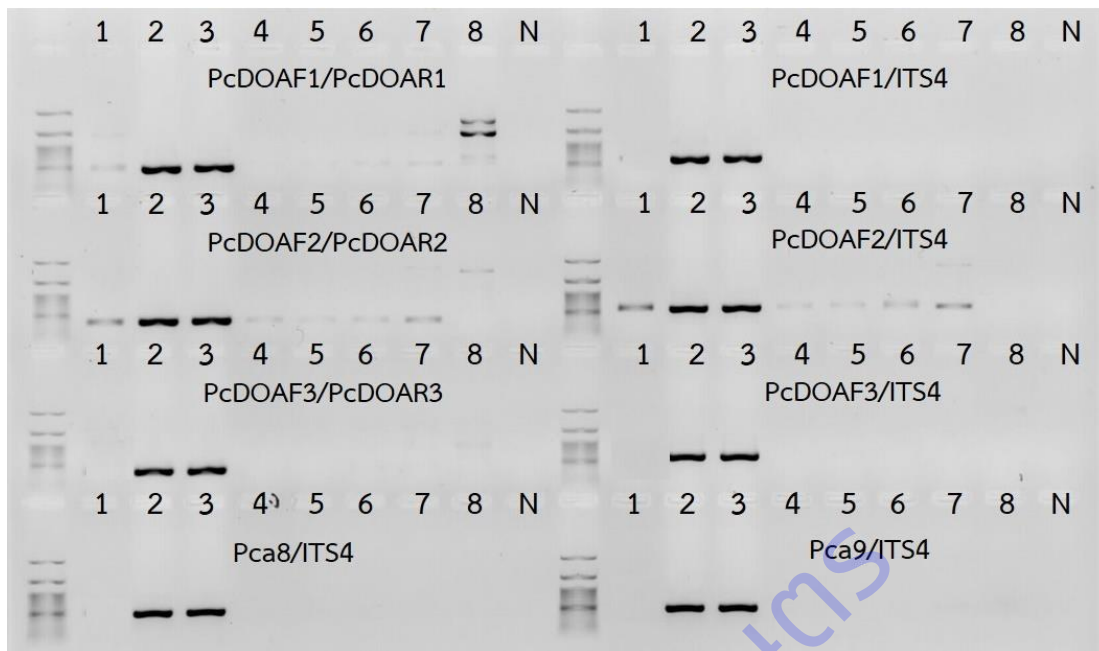


Figure 7 The specificities of primers to fungal taxa (1: *P. capitalensis*; 2-3: *P. citriasiana*; 4: *Phyllosticta* on *Punica granatum*; 5: *Phyllosticta* on guava; 6: *Phyllosticta* on *Dendrobium*; 7: *Phyllosticta* on *Musa* sp.; 8: *Colletotrichum*)



Figure 8 The specificity of primers to DNA of *P. citriasiana* obtained from brown spot symptom on Citrus fruits (1: No. 597/1-1; 2: No. 597/1-2; 3: No. 597/2-1; 4: No. 597/2-2; 5: No. 597/3-1; 6: No. 597/3-2; 7: No. 598-1; 8: No. 598-2)

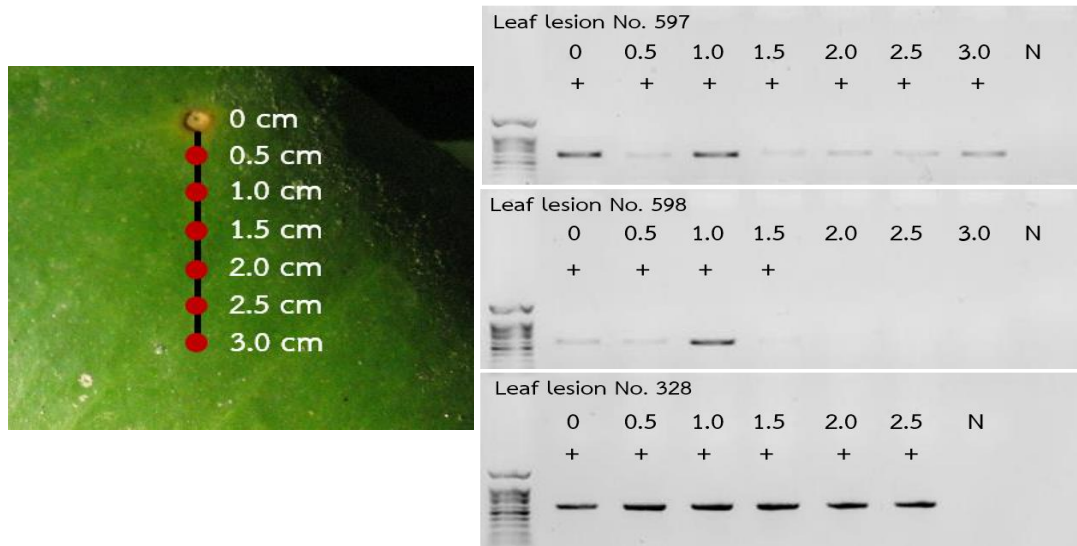


Figure 9 The sensitivity of PcDOAF1/ITS4 primers to *P. citriasiana* based on the difference of distances from original symptom

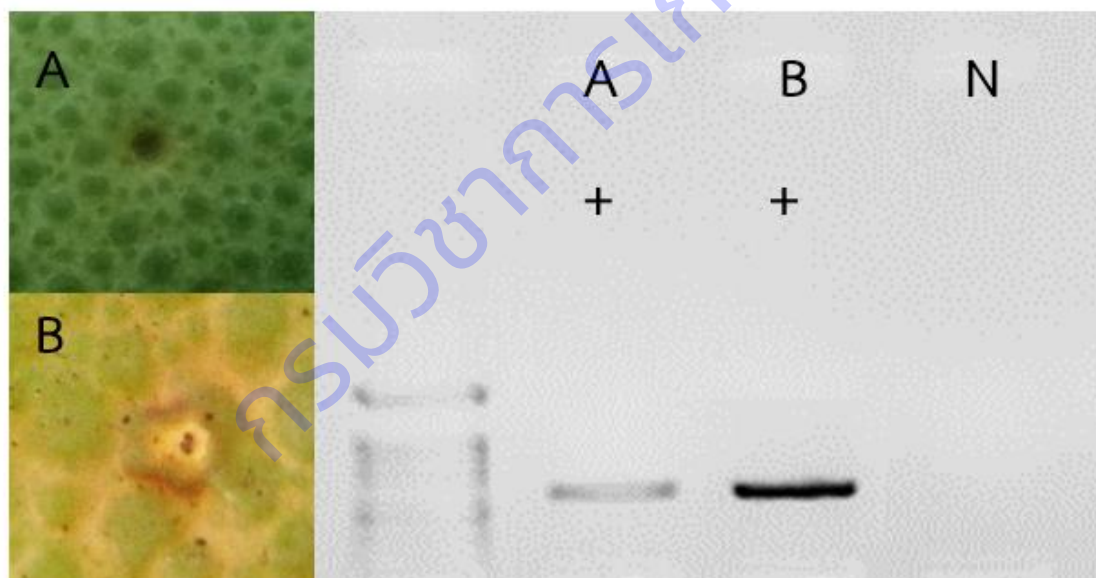


Figure 10 The specificity of primers PcDOAF1/ITS4 to DNA of *P. citriasiana* obtained from brown spot symptoms at different stages (A: initial stage, fruiting body of fungus absence; B: symptom with fruiting body of fungus)

การทดลองที่ 2.4 การตรวจหา immunodominant membrane protein genes (IMPs) ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วยเทคนิค PCR (ปีเริ่มต้น 2560 – สิ้นสุด 2561)

1. การสืบค้นข้อมูล

ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับ *imp* gene เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ซึ่งเป็นยีนชนิดหนึ่งของกลุ่ม immunodominant membrane protein genes (IDPs) สามารถตรวจพบใน cytoplasm พืชหลังถูกเชื้อไฟโตพลาสมาเข้าทำลาย ซึ่งกลุ่มยีน IDPs หลังแปลรหัสเป็นโปรตีนพบ 3 ชนิด คือ (1) immunodominant membrane protein (*Imp*) (Morton *et al.*, 2003); (2) immunodominant membrane protein A (*IdpA*) (Bloquist *et al.*, 2001); (3) antigenic membrane protein (*Amp*) (Kakizawa *et al.*, 2004)

2. ออกแบบไพรเมอร์

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากฐานข้อมูลที่มีอยู่ใน GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (ตารางที่ 1) นำมาออกแบบไพรเมอร์จำนวน 1 คู่ คือ IMP-F2/IMP-R2 primer ขนาดดีเอ็นเอประมาณ 1200 bp ซึ่งครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์ *imp* gene ครบทั้งยีน (ขนาดประมาณ 500 bp) ภาพที่ 1

3. ตัวอย่างพืชสำหรับใช้ทดสอบ

ได้ตัวอย่างกออ้อยที่แสดงอาการใบแคบสีขาว เรียวเล็กกว่าปกติ ต้นแคระแกร็น แตกหน่อเร็ว จากแปลงปลูกจังหวัดนครราชสีมา (ภาพที่ 2) มาปลูกไว้ในกระถางภายในโรงเรือนของกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อสำหรับทดสอบต่อไป

4. แยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป

ทำการสกัดดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยด้วย DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany) และนำมาตรวจความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 260/280 นาโนเมตร พบว่า ดีเอ็นเอมีความเข้มข้นเฉลี่ยประมาณ 100 ng/ul ซึ่งมากเพียงพอต่อการทดสอบด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR อยู่ที่ประมาณ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร (Sambrook and Russell, 2001)

5. ทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ผลการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไฟโตพลาสมาด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพรเมอร์ IMP-F2/IMP-R2 primer ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis พบแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดที่ประมาณ 1200 bp (ภาพที่ 3)

6. การโคลนยีนเป้าหมายเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy cloning vector

ได้เชื่อมต่อดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 1200 bp เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) และคัดเลือกดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสมด้วยเทคนิค colony PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ T7-F /SP6-R เมื่อตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า ได้แบคทีเรียที่รับชิ้นดีเอ็นเอทุกโคลนที่ทำการคัดเลือก และนำ 1 โคลนมาสกัดดีเอ็นเอพลาสมิดสายผสมด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPreP Plasmid Extraction Mini Kit

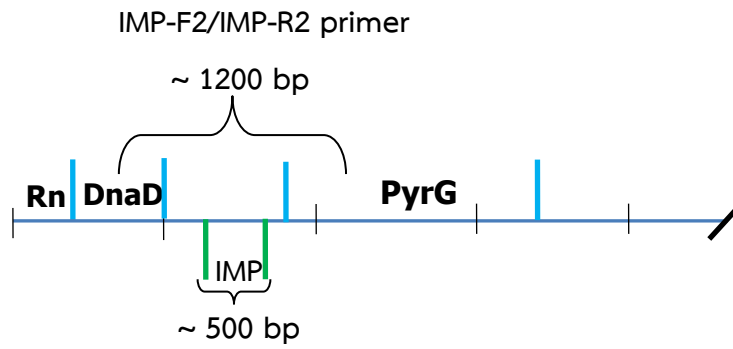
(FAVORGEN) ได้สารละลายดีเอ็นเอพลาสติดสายผสมแล้วนำส่งอ่านวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัทการค้า Macrogen ประเทศเกาหลี

7. เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนกับฐานข้อมูล GenBank

ได้ผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากคู่ไพรเมอร์ IMP-F2/IMP-R2 primer มีจำนวน 1,185 bp นำมาเปรียบเทียบชนิดยีนกับ *Candidatus Phytoplasma oryzae* (Accession No. AB469012) เนื่องจากอยู่กลุ่ม 16SrXI เหมือนกับ Sugarcane White Leaf (SWL) (ตารางที่ 1) จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยยีน 3 ชนิด ได้แก่ ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ partial DnaD gene จำนวน 204 bp พบส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่ยีนแทรกอยู่จำนวน 130 bp, ลำดับนิวคลีโอไทด์ immunodominant membrane protein (Full *imp* gene) มีจำนวน 492 bp พบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่ใช่ยีนแทรกจำนวน 92 bp และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ partial CTP synthase (partial *PyrG* gene) จำนวน 267 bp เมื่อนำ *imp* gene มาเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความคล้ายกัน (Identity) ด้วย Clustal Omega programs พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับอะมิโนอยู่ในระดับ 58.57 เปอร์เซ็นต์ 36.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งความคล้ายกัน (Identity) ของลำดับนิวคลีโอไทด์และอะมิโนอยู่ในระดับต่ำมากอาจเนื่องจาก ณ ปัจจุบัน ยังไม่มีข้อมูล *imp* gene ของไฟโตพลาสมาสเหตโรคใบขาวอ้อยในฐานข้อมูล GenBank

ตารางที่ 1 ฐานข้อมูลเชื้อไฟโตพลาสมาจาก GenBank เลือกสำหรับออกแบบไพรเมอร์ต่อ *imp* gene แหล่งที่มา : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Name	Acronym	Accession No.	Group (base on 16S rRNA)
Porcelain vine witches'-broom phytoplasma	PVWB	AB469011	16S-group, AY-sg
Onion yellows phytoplasma	OY-W	AB469007	16SrI-B
Mulberry dwarf phytoplasma	MD	AB469009	16SrI-B
Alfalfa witches'-broom phytoplasma	AlfWB-F	JQ745273	16SrII
Crotalaria witches'-broom phytoplasma	CrWB	JQ745279	16SrII
Tsuwabuki witches'-broom	TWB	AB469014	16SrIII
Korean potato witches'-broom phytoplasma	PWBK	AB469013	16SrVIII
<i>Candidatus Phytoplasma oryzae</i>	RYD	AB469012	16SrXI

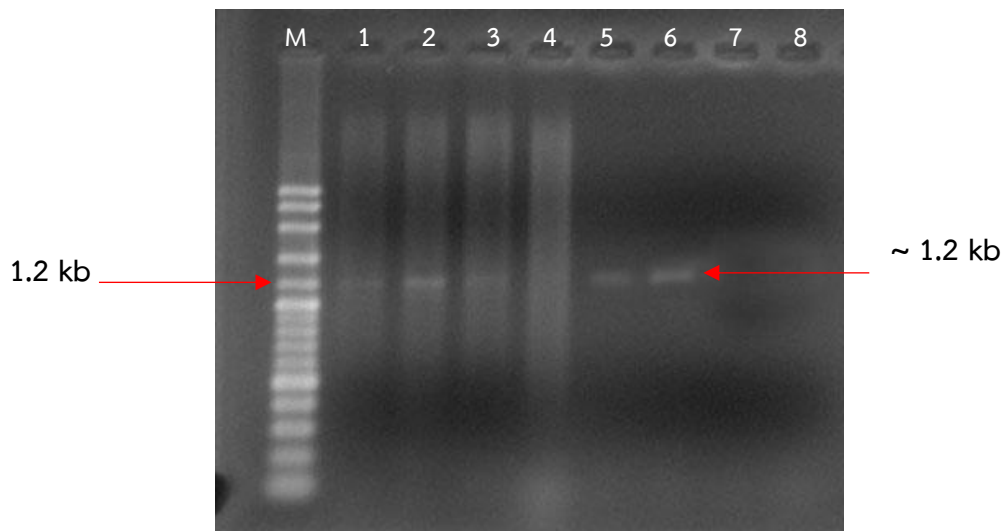


ภาพที่ 1 แผนภาพจำลองตำแหน่งการออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมลำดับนิวคลีโอไทด์ *imp* gene อ้างอิงจาก *Candidatus Phytoplasma oryzae*, Accession No. AB469012-RYD

หมายเหตุ กำหนด Scale 2 cm เท่ากับ 1.0 kb



ภาพที่ 2 อาการโรคอ้อยใบขาวสาเหตุจากเชื้อไฟโตพลาสมาจากแปลงปลูกอ้อย จ.นครราชสีมา



ภาพที่ 3 ผล Gel electrophoresis จากการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยจากคูเปอร์เมอร์

IMP-F2/IMP-R2 ด้วยเทคนิค PCR

M = 100 bps DNA Ladder (fermentas®)

ช่อง 1-4 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 bp ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย จากดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัด CTAB buffer

ช่อง 5-6 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1200 bp ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย จากดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัด DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

ช่อง 7 = ดีเอ็นเอจากอ้อยปกติ (Negative control)

ช่อง 8 = น้ำ (Negative control)

การทดลองที่ 2.5 การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (ปีเริ่มต้น 2561 - สิ้นสุด 2562)

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างกระเทียมจากแปลงปลูกของเกษตรกร

เก็บตัวอย่างใบกระเทียมที่มีอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีดๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบจากแปลงปลูกกระเทียมของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ฝาง อ.ไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่ ในเบื้องต้นได้ใช้ชุดตรวจสอบ POCY kit ของกล้วยไม้ทำการตรวจสอบตัวอย่างใบกระเทียมเนื่องจากเชื้อไวรัส LYSV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus ซึ่งผลการตรวจสอบพบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus กับตัวอย่างใบกระเทียม จึงได้นำตัวอย่างใบกระเทียมดังกล่าวมาทำศึกษาต่อไป

2. การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส BYMV จากฐานข้อมูล GenBank

การสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LYSV-CP gene โดยใช้ฐานข้อมูลของ GenBank : *Leek yellow stripe virus*, complete genome, NCBI Reference Sequence: NC_004011.1 ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ coat protein (NCBI Reference Sequence: NP_734102.1) ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 863 bp สามารถแปลรหัสได้กรดอะมิโนจำนวน 288 เรสิดิวส์ คือ

```
ageefdagaq anknqksgad kaieqrnpst sqasthgknd ssselsmgk dkdvvnvgttg
tfsvprikqi sqkgiaipmd gersilndh llhykpsqlc isntratrtrq fmawkarlqd
eygvtasems iilnglmvwc iengtspnin gvwtmmdgee qvefplrpv ehaqptlrqi
mahfsalaea yiemrnseqa ympryglqrn ltdmslarya fdfyevtsrt pvrareahaq
mkaaalnrs prlfgldgnv ttmededterh tahdvnarmh hldgahmq
```

ซึ่งเมื่อวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม ProtScale (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>) โปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32.18 KDa จากนั้นจึงสังเคราะห์โคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส LYSV-CP gene ที่ได้นั้นเข้าสู่ expression vector pET100/D-TOPO® (Invitrogen) โดยบริษัท Invitrogen

3. การชักนำการสังเคราะห์ recombinant protein ในเซลล์แบคทีเรีย และแยกโปรตีนของเชื้อ LYSV ให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column

การชักนำให้มีการสังเคราะห์ recombinant protein ด้วยการเติม IPTG: Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside เป็นเวลา 2 4 6 8 และ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์หาโปรตีนและขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าภายหลังจากการเติม IPTG 8 ชั่วโมง เซลล์แบคทีเรียสามารถสร้าง recombinant protein ได้ในปริมาณมาก จากการตรวจสอบขนาดโปรตีนหลังแยกให้บริสุทธิ์โดย Ni-NTA column ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าในแต่ละ fraction ที่ทำการเก็บทั้งหมด จาก fraction ที่ F1-F9 พบว่ามีปริมาณโปรตีนใน fraction ที่ F2-F9 ที่สามารถพบแถบ recombinant protein CP-LYSV ที่มีขนาดประมาณ 32 KDa และจาก recombinant protein ที่ได้นั้นมีความบริสุทธิ์และได้ปริมาณโปรตีนเพียงพอสำหรับการนำไปใช้เป็นแอนติเจนในการฉีดสัตว์ทดลองเพื่อสร้างแอนติบอดี เนื่องจากโปรตีน CP-LYSV เป็นโปรตีนที่กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันต่ำและเมื่อนำโปรตีน CP-LYSV ที่แยกได้บริสุทธิ์ไปฉีดเข้าสัตว์ทดลองจะทำให้ antigenic determinant ของโปรตีน CP-LYSV ยังคงเหมือนเดิม (Pillai *et al.*, 1995) นำโปรตีนที่ได้ไปเป็นแอนติเจนนั้นต้องทำการตรวจคำนวณหาปริมาณของโปรตีนก่อน โดยทำการตรวจสอบและเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ตามวิธีวัดปริมาณโปรตีนของ Bradford (1976) โดยนำโปรตีนบริสุทธิ์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin, Sigma (BSA) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน ตรวจสอบบน 15% SDS-PAGE และจากผลการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ได้พบว่า สารละลายโปรตีนที่ได้นั้นมีความเข้มข้นประมาณ 1.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำไปผสมกับ Freund's adjuvant ครั้งละ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

เพื่อใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้ากระต่ายเพื่อให้มีการสร้างแอนติบอดีและนำแอนติบอดีที่ได้ไปศึกษาทางด้านเซรุ่มวิทยาต่อไป

4. การผลิตแอนติซีรัมด้วยการฉีดกระต่ายและการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมที่ผลิตได้

ดำเนินการฉีดกระต่ายที่สะโพกจำนวน 5 ครั้ง เริ่มเก็บแอนติซีรัมที่ใบหูกระต่ายในสัปดาห์ที่ 2 หลังฉีดแอนติเจนจนครบ ทำการเก็บเลือด (เก็บเลือดครั้งละประมาณ 10-15 มิลลิลิตร) และนำเลือดที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วใช้เข็มกรีดตามขอบด้านในของปีกเกอร์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน หลังจากนั้นจึงนำไปแยกส่วนใสจากก้อนเลือด ปั่นเหวี่ยงที่ 6720xg นาน 10 นาที เพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดง เก็บส่วนใสที่เป็นแอนติซีรัมที่ได้แบ่งเก็บแช่ที่ -20°C และผสม 0.02% โซเดียมเอไซด์ เก็บที่ 4°C หลังจากที่ได้แอนติซีรัมมาแล้ว ทำการตรวจสอบไตเตอร์ของแอนติซีรัมที่ได้ด้วยวิธี indirect ELISA โดยใช้โปรตีน CP-LYSV ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่เจือจางระดับต่างๆ ตั้งแต่ 1:100-1:102400 พบว่า ค่าไตเตอร์จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 และ 5 สูงกว่าครั้งที่ 1, 2 และ 3 โดยครั้งที่ 4 มีค่าไตเตอร์ 1:6400 ซึ่งวัดค่าด้วยเครื่องอ่าน ELISA reader (Thermo Fisher Scientific: Version 1.00.40, Finland) ที่ A_{405} ได้ 1.373 และครั้งที่ 5 มีค่าไตเตอร์ 1:102400 ซึ่งวัดค่า ELISA ที่ A_{405} ได้ 1.078

การทดลองที่ 2.6 การตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum* ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2563)

1. ข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum*

ข้อมูลของราในสกุล *Neoscytalidium* และ รา *N. dimidiatum* ได้แก่ ลักษณะของเชื้อ ลักษณะอาการของโรค การเข้าทำลาย การแพร่ระบาด พืชอาศัย ความเสียหายจากการเข้าทำลายของรา การกำจัดจำแนกโดยข้อมูลพันธุกรรม

รายละเอียดของรา *Neoscytalidium* ดังนี้

Scientific name	<i>Neoscytalidium</i>
Kingdom	<i>Fungi</i>
Division	Ascomycota
Class	<i>Dothideomycetes</i>
Order	<i>Botryosphaerales</i>
Family	<i>Botryosphaeriaceae</i>
Genus	<i>Neoscytalidium</i>
Species	<i>N. dimidiatum</i>

พืชอาศัย

แก้วมังกร (*Hylocereus undatus*) มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta*) องุ่น (*Vitis vinifera*) มะรุมป่า (*Albizia lebbek*) หางนกยูงฝรั่ง (*Delonix regia*) มะเดื่อฝรั่ง (*Ficus carica*) มะเดื่อ หรือ ไทร (*Ficus spp.*) นนทรี (*Peltophorum petrocarpum*) โพทะเล (*Thespesia populena*) เบย์เบอร์รี่ (*Arbutus*) เกาลัด (*Castanea*) ส้ม (*Citrus*) วอลนัท (*Juglans*) กล้วย (*Musa*) มะม่วง (*Mangifera indica*) กลุ่ม *Prunus* ได้แก่ พลัม เชอร์รี่ ลูกท้อ เอพริคอต ซากุระ อัลมอนต์ *Populus Rhus* และ *Sequoiadendron*

ที่อยู่อาศัยและนิเวศวิทยาของรา

ราชนิดนี้พบในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน เช่น อเมริกาใต้ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ อินเดีย และแอฟริกาใต้ รวมทั้งเชื้อราชนิดนี้อยู่ในแอฟริกาตะวันตกและใต้ แแถบคาริเบียน และเอเชีย แต่ก็มีบางชนิดพบเจริญประเทศในเขตหนาวซึ่งอาจจะเป็นการแพร่กระจายมาจากประเทศเขตร้อน ราชนิดนี้พบในดินและไม้ที่สลายตัว

สาเหตุโรคพืชและลักษณะอาการ

Neoscytalidium dimidiatum เป็นราสาเหตุโรคพืชทำให้พืชมีอาการจุดคล้ายแคงเกอร์และอาการจุดบนลำต้นของพืช หรือบนผล รวมทั้งแผลเน่าดำในผล และแผลเน่าสีน้ำตาลในลำต้นของแก้วมังกร (Figure 1) มีรายงานในประเทศจีน มาเลเซีย เวียดนาม และประเทศไทย และยังมีรายงานเป็นโรคแคงเกอร์ที่ลำต้นขององุ่นในเมืองแคลิฟอร์เนียในประเทศสหรัฐอเมริกาด้วย

การเจริญเติบโตและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา

ราสร้างเส้นใยลักษณะรูปร่างเป็นคลื่นและไม่แน่นอน โคลนีเจริญเติบโตเร็ว เส้นใยฟูเจริญบนอาหารเส้นใยรวมกันเป็นก้อน เส้นใยเริ่มแรกมีสีอ่อนและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำและเปลี่ยนเป็นสีดำเมื่ออายุมากขึ้น สร้างสปอร์เรียกว่า arthroconidia (Figure 2) ภายในส่วนขยายพันธุ์เรียกว่า pycnidia มักพบทั้ง 2 ชนิด

การจำแนกชนิดด้วยข้อมูลพันธุกรรม

เลี้ยงรา *Neoscytalidium* บนอาหาร PDA สังเคราะห์ จำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้จาก แก้วมังกร (8 ไอโซเลท) มันสำปะหลัง (1 ไอโซเลท) และพญาไร้ใบ (1 ไอโซเลท) สกัดดีเอ็นเอของรา *Neoscytalidium* ทั้ง 10 ไอโซเลทๆ ละ 2 ตำแหน่ง ได้แก่ ITS และ TEF ส่ง sequencing จำนวน 40 reactions จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจัดทำ consensus sequences ของรา *Neoscytalidium* ทั้ง 10 ไอโซเลทๆ ละ 2 ตำแหน่ง เมื่อการวิเคราะห์ชนิดของราเปรียบเทียบกับชุดข้อมูลพื้นฐานข้อมูลต่าง ๆ และพบว่าเป็น รา *N. dimidiatum*

2. การออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการตรวจสอบรา *Neoscytalidium dimidiatum*

ออกแบบเครื่องหมายดีเอ็นเอ (ไพรเมอร์จำเพาะ) ด้วย Primer-BLAST และ Primer3 in Geneious Prime โดยใช้ตำแหน่ง Internal Transcribed Spacer (ITS) ได้ไพรเมอร์จำนวน 10 คู่ หรือ 20 เส้น และตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบต่อรา *N. dimidiatum* กับฐานข้อมูล ดังแสดง Table 1

3. การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะต่อราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria*

3.1 การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะเบื้องต้นที่มีต่อรา สกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria*

เมื่อตรวจสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์ที่มีต่อรา *Neoscytalidium* และ ราในวงศ์ *Botryosphaeria* พบว่า ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R มีความจำเพาะต่อ *N. dimidiatum* เท่านั้น (Figure 3 และ 4) และไพรเมอร์ NdDOA3F NdDOA6F และ NdDOA8F จำเพาะต่อ *N. dimidiatum* และ *N. novaehollandiae* (Figure 5 6 และ 7) NdDOA5R จำเพาะต่อ *N. dimidiatum*, *N. novaehollandiae* และ *N. orchidacearum* (Figure 8) ถึงแม้ว่า NdDOA4R จะจำเพาะต่อ *N. dimidiatum* แต่ก็สามารถตรวจจับรา *Botryosphaeria* อื่นๆ เช่น *Botryobambusa fusicoccum* และ *Neodeightonia subglobosa* ได้ (Figure 9) ส่วนไพรเมอร์ NdDOA1F NdDOA1R NdDOA2F NdDOA2R NdDOA4F NdDOA5F NdDOA8R NdDOA9 FNdDOA9R NdDOA10F และ NdDOA10R ไม่มีความจำเพาะ เนื่องจากสามารถตรวจจับราส่วนใหญ่ในวงศ์ *Botryosphaeria* (Figure 10 และ 11) เมื่อทำการตรวจสอบชนิดของราที่ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R สามารถตรวจจับได้ด้วยวิธี blastn พบว่า ไพรเมอร์ NdDOA7F และ NdDOA6R ตรงกับรา *N. dimidiatum* (syn. *N. hyalinum*) ที่ระดับ 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 12) ตรวจสอบความจำเพาะเบื้องต้นของไพรเมอร์พบว่าได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะจำนวน 5 เส้น และจับคู่ไพรเมอร์สำหรับการทดสอบได้จำนวน 5 คู่ ได้แก่ ITS5/NdDOA6R NdDOA6F/NdDOA6R NdDOA3F/ NdDOA6R NdDOA8F/NdDOA6R และ NdDOA7F/ITS4 ขนาดของ PCR product จะมีขนาดประมาณ 942 442 449 453 และ 88 bp (Table 2) เมื่อทดสอบการจับคู่ไพรเมอร์ โดยทดสอบกับ sequence ของ DNA template โดยการวิเคราะห์เบื้องต้นจาก primer map เพื่อพิจารณาคู่ไพรเมอร์ และขนาดของ PCR product (Figure 13) จากการทำ primer optimization พบว่า annealing temperature ที่เหมาะสมของทุกคู่ไพรเมอร์คือ 56 องศาเซลเซียส

3.2 การทดสอบไพรเมอร์จำเพาะต่อดีเอ็นเอของราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria*

ทดสอบไพรเมอร์จำเพาะกับดีเอ็นเอของราสกุล *Neoscytalidium* และรา *Botryosphaeria* ดังแสดงใน Table 3 และผลจากการทดสอบกับดีเอ็นเอพบว่าไพรเมอร์คู่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4 มีความจำเพาะเจาะจงต่อดีเอ็นเอของรา *N. dimidiatum* (Figure 14)

Table 1 List of specific primers designed from this study.

Primer code	Length (bp)	%GC	Tm	Taxa specificity
NdDOA1F	20	60	60.7	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA1R	20	60	60.7	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA2F	20	50	58.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA2R	20	55	58.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA3F	20	55	59.4	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
NdDOA3R	20	50	57.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA4F	20	50	57.6	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA4R	20	50	58.1	<i>N. dimidiatum</i> , <i>Botryobambusa fusicoccum</i> and <i>Neodeightonia subglobosa</i>
NdDOA5F	20	50	57.2	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA5R	20	55	58	<i>N. dimidiatum</i> , <i>N. novaehollandiae</i> and <i>N. orchidacearum</i>
NdDOA6F	20	55	59.9	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
NdDOA6R	20	55	60	<i>N. dimidiatum</i>
NdDOA7F	20	55	60	<i>N. dimidiatum</i>
NdDOA7R	20	50	60.1	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA8F	20	60	60	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
NdDOA8R	20	55	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA9F	20	55	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA9R	20	60	60.1	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA10F	20	60	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>
NdDOA10R	20	55	60	all <i>Neoscytalidium</i> , some <i>Botryosphaeria</i>

Table 2 List of primers for PCR.

Pair	Primer code	target size (bp)	Taxa specificity
1	ITS5	942	universal primer
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
2	NdDOA6F	442	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
3	NdDOA3F	449	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
4	NdDOA8F	453	<i>N. dimidiatum</i> and <i>N. novaehollandiae</i>
	NdDOA6R		<i>N. dimidiatum</i>
5	NdDOA7F	88	<i>N. dimidiatum</i>
	ITS4		universal primer

Table 3 The list of *Neoscytalidium* and *Botryosphaeria* DNA templates used in this study.

No.	Voucher	Taxa	Host
1	M0303	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Manihot esculenta</i>
2	M0305	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Euphorbia tirucalli</i>
3	M0330	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Hylocereus undatus</i>
4	M0352	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Hylocereus undatus</i>
5	M0566	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Hylocereus undatus</i>
6	M0567	<i>N. dimidiatum</i>	<i>Hylocereus undatus</i>
7	M0207	<i>Neodeightonia</i>	<i>Cocos nucifera</i>
8	M0484	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Citrus maxima</i>
9	M0514	<i>Colletotrichum</i>	Solanum
10	negative	-	-



Figure 1 The symptoms of brown spot or stem canker of *Hylocereus undatus*

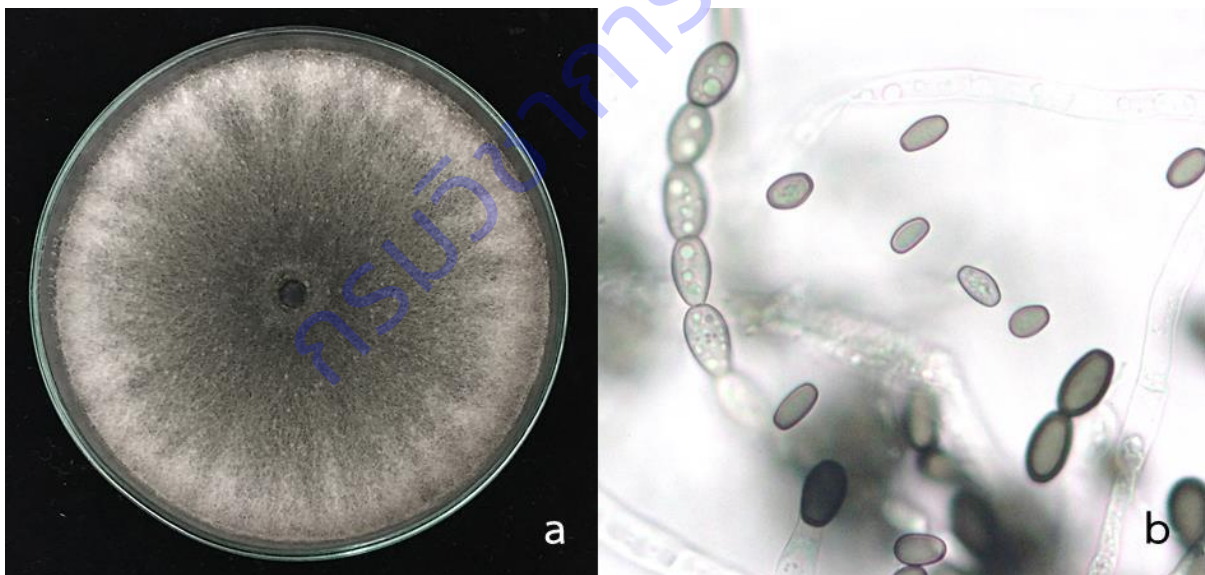


Figure 2 The colony and conidia of *Neoscytalidium dimidiatum*

a: colony of *N. dimidiatum* on PDA

b: arthroconidia (100X)

Species/Abbrv	Group Name	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	C	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
1. Neoscytalidium_orchidacearum_MFLUCC_12-0533	N. orchidacearum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	C	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
2. Neoscytalidium_novaeohollandiae_WAC13275	N. novaeohollandiae	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	C	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
3. Neoscytalidium_novaeohollandiae_WAC13273	N. novaeohollandiae	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	C	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
4. Neoscytalidium_novaeohollandiae_CBS122072	N. novaeohollandiae	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	C	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
5. Neoscytalidium_novaeohollandiae_CBS_122071	N. novaeohollandiae	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	C	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
6. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_145.78	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
7. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13305	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
8. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13302	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
9. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13287	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
10. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13282	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
11. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13277	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
12. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13274	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
13. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC12693	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
14. Neoscytalidium_dimidiatum_UTHSCSA_DI_14-340	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
15. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_499.66	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
16. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_251.49	N. dimidiatum	A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
17. Neodeightonia_subglobosa_CBS_448.91		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	C	G	G	C	G	C
18. Neodeightonia_phoenicum_CBS_122528		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	G	T	C	G	G	C	G	T
19. Macrophomina_phaseolina_CBS_460.70		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	T	A	A	G	G	C	G	T
20. Macrophomina_phaseolina_CBS_227.33		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	T	A	A	G	G	C	G	T
21. Lasiodiplodia_theobromae_CBS_164.96		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	G	T	T	G	G	C	G	T
22. Lasiodiplodia_pseudotheobromae_CBS116459		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	G	T	T	G	G	C	G	T
23. Diplodia_rosulata_CBS116470		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	G	T	T	G	G	C	G	T
24. Diplodia_mutila_CBS_112553		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	G	T	T	G	G	C	G	T
25. Cophinforma_atrovirens_MFLUCC_11-0425		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	G	G	G	C	G	T
26. Cophinforma_atrovirens_CBS_117444		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	G	G	C	G	T	
27. Botryosphaeria_ramosa_CMW_26167		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	C	A	T	A	C	T	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	G	G	G	C	G	T	
28. Botryosphaeria_fusispora_MFLUCC_10-0098		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	C	A	T	A	C	T	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	G	G	G	C	G	T	
29. Botryosphaeria_dothidea_CMW8000		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	C	A	T	A	C	T	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	G	G	G	C	G	T	
30. Botryosphaeria_dothidea_CBS110302		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	C	A	T	A	C	T	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	G	G	C	G	T		
31. Botryosphaeria_agaves_MFLUCC_11-0125		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	C	A	T	A	C	T	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	C	A	G	G	G	C	G	T	
32. Botryobambusa_fusicoccum_MFLUCC_11-0143		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	A	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	G	T	T	G	G	C	G	T
33. Barriopsis_fusca_CBS_174.26		A	G	C	T	A	G	T	A	G	A	A	-	-	T	A	C	A	C	C	T	C	G	C	T	T	T	G	G	A	G	C	-	G	G	T	T	G	G	A	G	T

Figure 9 The specificity of NdDOA4R to *N. dimidiatum* and others *Botryosphaeria*

Species/Abbrv	Group Name	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
1. Neoscytalidium_orchidacearum_MFLUCC_12-0533	N. orchidacearum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
2. Neoscytalidium_novaeohollandiae_WAC13275	N. novaeohollandiae	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
3. Neoscytalidium_novaeohollandiae_WAC13273	N. novaeohollandiae	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
4. Neoscytalidium_novaeohollandiae_CBS122072	N. novaeohollandiae	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
5. Neoscytalidium_novaeohollandiae_CBS_122071	N. novaeohollandiae	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
6. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_145.78	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
7. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13305	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
8. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13302	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
9. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13287	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
10. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13282	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
11. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13277	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
12. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC13274	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
13. Neoscytalidium_dimidiatum_WAC12693	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
14. Neoscytalidium_dimidiatum_UTHSCSA_DI_14-340	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
15. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_499.66	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
16. Neoscytalidium_dimidiatum_CBS_251.49	N. dimidiatum	T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A	T	G	C	G	A	T	A	A	T	A	A	T	G	T	G	A	A	T
17. Neodeightonia_subglobosa_CBS_448.91		T	C	G	A	T	A	G	A	A	A	C	G	C	A	G	C	G	A	A	A</																		

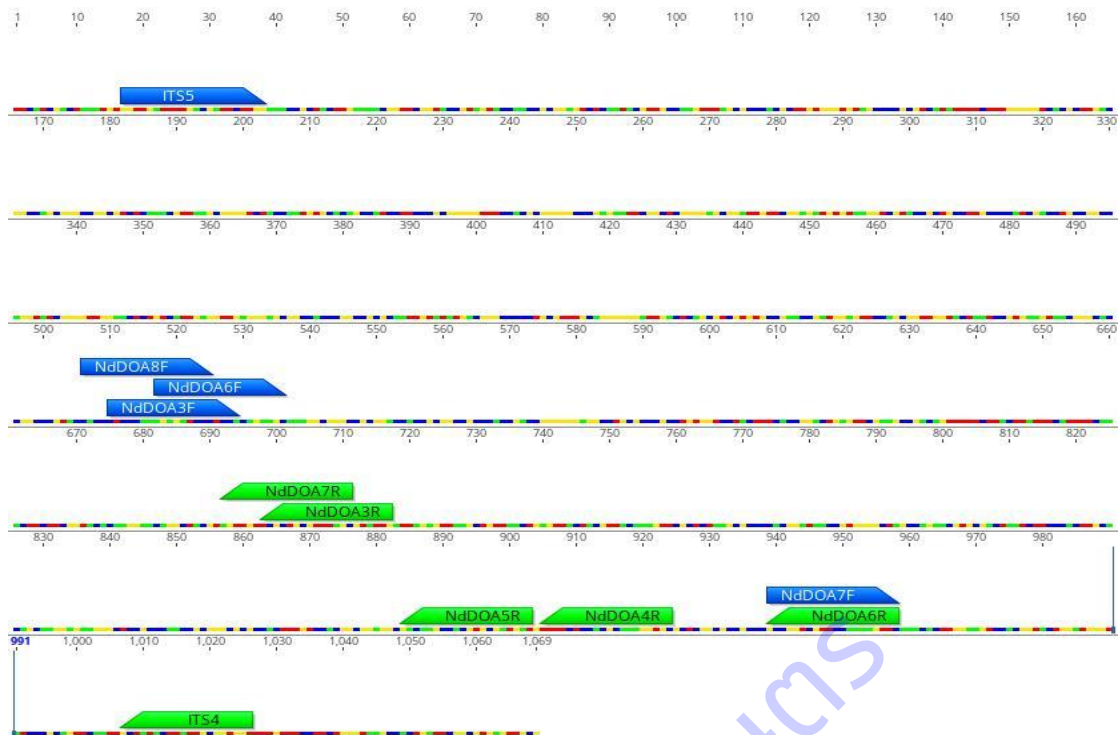


Figure 13 Map of primers namely, ITS5, NdDOA6R, NdDOA6F, NdDOA6R, NdDOA3F, NdDOA6R, NdDOA8F, NdDOA6R, NdDOA7F and ITS4



Figure 14 The results of primers tested with DNA templates of various of fungi

การทดลองที่ 2.7 การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) กับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2562)

1. จากการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับไวรอยด์ที่เข้าทำลายมะเขือเทศ พบว่าไวรอยด์ที่สามารถก่อโรคในมะเขือเทศได้มีด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Columnea latent viroid* (CLVd), *Citrus exocotis viroid* (CEVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Mexican papita viroid* (MPVd), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd), *Tomato bunchy top viroid* (TBTVd) และ *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบไวรอยด์ PCFVd เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2554 โดยการสำรวจตัวอย่างมะเขือเทศในพื้นที่ปลูกของเกษตรกรในจังหวัดลำปาง พบมะเขือเทศแสดงอาการต้นแคระแกรน (stunted) อาการไหม้ (necrosis) ใบบิดเบี้ยว (distortion) และสีใบผิดปกติ (discoloration) นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank (Reanwarakorn *et al.*, 2011) โดยไวรอยด์ PCFVd จัดอยู่ในวงศ์ *Pospiviroidae* จินัส *Pospiviroid* มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) ซึ่งมีขนาดจีโนมประมาณ 348 นิวคลีโอไทด์ พบครั้งแรกในประเทศเนเธอร์แลนด์ ในโรงเรือนที่ปลูกพริกหวาน ซึ่งทำให้ผลผลิตและการเจริญเติบโตลดลง และสามารถถ่ายทอดด้วยวิธีกลและถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ (Verhoeven *et al.*, 2009) การตรวจสอบไวรอยด์ PCFVd ต้องอาศัยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล ในปัจจุบันวิธีการที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์สาเหตุโรคพืช มีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ เทคนิค RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) เทคนิค RT-qPCR (Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction) และเทคนิค RT-LAMP (Reverse Transcription-Loop-mediated isothermal amplification) เป็นต้น โดยแต่ละเทคนิควิธีการถูกนำมาปรับใช้และพัฒนาเพื่อให้การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์สาเหตุโรคพืชมีความถูกต้องรวดเร็ว และแม่นยำมากยิ่งขึ้น ในขณะเดียวกันแต่ละเทคนิควิธีการก็จะมีข้อดี ข้อด้อย และข้อจำกัดที่อาจเหมือนหรือแตกต่างกันออกไป ดังนั้น การทดลองวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีการแบบ conventional RT-PCR ในการตรวจสอบไวรอยด์ PCFVd เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ยังคงมีการอ้างอิงถึงในมาตรฐานการตรวจสอบ (standard protocol) ของหลาย ๆ แหล่ง ได้แก่ International Seed Federation (ISF), The International Seed Health Initiative (ISHI), International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) และ EPPO Standards เป็นต้น ซึ่งคู่มือที่สามารถใช้ในการตรวจสอบไวรอยด์ PCFVd ตามที่มีรายงานในหลาย ๆ แหล่งนั้นมีด้วยกันหลายโปรแกรม โดยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้คู่มือจำนวน 4 คู่มือ (ตารางที่ 1) ในการตรวจหาเชื้อไวรอยด์ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

2. ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้วิธีการที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมีด้วยกันทั้งหมด 4 วิธีการสกัด ประกอบด้วย การสกัดอาร์เอ็นเอของพืชด้วยสารละลาย CTAB จำนวน 2 วิธี และการสกัดอาร์เอ็นเอของพืชโดยการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัดสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอ จำนวน 2 วิธี จาก

การตรวจสอบยีนเป้าหมายด้วยคูไพรเมอร์ NAD (ภาพที่ 1) พบว่า ตัวอย่างทั้ง 8 กรรมวิธีที่สกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการของ Boonham (Boonham *et al.*, 2002) ให้ผลการตรวจสอบอาร์เอ็นเอของ *Nad5* gene (NADH dehydrogenase subunit 5) ที่สม่ำเสมอ ปรากฏแถบแบนของยีนเป้าหมายอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าวิธีการสกัดดังกล่าวให้ผลของการสกัดอาร์เอ็นเอของพืชได้อย่างดี

3. เมื่อนำสารละลายอาร์เอ็นเอของทั้ง 8 กรรมวิธีที่สกัดได้จากทั้ง 4 วิธีการ รวมทั้งหมด 32 ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ มาดำเนินการตรวจหาเชื้อไวรัส PCFVd ด้วยคูไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ คูไพรเมอร์ Pospi1, คูไพรเมอร์ PC2 และ คูไพรเมอร์ PCFVd พบว่า อาร์เอ็นเอที่จากการสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002) ปรากฏแถบแบนของยีนเป้าหมายในทั้ง 3 คูไพรเมอร์ (ภาพที่ 2, 3 และ 4) โดยคูไพรเมอร์ที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องและชัดเจนคือ คูไพรเมอร์ PC2 และ PCFVd (ภาพที่ 3 และ 4) ในขณะที่สารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดในอีก 3 วิธีให้ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส PCFVd เป็นบวก (positive result) กับคูไพรเมอร์ PC2 และ PCFVd เฉพาะในกรรมวิธี 8 PCFVd-tomato leave (positive control) เท่านั้น (ภาพที่ 3 และ 4)

4. นำวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอและคูไพรเมอร์ที่ให้ผลการตรวจสอบไวรัส PCFVd ที่ดีที่สุด ได้แก่ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002) และคูไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ 1.คูไพรเมอร์ NAD 2.คูไพรเมอร์ PC2 และ 3.คูไพรเมอร์ PCFVd มาใช้ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อตรวจหาว่ามีเชื้อไวรัส PCFVd ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวหรือไม่ และใช้ในการตรวจรับรองเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศว่าการปลอดจากเชื้อไวรัส PCFVd รวมทั้งสิ้นจำนวน 31 รายการ (ตารางที่ 2 และ 3) พบว่า ผลการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศทั้ง 31 รายการ นั้นไม่พบเชื้อไวรัส PCFVd ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าว (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 รายละเอียดของแต่ละคู่ไพรเมอร์

Primers	Nucleotides (5' ---> 3')	Target	Reference
NAD	Nad5-F: GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT Nad5-R: CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA	<i>Nad5</i> gene (NADH dehydrogenase subunit 5)	Menzel <i>et al.</i> , 2002
Posp1	Posp1-FW: GGG ATC CCC GGG GAA AC Posp1-RE: AGC TTC AGT TGT (T/A)TC CAC CGG GT	CEVd, CSVd, IrVd-1, MPVd, PCFVd, PSTVd, TASVd, TCDVd และ TPMVd	Verhoeven <i>et al.</i> , 2004 ISPM 27 (2015)
PC2	cPC2: TGT TTC WRC DGG GAT TAC TCC TG hPC2: GGG TTT TCA CCC TTC CTT TC	CLVd, MPVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd	Tangkanchanapas <i>et al.</i> , 2005
PCFVd	PCFVd-FW1: GGT CTA GAC CCT TCC TTT CTT CGG GTT TCC PCFVd-RE1: GAA AAC CCT GTT TCA GCG GGG AT	PCFVd	Verhoeven <i>et al.</i> , 2009

ตารางที่ 2 รายละเอียดเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าที่ทำการตรวจสอบเชื้อไวรัส PCFVd

เลขที่รับ	วันที่	บริษัทผู้นำเข้า	แหล่งกำเนิด	น้ำหนัก
Im.1259	17 ต.ค. 61	บ.ซากาตะ สยาม ซีด	South Africa	14.72 กก.
Im.1277	19 ต.ค. 61	บ.อีสท์ เวสต์ ซีด	Philippines	18.67 กก.
Im.1530	25 ธ.ค. 61	บ.เจียไต๋ ซีด	China	40.17 กก.
Im.1539	26 ธ.ค. 61	บ.อีสท์ เวสต์ ซีด	India	227.55 กก.
Im.23	3 ธ.ค. 62	บ.อีสท์ เวสต์ ซีด	Philippines	200 กก.
Im.38	14 ม.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	12.89 กก.
Im.59	16 ม.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	14.08 กก.
Im.62	17 ม.ค. 62	บ.อีสท์ เวสต์ ซีด	India	104.5 กก.
Im.66	21 ม.ค. 62	บ.อีสท์ เวสต์ ซีด	India	25.65 กก.
Im.92	4 ก.พ. 62	บ.อีสท์ เวสต์ ซีด	Philippines	378.2 กก.
Im.97	9 ก.พ. 62	บ.นามดารี สยาม ซีด	India	40 กก.
Im.184	11 มี.ค. 62	บ.เจียไต๋ ซีด	China	28.83 กก.
Im.195	11 มี.ค. 62	บ.ฮอทิ-โกร	Hong Kong	350.118 กก.
Im.277	2 เม.ย. 62	บ.ไดนามิค ซีด	India	15 กก.
Im.297	10 เม.ย. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	20.27 กก.
Im.335	23 เม.ย. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	21.47 กก.
Im.339	23 เม.ย. 62	บ.อีสท์ เวสต์ ซีด	Philippines	20.55 กก.
Im.474	18 พ.ค. 62	บ.อีสท์ เวสต์ ซีด	India	151.40 กก.
Im.517	30 พ.ค. 62	บ.นามดารี	India	407.9 กก.
Im.662	8 มิ.ย. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	149.90 กก.
Im.680	12 มิ.ย. 62	บ.ชินเจนทา	India	50.00 กก.
Im.811	13 ก.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	57.53 กก.
Im.818	13 ก.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	India	25.96 กก.
Im.902	2 ส.ค. 62	บ.เอช เอ็ม โคลส	India	24.55 กก.
Im.994	20 ส.ค. 62	บ.ฟิลเลอร์ ซีด	Netherland	100.00 กก.

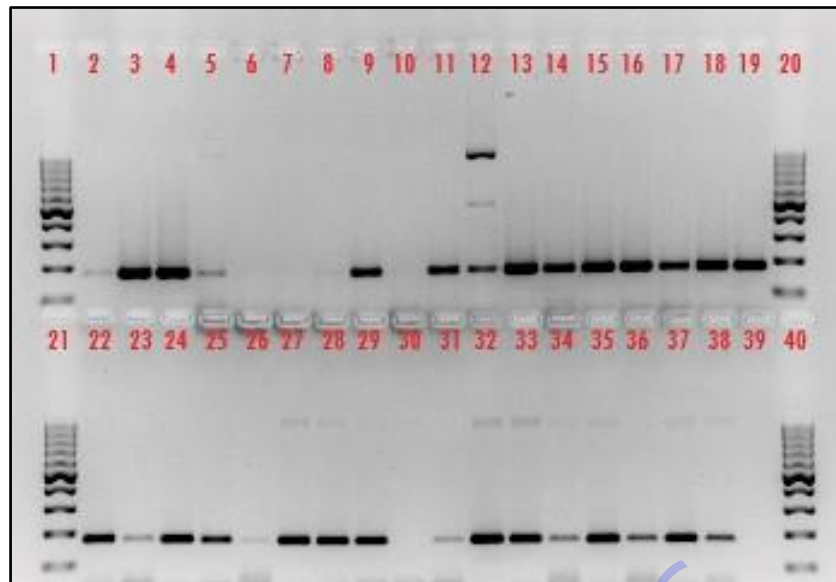
ตารางที่ 3 รายละเอียดเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศส่งออกที่ทำการตรวจสอบเชื้อไวรัส PCFVd

เลขที่รับ	วันที่	บริษัทผู้ส่งออก	ประเทศปลายทาง	น้ำหนัก
Ex.906	3 มี.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	South Korea	3.284 กก.
Ex.1104	11 มี.ค. 62	บ.ซิน เมล็ดพันธุ์	South Korea	6.3 กก.
Ex.2579	24 พ.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	South Korea	11.90 กก.
Ex.2623	27 พ.ค. 62	บ.สุพรีม โกลด์	South Korea	99.36 กก.
Ex.2854	10 มิ.ย. 62	บ.ซิน เมล็ดพันธุ์	South Korea	13.50 กก.
Ex.3130	24 พ.ค. 62	บ.ไอโรซา	South Korea	43.95 กก.

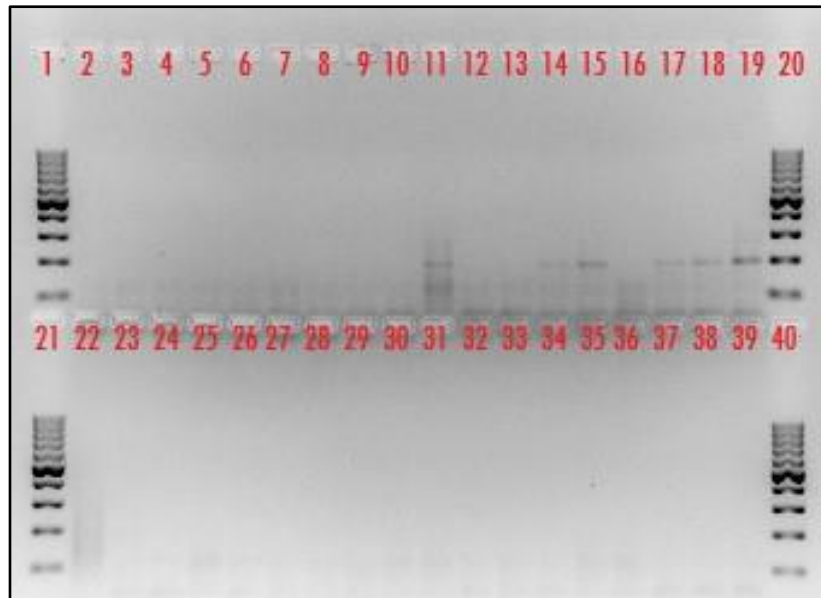
ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยคู่มือจำนวน 3 คู่

เลขที่รับ	ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR			ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส PCFVd
	Nad5-F / Nad5-R	cPC2/ hPC2	PCFVd-FW1 / PCFVd-RE1	
Im.1259	+	-	-	-
Im.1277	+	-	-	-
Im.1530	+	-	-	-
Im.1539	+	-	-	-
Im.23	+	-	-	-
Im.38	+	-	-	-
Im.59	+	-	-	-
Im.62	+	-	-	-
Im.66	+	-	-	-
Im.92	+	-	-	-
Im.97	+	-	-	-
Im.184	+	-	-	-
Im.195	+	-	-	-
Im.277	+	-	-	-
Im.297	+	-	-	-
Im.335	+	-	-	-
Im.339	+	-	-	-
Im.474	+	-	-	-
Im.517	+	-	-	-
Im.662	+	-	-	-
Im.680	+	-	-	-
Im.811	+	-	-	-
Im.818	+	-	-	-
Im.902	+	-	-	-
Im.994	+	-	-	-
Ex.906	+	-	-	-
Ex.1104	+	-	-	-
Ex.2579	+	-	-	-
Ex.2623	+	-	-	-
Ex.2854	+	-	-	-
Ex.3130	+	-	-	-

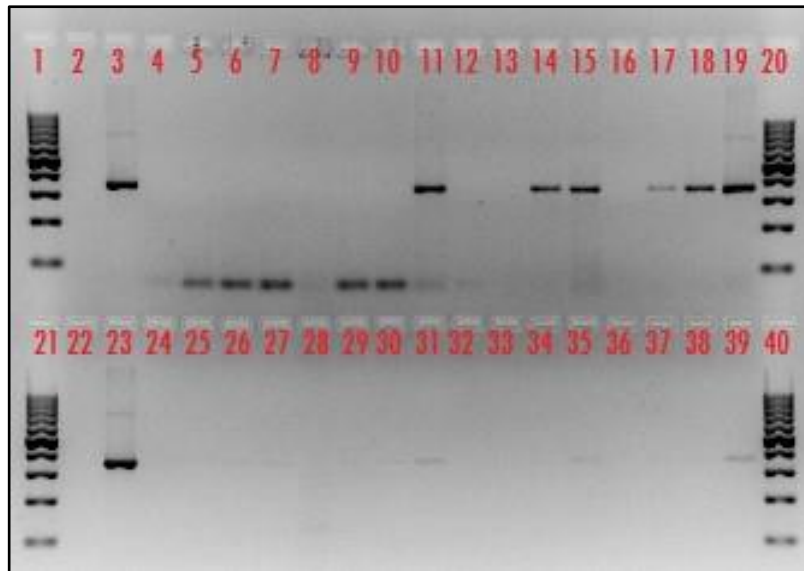
หมายเหตุ: + คือ ให้ผลบวก (positive) กับการตรวจสอบ, - คือ ให้ผลลบ (negative) กับการตรวจสอบ



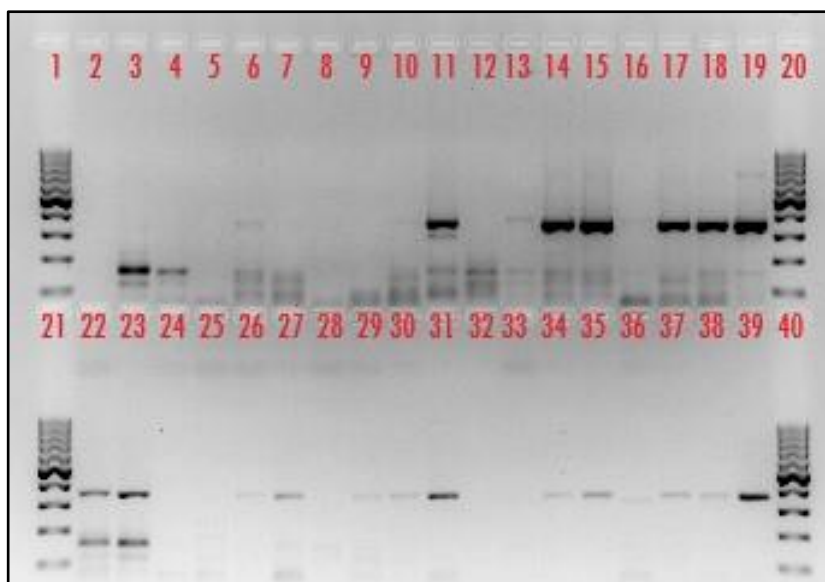
ภาพที่ 1 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคูเพรเมอร์ NAD ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) ทั้ง 4 วิธี ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 2% อะกาโรสเจลผสมกับสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ซึ่งยีนเป้าหมายมีขนาดประมาณ 150 bp โดยที่ หมายเลข 1, 20, 21 และ 40 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) หมายเลข 2 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปกติ (negative control) หมายเลข 3 และ 4 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อไวรัส PCFVd (positive control) หมายเลข 5-12 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004) หมายเลข 13-19 และ 22 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002) หมายเลข 23-30 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN) หมายเลข 31-38 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) หมายเลข 39 คือ น้ำ (blank; negative control)



ภาพที่ 2 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคูเพรเมอร์ Posp1 ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) ทั้ง 4 วิธี ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 2% อะกาโรสเจลผสมกับสารถย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ซึ่งยีนเป้าหมายมีขนาดประมาณ 196-228 bp โดยที่ หมายเลข 1, 20, 21 และ 40 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) หมายเลข 2 คือ น้ำ (blank; negative control) หมายเลข 3 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปกติ (negative control) หมายเลข 4-11 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004) หมายเลข 12-19 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002) หมายเลข 22 และ 23 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อไวรัส PCFVd (positive control) หมายเลข 24-31 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN) หมายเลข 32-39 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)



ภาพที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคูโพรเมอร์ PC2 ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) ทั้ง 4 วิธี ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 2% อะกาโรสเจลผสมกับสารถย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ซึ่งยีนเป้าหมายมีขนาดประมาณ 370 bp โดยที่ หมายเลข 1, 20, 21 และ 40 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder) หมายเลข 2 คือ น้ำ (blank; negative control) หมายเลข 3 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปกติ (negative control) หมายเลข 4-11 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004) หมายเลข 12-19 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002) หมายเลข 22 และ 23 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อไวรัส PCFVd (positive control) หมายเลข 24-31 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN) หมายเลข 32-39 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)



ภาพที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคูไพร์เมอร์ PCFVd ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) ทั้ง 4 วิธี ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 2% อะกาโรสเจล ผสมกับสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ซึ่งยีนเป้าหมายมีขนาดประมาณ 350 คู่เบส (bp)

โดยที่ หมายเลข 1, 20, 21 และ 40 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

หมายเลข 2 คือ น้ำ (blank; negative control)

หมายเลข 3 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปกติ (negative control)

หมายเลข 4-11 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004)

หมายเลข 12-19 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002)

หมายเลข 22 และ 23 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อไวรัส PCFVd (positive control)

หมายเลข 24-31 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN)

หมายเลข 32-39 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

การทดลองที่ 2.8 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบโรคใบต่างลายของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2562)

1. ตัวอย่างข้าวโพดแสดงอาการใบต่าง

เก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่แสดงอาการใบต่างที่พบแปลงปลูกข้าวโพดในจังหวัดนครสวรรค์ นครราชสีมา สระบุรี ลพบุรี กาญจนบุรี และนครปฐม รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 260 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยใบข้าวโพดที่พบจะแสดงอาการใบต่างประเป็นขีดสีเขียวขีดขนาดเล็กตรงบริเวณโคนใบของใบยอด ส่วนใบถัดจากใบยอดลงมาจะพบอาการต่างจะแพร่กระจายทั่วใบ (ภาพที่ 1)

2. การตรวจสอบเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* ในตัวอย่างใบข้าวโพดด้วยเทคนิค Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA

จากการตรวจสอบตัวอย่างใบข้าวโพดด้วย Anti-SCMV โดยวิธี DAS – ELISA พบตัวอย่างใบข้าวโพดที่มีเชื้อ SCMV จำนวน 89 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังตรวจสอบเชื้อ Maize chlorotic mottle virus (MCMV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสอีกชนิดที่มีรายงานว่าเข้าทำลายข้าวโพดได้ โดยการตรวจสอบด้วย Anti-MCMV พบใบข้าวโพดจำนวน 5 ตัวอย่าง ที่มีเชื้อ MCMV และยังพบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อ SCMV และ MCMV จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยได้แสดงผลการตรวจไว้ในตารางที่ 1

3. ลักษณะอาการในต้นข้าวโพดหวานลูกผสม จัมโบ้ สวิท F1 และการเพิ่มปริมาณเชื้อ SCMV ในข้าวฟ่างพันธุ์ UT432

ทำการปลูกเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลต ลงบนข้าวโพดหวานลูกผสม จัมโบ้ สวิท F1 และข้าวฟ่างพันธุ์ UT432 เพื่อศึกษาลักษณะอาการและเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน ข้าวโพดหวานที่ได้รับการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต Kanchanaburi Lopburi และ Nakhon Sawan พบอาการใบต่างและเป็นขีดขนาดเล็ก ๆ ส่วนไอโซเลต Saraburi และ Nakhon Ratchasima พบอาการใบต่างประ (ภาพที่ 2)

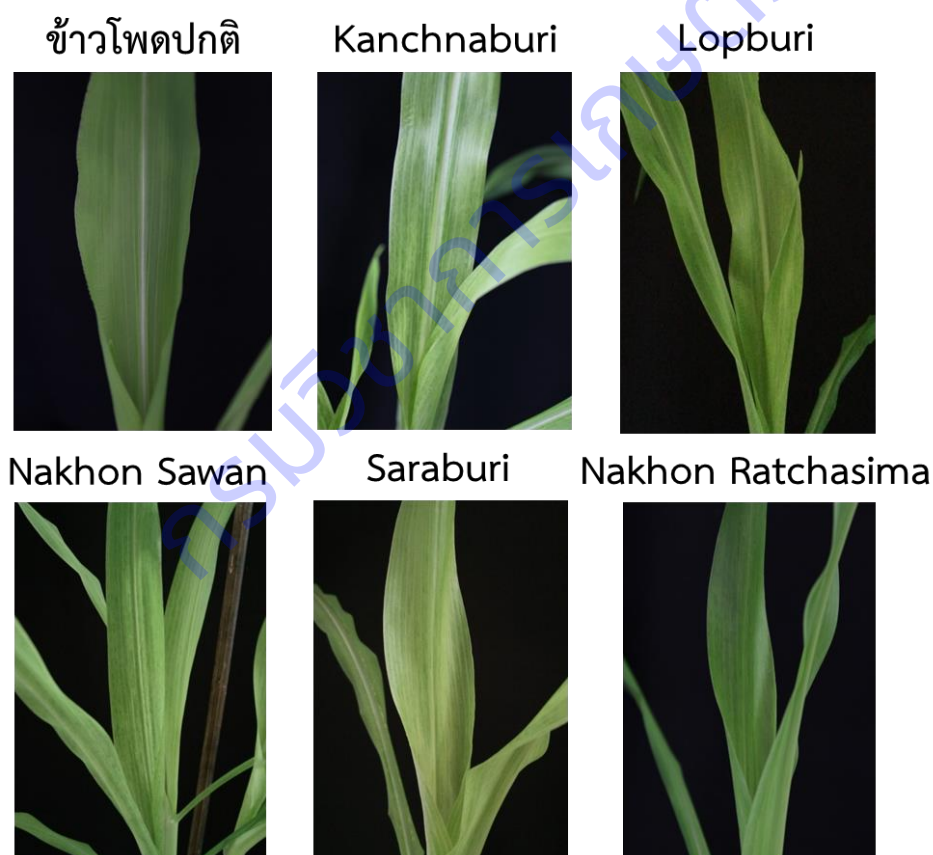
ตารางที่ 1 การตรวจสอบเชื้อ SCMV ในข้าวโพดที่แสดงอาการต่างที่เก็บจากแปลงปลูกข้าวโพด ใน 6 จังหวัด ด้วยเทคนิค DAS - ELISA

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	ผลการตรวจด้วย ELISA (ตัวอย่าง)		
		SCMV	MCMV ^{1/}	SCMV + MCMV
นครสวรรค์	17	11	-	-
นครราชสีมา	132	46	3	7
สระบุรี	33	24	-	1
ลพบุรี	13	2	-	0
กาญจนบุรี	42	6	1	0
นครปฐม	23	-	1	0
รวม	260	89	5	8

^{1/} MCMV : *Maize chlorotic mottle virus*



ภาพที่ 1 ใบข้าวโพดที่แสดงอาการใบต่างประเป็นขีดสีเขียวซีดขนาดเล็กที่พบในแปลงปลูกข้าวโพด



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการบนข้าวโพดหวานลูกผสม จัมโบ้ สวีท F1 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต Kanchanaburi (KB), Lopburi (LB), Nakhon Sawan (NSW), Saraburi (SB) และ Nakhon Ratchasima (NM)

4. ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 3) และกรดอะมิโน (ภาพที่ 4) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (Coat protein: CP) ของเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไอโซเลต Lopburi (LB) และ Nakhon Ratchasima (NM) มีขนาด 942 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 313 เรซิดิวส์ และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต Saraburi (SB) Kanchanaburi (KB) และ Nakhon Sawan (NSW) มีขนาด 966 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 321 เรซิดิวส์

จากการทำ multiple alignment ของเชื้อ SCMV ทั้ง 2 กลุ่ม พบว่า กลุ่มที่ 1 ไอโซเลต LB และ NM มีความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 99.9% และกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 99.7% ส่วนกลุ่มที่ 2 ไอโซเลต SB KB และ NSW มีความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง 94.1% - 97.2% และกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 97.2% - 98.4% เมื่อเปรียบเทียบกับทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 85.1% - 99.9% และ 88.2% - 99.7% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากค่าความเหมือนที่วิเคราะห์ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัส SCMV ในประเทศไทยนั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรมถึงแม้ว่าจะเข้าทำลายข้าวโพดเหมือนกัน

ผลการวิเคราะห์หิวเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 10 พบว่าเชื้อ SCMV ที่ได้จากข้าวโพดในประเทศไทยไอโซเลต LB และ NM จับกลุ่มอยู่กับ SCMV ที่พบในประเทศไทยและแยกออกมาจากเชื้อ SCMV ที่พบในต่างประเทศ ส่วนไอโซเลต NSW และ KB จับกลุ่มอยู่กับ SCMV ที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 5) สำหรับไอโซเลต SB ถึงแม้ว่าจะมีขนาดของยีน CP เท่ากับไอโซเลต NSW และ KB แต่ก็ยังจับกลุ่มอยู่กับเชื้อไวรัส SCMV ที่พบในประเทศไทย

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของ *Sugarcane mosaic virus* ทั้ง 5 ไอโซเลตที่แยกจากข้าวโพด

ไอโซเลต	กรดอะมิโน				
	NSW	KB	SB	LB	NM
NSW		98.4	97.2	88.5	88.2
KB	97.2		98.1	88.8	88.5
SB	94.1	94.8		89.7	89.4
LB	85.2	85.6	89.6		99.7
NM	85.1	85.5	89.5	99.9	

นิวคลีโอไทด์

หมายเหตุ - NSW: ไอโซเลต Nakhon Sawan
 - SB: ไอโซเลต Saraburi
 - NM: ไอโซเลต Nakhon Ratchasima
 - KB: ไอโซเลต Kanchanaburi
 - LB: ไอโซเลต Lopburi

LB	TCTGGTCAAGTTGACGCAGGGAGACAGGGCGGTAGCGGCGCTCAAGGAGGCACACCACCA	60
NM	TCTGGTCAAGTTGACGCAGGGAGACAGGGCGGTAGCGGCGCTCAAGGAGGCACACCACCA	60
SB	TCTGGCCATGTTGATGCAGGGAGACAAGGCGGTAGCGGCGGTCAAGGAGGCACACCACCT	60
KB	TCTGGCCATGTTGATGCAGGGAGACAAGGCGGTAGCGGCGGTCAAGGAGGCACACCACCT	60
NSW	TCTGGCCATGTTGATGCAGGGAGACAAGGCGGTAGCGGCGGTCAAGGAGGCACACCACCT ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	60
LB	GCA-----GGAAGT	69
NM	GCA-----GGAAGT	69
SB	GCAGGAAATGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGGCCGGCGGAGGCCAGACAGGAGGAAGT	120
KB	GCAGGAAATGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGGCCGGCGGAGGCCAGACAGGAGGAAT	120
NSW	GCAGGAAATGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGAAACGGCGGAGGCCAGACAGGAGGAAGT *** *****	120
LB	GGAGGCACTGGATCTGGCGCTCAAGGCAATGGGGGTGAGACGGGGTCCCAAGGAAGTGGT	129
NM	GGAGGCACTGGATCTGGCGCTCAAGGCAATGGGGGTGAGACGGGGTCCCAAGGAAGTGGT	129
SB	GGAGGCACTGGAACCTGGCACTCAAGGCAATGGGGGTGAGACGGGATCCCAAGGAAATGGT	180
KB	GGAGGCACTGGATCTGGCACTCAAGGTAATGGGGGTGAGACGGGATCCCAAGGAAATGGT	180
NSW	GGAGGCACTGGCTCTGGCACTCAAGGTAATGGGGGCCAGACGGGACCCCAAGGAAGTGGT ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	180
LB	GGTCAACAAGGGTCCGGTAGGGGCACTGGTCAAGGAGCAGCTGGAAACAACGGCGGAGGT	189
NM	GGTCAACAAGAGTCCGGTAGGGGCACTGGTCAAGGAGCAGCTGGAAACAACGGCGGAGGT	189
SB	GGTCAA-----CAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGC	213
KB	GGTCAA-----CAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGC	213
NSW	GGTCAA-----CAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGC ***** ** * ** *****	213
LB	CAGACAGGAGGCTCTAGTGGGGCAGCTGGTCAAGAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG	249
NM	CAGACAGGAGGCTCTAGTGGGGCAGCTGGTCAAGAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG	249
SB	CAGACAGGAGGTTCTGGTGGGACAGCTGGTCAAAGGGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG	273
KB	CAGACAGGAGGTTCTGGTGGGACAGCTGGTCAAAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG	273
NSW	CAGACAGGAGGTTCTGGTGGGACAGCTGGTCAAAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG ***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	273
LB	GCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAG	309
NM	GCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAG	309
SB	GCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAG	333
KB	GCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAG	333
NSW	TCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCGAAG ***** *****	333
LB	GCAAAGGAAAAGACGCTTTCGACTTTTGTGACATACAAGCCACAACAGCAG	369
NM	GCAAAGGAAAAGACGCTTTCGACTTTTGTGACATACAAGCCACAACAGCAG	369
SB	GCAAAGGAAAAGACGCTTTCGACTTTTGTGACATACAAGCCACAACAGCAG	393
KB	GCAAAGGAAAAGACGCTTTCGACTTTTGTGACATACAAGCCACAACAGCAA	393
NSW	GCAAAGGAAAAGATGCTTTCGACTTTTGTGACATACAAGCCACAACAA ***** ***** ** ***** *****	393
LB	GACATATCGAACACAAGAGCAACTAAGGAAGAGTTTCGATAGATGGTACGACGCCATAAAG	429
NM	GACATATCGAACACAAGAGCAACTAAGGAAGAGTTTCGATAGATGGTACGACGCCATAAAG	429
SB	GACATATCGAACACAAGAGCAACTAAGGAAGAGTTTCGATAGATGGTACGACGCCATAAAG	453
KB	GACATATCGAACACAAGAGCAACTAAGGAGGAGTTTCGATAGATGGTATGATGCCATAAAG	453
NSW	GACATATCGAACACAAGAGCAACTAAGGAAGAGTTTCGATAGATGGTATGATGCCATAAAG ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****	453

ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของเชื้อ SCMV ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega

LB: ไโอโซเลต Lopburi NM: ไโอโซเลต Nakhon Ratchasima SB: ไโอโซเลต Saraburi

KB: ไโอโซเลต Kanchanaburi และ NSW: ไโอโซเลต Nakhon Sawan

(.) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน

(-) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีในโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค

LB	AAGGAGTACGAGATTGATGATACACAAATGACAGTCGTCATGAGTGGTCTGATGGTCTGG	489
NM	AAGGAGTACGAGATTGATGATACACAAATGACAGTCGTCATGAGTGGTCTGATGGTCTGG	489
SB	AAGGAGTACGAGATCGATGATACACAAATGACAGTCGTCATGAGTGGTCTGATGGTCTGG	513
KB	AAGGAGTATGAGATCGATGATACACAAATGACAGTTATCATGAGTGGTCTAATGGTCTGG	513
NSW	AAGGAGTACGAGATCGATGATACACAAATGACAGTTATCATGAGTGGTCTGATGGTCTGG *****	513
LB	TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGAAAATGGACGATGATGGATGGGGAT	549
NM	TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGAAAATGGACGATGATGGATGGGGAT	549
SB	TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGAAAATGGACGATGATGGATGGGGAT	573
KB	TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCGAATATAAACGGGAATGGACAATGATGGATGGAGAA	573
NSW	TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCAAATATAAACGGGAATGGACGATGATGGATGGAGAA *****	573
LB	GAACAAAGAGTTTTCCCACTGAAACCAGTTATATGAAAACGCATCTCCAACTTTTCGACAA	609
NM	GAACAAAGAGTTTTCCCACTGAAACCAGTTATATGAAAACGCATCTCCAACTTTTCGACAA	609
SB	GAACAAAGAGTTTTCCCACTAAAACCAGTTATATGAAAACGCATCTCCAACTTTTCGACAA	633
KB	GAACAACGAGTTTTTCCATTAAAACCAGTCATCGAAAACGCATCTCCAACTTCCGACAA	633
NSW	GAACAACGAGTTTTTCCATTAAAACCAGTCATCGAAAACGCATCTCCAACTTCCGACAA *****	633
LB	GTTATGCATCATTTTCAGTGTGCAGCTGAAGCGTATATAGAATACAGAAATCTACTGAG	669
NM	GTTATGCATCATTTTCAGTGTGCAGCTGAAGCGTATATAGAATACAGAAATCTACTGAG	669
SB	GTTATGCATCATTTTCAGTGTGCAGCTGAAGCGTATATAGAATACAGAAATCTACTGAG	693
KB	ATAATGCACCACCTTTAGTGTGCAGCTGAAGCGTACATTTGAGTATAGAACTCTACAGAG	693
NSW	ATAATGCACCACCTTTAGTGTGCAGCTGAAGCGTACATAGAGTATAGAACTCTACAGAG * *****	693
LB	CGATACATGCCAAGATATGGACTTCAGCGAAATCTCACCAGACTATAGCTTAGCGCGGTAT	729
NM	CGATACATGCCAAGATATGGACTTCAGCGAAATCTCACCAGACTATAGCTTAGCGCGGTAT	729
SB	CGATACATGCCAAGATATGGACTTCAGCGAAATCTCACCAGACTATAGCTTAGCGCGGTAC	753
KB	CGATATATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCAGACTATAGCCTAGCACGGTAT	753
NSW	CGGTATATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCAGACTATAGCCTAGCACGGTAT ** * *****	753
LB	GCTTTTGTATTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCCACATG	789
NM	GCTTTTGTATTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCCACATG	789
SB	GCTTTTGTATTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCCACATG	813
KB	GCATTTGATTTCTATGAAATGACCTCACGCACACCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCCACATG	813
NSW	GCATTTGATTTTCTATGAAATGACCTCACGCACACCAGCCAGAGCTAAGGAAGCCCACATG ** *****	813
LB	CAGATGAAAGCCGCAGCTGTTTCGTGGTTCAAACACACGACTGTTTCGGCTTGACCGGAAAT	849
NM	CAGATGAAAGCCGCAGCTGTTTCGTGGTTCAAACACACGACTGTTTCGGCTTGACCGGAAAT	849
SB	CAGATGAAAGCCGCAGCTGTTTCGTGGTTCAAACACACGACTGTTTCGGCTTGACCGGAAAT	873
KB	CAGATGAAAGCCGCAGCTGTTTCGTGGTTCAAACACACGACTGTTTCGGCTTGACCGGAAAT	873
NSW	CAGATGAAAGCCGCAGCTGTTTCGTGGTTCAAATACACGATTGTTTCGGCTTGACCGGAAAT *****	873
LB	GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAATATG	909
NM	GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAATATG	909
SB	GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGCCGCAATATG	933
KB	GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAACATG	933
NSW	GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAACATG *****	933
LB	CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAACACCACTAG 942	
NM	CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAaCACCACTAG 942	
SB	CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAACACCACTAG 966	
KB	CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAGCACAACCTAG 966	
NSW	CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAGCACAACCTAG 966 *****	

ภาพที่ 3 (ต่อ)

LB	SGQVDAGRQGGSGAQGGTTPAGSSGGT-----GSGAQNGGQTSQGSG	43
NM	SGQVDAGRQGGSGAQGGTTPAGSSGGT-----GSGAQNGGQTSQGSG	43
NSW	SGHVDAGRQGGSGGGQGGTTPAGNGGQQGSSGGNGGGQTSGGTQNGGQTPQGS	60
KB	SGHVDAGRQGGSGGGQGGTTPAGNGGQQGSSGGAGGGQTSGGTQNGGQTSQNG	60
SB	SGHVDAGRQGGSGGGQGGTTPAGNGGQQGSSGGAGGGQTSGGTGTGTQNGGQTSQNG	60
	** ***** ** * * ***** ** *	
LB	GQQGSGRGTGQGAAGNNGGGQTSGGSSGAAGQRDKDVDAGSAGKISVPKPKAMSKMRLPK	103
NM	GQQGSGRGTGQGAAGNNGGGQTSGGSSGAAGQRDKDVDAGSAGKISVPKPKAMSKMRLPK	103
NSW	GQQG-----SGGNGGQTSGGSGGTAGQRDKDVDAGSSGKISVPKPKAMSKMRLPK	111
KB	GQQG-----SGGNGGQTSGGSGGTAGQRDKDVDAGSAGKISVPKPKAMSKMRLPK	111
SB	GQQ-----GSGGNGGQTSGGSGGTAGQRDKDVDAGSAGKISVPKPKAMSKMRLPK	111
	*** * ***** * ***** *****	
LB	AKGKDVHLHDLFLLYKPPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVVMSGLMVW	163
NM	AKGKDVHLHDLFLLYKPPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVVMSGLMVW	163
NSW	AKGKDVHLHDLFLLYKPPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVW	171
KB	AKGKDVHLHDLFLLYKPPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVW	171
SB	AKGKDVHLHDLFLLYKPPQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVVMSGLMVW	171

LB	CIENGCSPNINGNWTMDGDEQRFVPLKPVNIENASPTFRQVMHHSDAEAYIEYRNSTE	223
NM	CIENGCSPNINGNWTMDGDEQRFVPLKPVNIENASPTFRQVMHHSDAEAYIEYRNSTE	223
NSW	CIENGCSPNINGNWTMDGDEEQRVFLKPVNIENASPTFRQIMHHSDAEAYIEYRNSTE	231
KB	CIENGCSPNINGNWTMDGDEEQRVFLKPVNIENASPTFRQIMHHSDAEAYIEYRNSTE	231
SB	CIENGCSPNINGNWTMDGDEQRFVPLKPVNIENASPTFRQVMHHSDAEAYIEYRNSTE	231

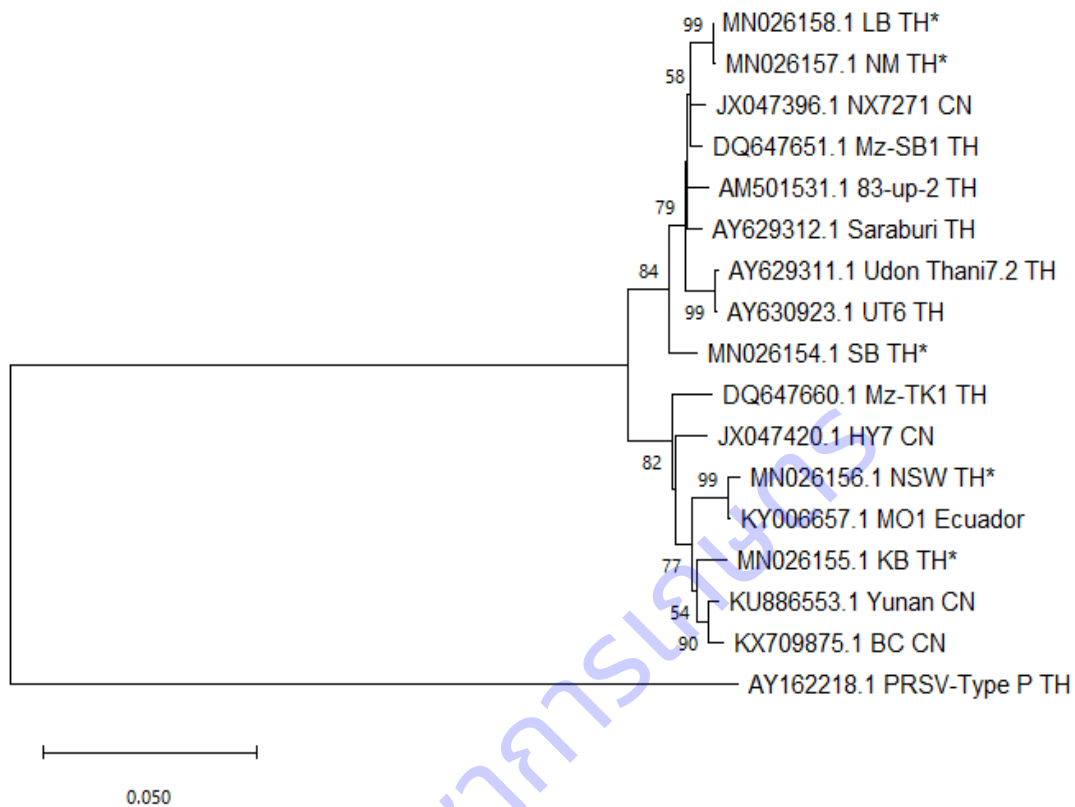
LB	RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRFLGLDGN	283
NM	RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRFLGLDGN	283
NSW	RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRFLGLDGN	291
KB	RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRFLGLDGN	291
SB	RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRFLGLDGN	291

LB	VGETQENTERHTAGDVSRRMHSLLGVQQHH	313
NM	VGETQENTERHTAGDVSRRMHSLLGVQQHH	313
NSW	VGETQENTERHTAGDVSRRMHSLLGVQQHN	321
KB	VGETQENTERHTAGDVSRRMHSLLGVQQHN	321
SB	VGETQENTERHTAGDVSRRMHSLLGVQQHH	321

ภาพที่ 4 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนต่อหุ้มอนุภาค (CP) ของเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลต โดยทำการวิเคราะห์ แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega

LB: ไอโซเลต Lopburi NM: ไอโซเลต Nakhon Ratchasima SB: ไอโซเลต Saraburi
 KB: ไอโซเลต Kanchanaburi และ NSW: ไอโซเลต Nakhon Sawan

- (*) ระบุกรดอะมิโนที่เหมือนกัน
- (-) ระบุกรดอะมิโนที่ไม่มีในโปรตีนต่อหุ้มอนุภาค



ภาพที่ 5 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลตที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย (ไอโซเลตที่มีเครื่องหมาย*) กับไอโซเลตจากในประเทศไทยและในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 10 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อไวรัส *Papaya ring spot virus* Type P (PRSV-Type P) เป็น outgroup

5. การผลิตและการตรวจสอบคุณภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb-SCMV-NSW) ต่อเชื้อไวรัส SCMV

5.1 ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SCMV-NSW

จากการผลิตแอนติบอดีโดยการฉีดเชื้อไวรัส SCMV-NSW ในกระต่าย แล้วเก็บซีรัม รวม 4 ครั้ง มาตรวจหาค่าไตเตอร์ด้วยเทคนิค Indirect PTA-ELISA โดยให้ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส SCMV-NSW ก่อนล้างบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 6,400 - 12,800 โดย PAb-SCMV-NSW ครั้งที่ 4 มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดคือ 12,800 (ตารางที่ 3 , ภาพที่ 6) จึงได้นำเอาแอนติบอดีครั้งที่ 4 มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

5.2 ค่าความเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดี

การหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมของ PAb-SCMV-NSW ครั้งที่ 4 โดยเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาต่อเชื้อไวรัส SCMV-NSW ในข้าวโพด โดยเจือจาง PAb-SCMV-NSW ที่ 5 ระดับ ได้แก่ 1:250, 1:500, 1:1,000, 1:1,500 และ 1:2,000 พบว่ามีค่า A_{405} เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 1.279, 1.123, 1.004, 0.861 และ 0.787 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับใบข้าวโพดปกติที่มีค่าความเจือจางเท่ากัน มีค่าเฉลี่ยของ A_{405} ที่ประมาณ 0.164, 0.151, 0.140, 0.128 และ 0.120 ตามลำดับ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบค่า A_{405} พบว่าอัตราความเจือจางที่ 1:1,000 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส และใช้แอนติบอดีปริมาณน้อยในการตรวจเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพด

5.3 ความจำเพาะของแอนติบอดี (PAb-SCMV-NSW) ต่อเชื้อไวรัส SCMV

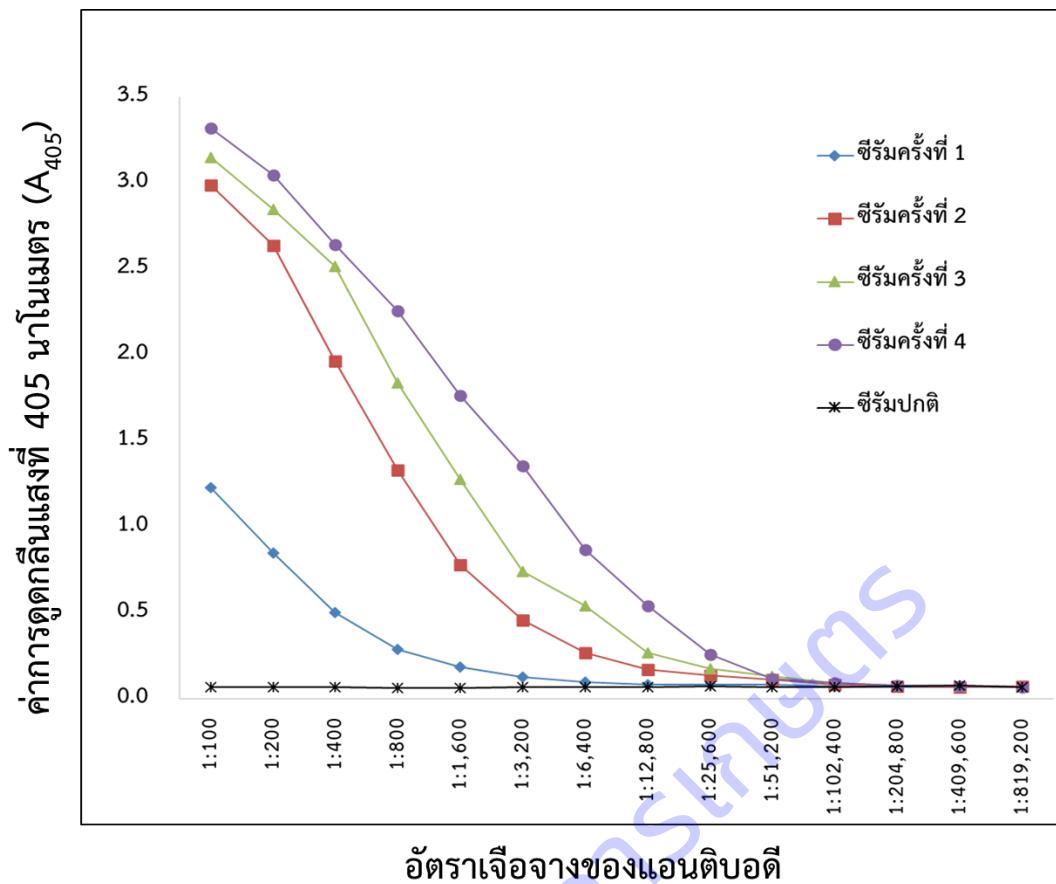
ทำการทดสอบความจำเพาะของ PAb-SCMV-NSW ต่อเชื้อไวรัส SCMV ด้วยเทคนิค Indirect PTA-ELISA โดยใช้เชื้อไวรัสทั้ง 5 ไอโซเลต เชื้อไวรัส *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) ในข้าวโพด และเชื้อไวรัสอื่น ๆ ในสกุล *Potyvirus* ได้แก่ เชื้อไวรัส *Chili veinal mottle virus* (CVMV) และ *Papaya ring spot virus* (PRSV) พบว่า PAb-SCMV-NSW ที่ผลิตได้ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพดทั้ง 5 ไอโซเลต และไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส MCMV, CVMV และ PRSV (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 ค่าความเจือจางสูงสุด (dilution end point) ของแอนติบอดี PAb-SCMV-NSW เมื่อใช้เชื้อไวรัส SCMV คอนข้างบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 µg/ml เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect PTA-ELISA

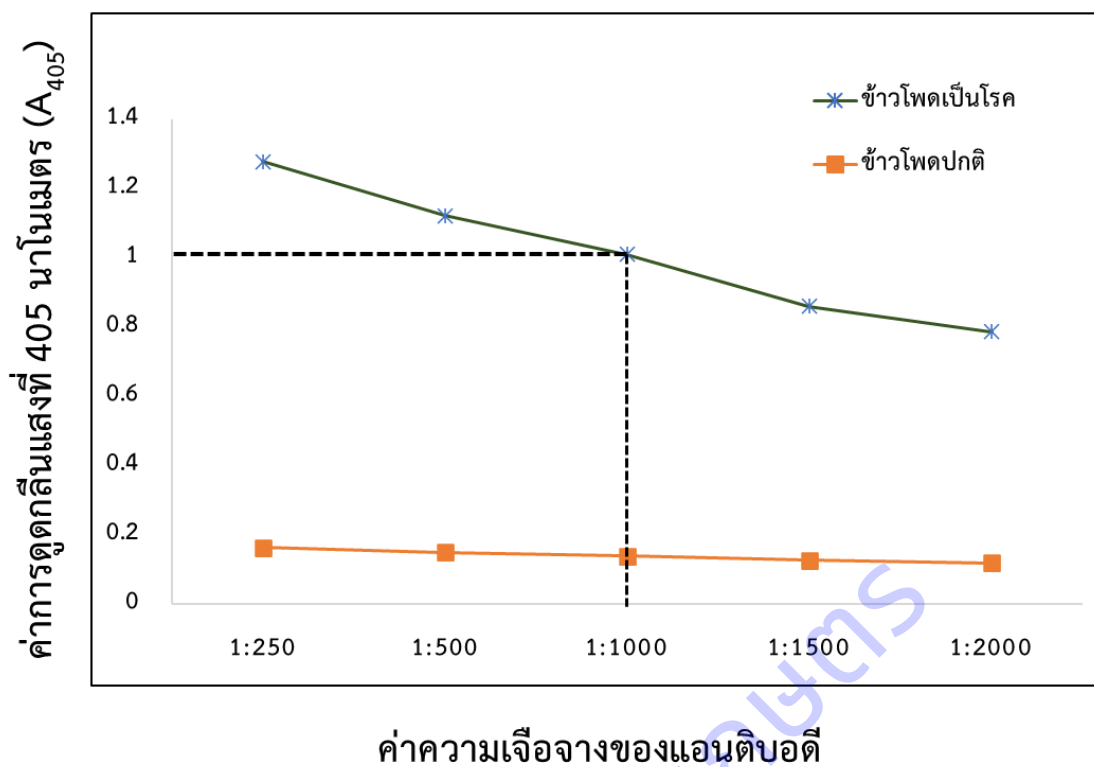
ค่าความเจือจาง ของแอนติบอดี	ค่า A ₄₀₅ เมื่อใช้แอนติบอดีครั้งที่				ซีรัมปกติ
	1	2	3	4	
1:100	1.229	2.989	3.149	3.318	0.070
1:200	0.850	2.639	2.845	3.048	0.067
1:400	0.504	1.966	2.516	2.642	0.066
1:800	0.289	1.333	1.839	2.256	0.064
1:1,600	0.187	0.779	1.279	1.764	0.064
1:3,200	0.127	0.460	0.742	1.355	0.066
1:6,400	0.096	0.267	0.539	0.868	0.069
1:12,800	0.084	0.170	0.267	0.543	0.068
1:25,600	0.085	0.138	0.176	0.260	0.072
1:51,200	0.080	0.111	0.129	0.118	0.070
1:102,400	0.071	0.085	0.093	0.092	0.068
1:204,800	0.069	0.075	0.075	0.079	0.073
1:409,600	0.070	0.070	0.071	0.071	0.079
1:819,200	0.068	0.071	0.068	0.068	0.068
Coating Buffer	0.067	0.065	0.064	0.063	0.062

หมายเหตุ - ค่า A₄₀₅ เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

- ค่า A₄₀₅ ของตัวอย่างที่มากกว่า 3 เท่า ของ normal serum ถือว่าให้ผลเป็นบวก



ภาพที่ 6 กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อ SCMV-NSW (PAb-SCMV-NSW) จากการเจาะเลือด ทั้ง 4 ครั้ง ใช้เชื้อไวรัส SCMV-NSW คอนซังบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect PTA-ELISA วัดค่า ELISA ที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที



ภาพที่ 7 กราฟแสดงค่า ELISA Titer ของแอนติบอดีต่อเชื้อ SCMV-NSW (PAb-SCMV-NSW) จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 เมื่อทำปฏิกิริยากับเชื้อ SCMV-NSW ในใบข้าวโพดที่เป็นโรคตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect PTA-ELISA วัดค่า ELISA ที่ A₄₀₅ หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที

ตารางที่ 4 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี PAb-SCMV-NSW ผลิตได้ กับเชื้อไวรัส MCMV และเชื้อไวรัสสกุล *Potyvirus* อื่น ๆ ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect PTA-ELISA

	ตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบ	ค่า A ₄₀₅ ^{1/}
เชื้อไวรัส SCMV	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต NSW	1.203
	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต LB	1.175
	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต NM	1.117
	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต SB	1.254
	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต KB	1.344
เชื้อไวรัสสกุล <i>Potyvirus</i>	ต้นลำโพงที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ CVMV	0.168
	ต้นมะละกอที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ PRSV	0.184
	ตัวอย่างข้าวโพดที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัส MCMV	0.159
	ข้าวโพดปกติ	0.138
	ต้นลำโพงปกติ	0.153
	ต้นมะละกอปกติ	0.146
	Coating Buffer	0.098

หมายเหตุ ^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ อ่านค่า A₄₀₅ ที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

การทดลองที่ 2.9 พัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) จากแอนติบอดีของโปรตีนลูกผสม SecA ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย(ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2563)

1. การผลิตแอนติบอดีจากโปรตีนลูกผสมของยีน SecA (partial SecA recombinant protein)

ฉีดสารละลายโปรตีนลูกผสมของ partial SecA ซึ่งใช้เป็นแอนติเจนเข้ากล้ามเนื้ออกกระต่ายทดลองพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White Rabbit) จำนวน 1 ครั้ง เก็บเลือดและแอนติซีรัม รวมจำนวน 1 ครั้งได้ ปริมาตรน้ำเลือด รวม 10 มิลลิลิตร แยกเก็บแอนติซีรัมได้ปริมาตรรวม 5 มิลลิลิตร นำไปทดสอบค่าไตเตอร์ แบบ two-fold dilutions ด้วยวิธี Indirect ELISA เมื่ออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร มีค่าความเจือจางสูงสุดที่สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ชัดเจนที่ระดับประมาณ 500 - 1000 เท่า

2. การผลิตชุดตรวจสอบ Lateral Flow Immunoassay (LFIA)

2.1 การสกัด Immunoglobulin G (IgG) ของ SecA-IgG ให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{saturated})$ วัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ Plate (Thermo scientific, USA) ได้ความเข้มข้น crude SecA-IgG เท่ากับ 3.0 mg/ml

2.2 การเชื่อมต่อ SecA-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold; Denovation, USA) เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 นาโนเมตร โดยทำการปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับ IgG ให้มีค่าใกล้เคียงกับค่า Isoelectric point (PI) ของ IgG และค่าความเข้มข้นต่ำสุดของปริมาณ IgG ที่เติมลงในสารละลายอนุภาคทองแล้วไม่ทำให้เกิดการตกตะกอน สำหรับการทดลองนี้ได้ค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 7.3 เมื่อวัดค่าด้วยกระดาษลิตมัสและความเข้มข้น 30 $\mu\text{g/ml}$ เหมาะสมสำหรับใช้เชื่อมต่อกับ Colloidal Gold เพราะสารละลายอนุภาคทองไม่เกิดการตกตะกอน (Fig 4)

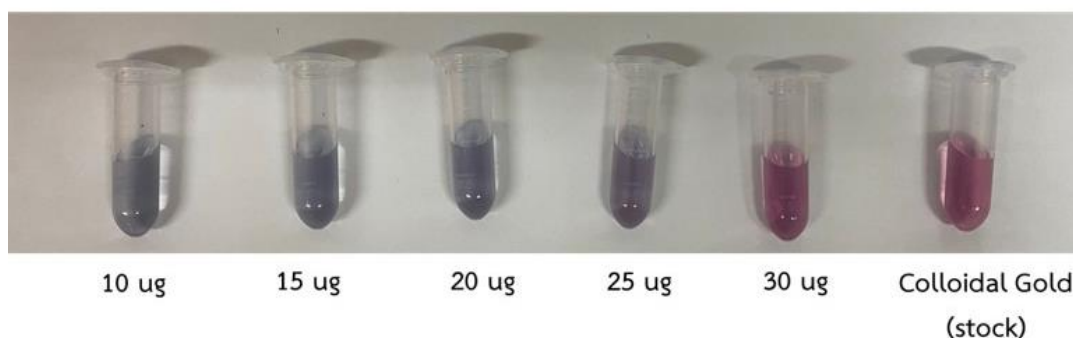


Fig 4 Colloidal gold participation affected from different amount of crude SecA-IgG, at 30 $\mu\text{g/ml}$ without precipitation of colloidal gold

3 การประกอบชุดตรวจสอบ (Strip Test)

เตรียมอุปกรณ์ประกอบ ชุดตรวจสอบ (Strip Test) สำเร็จรูป ดังนี้ 1.แผ่นพลาสติกรองรับ (backing card) 2.แผ่น Conjugated Release Pad (CRP) ที่ถูกระบายด้วยสารละลาย Gold conjugated SecA-IgG ปริมาตร 10 ไมโครลิตร/เซนติเมตร 3.แผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane, NCM) ที่ถูกขีดด้วยเส้นควบคุม (control line, C) และเส้นตรวจ (test line, T) 4.แผ่นเมมเบรนรองรับตัวอย่าง (sample pad) 5. แผ่นเมมเบรนสำหรับดูดซับสารละลายตัวอย่าง (absorbent pad) ทำการประกอบชุดตรวจสอบ (Strip Test) ตามวิธีการข้อ 3.3 และบรรจุชุดตรวจสอบลงถาดพลาสติก เมื่อทดสอบคุณภาพของชุดตรวจสอบ (Strip Test) สำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นในครั้งนี้ด้วยน้ำคั้นจากตัวอย่างอ้อยเป็นโรคใบขาวอ้อยและน้ำคั้นใบอ้อยปกติอย่างละ 3 ซ้ำ พบว่าแสดงผลเฉพาะเส้นควบคุม (control line, C) ได้อย่างชัดเจนภายในเวลา 5-10 นาที แต่ไม่สามารถแสดงผลของเส้นตรวจ (test line, T) (Fig 5)

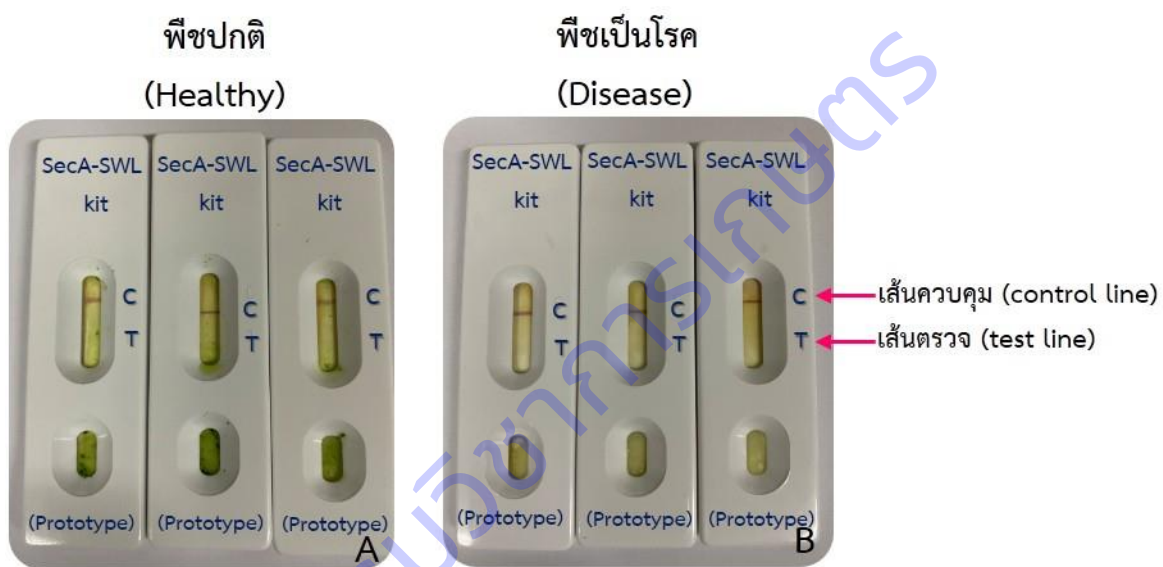


Fig. 5 Sugarcane white leaf disease and normal sugarcane samples detect with SecA-SWL prototype kits

A : Normal sugarcane sample showed red color only on control line (C)

B : Sugarcane white leaf sample showed color only on control line (C)

การทดลองที่ 2.10 การพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซาของพืชตระกูลส้ม (ปีเริ่มต้น 2561 – สิ้นสุด 2563)

1. การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CTV ในสัตว์ทดลอง (as-CTV)

ฉีดแอนติเจน (CTV recombinant coat protein) เข้ากล้ามเนื้อกระต่ายทดลองพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White) จำนวน 4 ครั้ง เก็บเลือดและแอนติซีรัม รวมจำนวน 3 ครั้งได้ปริมาตรน้ำเลือด รวม 30 มิลลิลิตร แยกเก็บแอนติซีรัมได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร นำไปทดสอบค่าไตเตอร์ แบบ two-fold dilutions อัตราตั้งแต่ 1:128 - 1:131,072 เท่า เมื่ออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร มีค่าความเงาสูงสุดที่สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ชัดเจนที่ระดับประมาณ 500 - 4,000 เท่า ทั้งนี้ ค่าความเงาของแอนติซีรัมเชื้อไวรัส CTV สำหรับใช้ตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA อัตราประมาณ 1: 1024 เท่า ให้ค่าดูดกลืนแสง 405 นาโนเมตร เท่ากับ 3.651

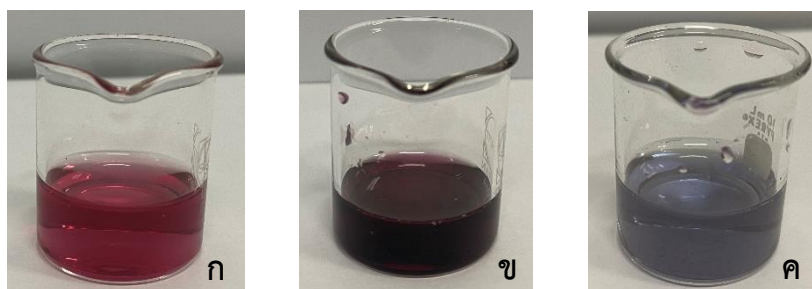
2. การผลิตชุดตรวจสอบ (Strip test)

2.1 การสกัด Immunoglobulin G (IgG) ของเชื้อไวรัส CTV

สกัด Immunoglobulin G (IgG) จากแอนติซีรัมต่อเชื้อไวรัส CTV สาเหตุโรคทริสเทซา จำนวน 1 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ได้ crude CTV-IgG ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทดสอบประสิทธิภาพ crude CTV-IgG ด้วยวิธี Indirect ELISA ค่าไตเตอร์ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 150, 200 และ 250 ug/ml เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร อ่านผลที่ 30 นาที สามารถเกิดปฏิกิริยาสีเหลืองและแสดงค่า O.D.405 มากกว่า 2 เท่าของพีชปกติ และพบว่าความเข้มข้นที่ตั้งแต่ 50 ug/ml มีค่า O.D.405 ได้สูง (> 3.0) เมื่อเทียบกับค่า O.D.405 ของพีชปกติ (0.74) เมื่ออ่านผลที่ 60 นาที จากผลทดสอบเลือกค่าเงาจาก crude CTV-IgG ที่ความเข้มข้น 50 ug/ml สำหรับใช้เป็นความเข้มข้นสำหรับติดฉลากด้วยอนุภาคทอง (colloidal gold)

2.2 การเชื่อม CTV-IgG กับอนุภาคทอง (Colloidal Gold)

การเชื่อม CTV-IgG เข้ากับอนุภาคทอง มีปัจจัยสำคัญ 2 ประการ คือ ค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ทำให้ IgG เข้าจับกับอนุภาคทองโดยปกติจะค่าใกล้เคียงกับค่า Isoelectric point (PI) ของ IgG ซึ่งเป็นค่าที่ประจุรวมของโปรตีนมีค่าเป็นศูนย์ และ ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของปริมาณ IgG ที่เติมลงในสารละลายอนุภาคทองแล้วไม่ทำให้เกิดการตกตะกอน สำหรับการทดลองนี้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ crude CTV-IgG เพื่อเชื่อมเข้ากับ Colloidal Gold ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40 นาโนเมตร พบว่า crude CTV-IgG ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สารละลายอนุภาคทองยังมีสีออกชมพูออกม่วงเล็กน้อย (pinkish) ไม่เกิดการตกตะกอน (ภาพที่ 4) ซึ่งสารละลายแขวนลอยของทองที่ถูกเชื่อมด้วย 30 ug/ml ของ crude CTV-IgG แล้วมีค่า O.D.523 เท่ากับ 0.428 สำหรับนำไปใช้ในขั้นตอนการเตรียมแผ่น conjugate release pad (CPR) ซึ่งทำหน้าที่ในการเป็นวัสดุกักเก็บรักษาและปลดปล่อย detector antibody



ภาพที่ 4 ลักษณะทางกายภาพสารละลายอนุภาคทองคำก่อนและหลังเติมสารละลาย crude CTV-IgG

ก : สารละลายอนุภาคทองคำที่มีขนาดอนุภาคน้อยกว่า 100 นาโนเมตร มีสีออกแดง

ข : หลังเติม crude CTV-IgG (30 ug/ml) อนุภาคทองคำเปลี่ยนสีออกแดง-ม่วง

ค : หลังเติม crude CTV-IgG (>40 ug/ml) อนุภาคทองคำเปลี่ยนสีฟ้า-เทาและตกตะกอน

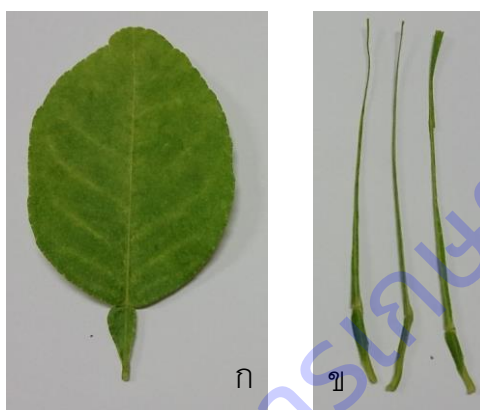
3 การผลิตชุดตรวจ (Strip Test)

ในการประกอบเป็นชุดตรวจสำเร็จรูปมีอุปกรณ์ ดังนี้ 1. แผ่นพลาสติกรองรับ (backing card) 2. แผ่นเมมเบรน (analytical membrane) สำหรับเส้นตรวจ (control line) และเส้นควบคุม (control line) 3. แผ่นเมมเบรนรองรับตัวอย่าง (sample pad) 4. แผ่นเมมเบรนสำหรับกักเก็บรักษาและปลดปล่อย detector antibody (conjugate release pad) 5. แผ่นเมมเบรนสำหรับดูดซับสารละลายตัวอย่าง (absorbent sink) 6. กรอบพลาสติก (cassettes) สำหรับเตรียม conjugate release pad ใช้กระดาษเมมเบรน 3 ชนิด คือ Standard 14, Standard 17, และ Fusion5 (Cytiva, USA) (ตารางที่ 1) พบว่ากระดาษเมมเบรน Standard 14 มีความเหมาะสมสามารถดูดซับและปล่อยสารละลายอนุภาคทองคำที่เชื่อมกับ asCTV-IgG (colloidal gold conjugated-asCTV-IgG) ได้ดี เลือกใช้ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose membrane, NCM) 3 ชนิด คือ AE98, AE100 (Cytiva, USA) และ CN140 (Sartorius, USA) สำหรับเตรียมเส้น test line และ control line (analytical membrane) จากการทดสอบประสิทธิภาพและความไว (sensitivity) ของชุดตรวจโดยใช้ตัวอย่างมะนาวเป็นโรคไวรัส CTV (ภาพที่ 5) พบว่าเมมเบรนชนิด CN140 แสดงผลปฏิกิริยาได้ชัดเจนทั้งในส่วนของเส้น test line และ control ดีกว่าแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน AE98 และ AE100 ผลปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นประมาณ 5-15 นาที (ภาพที่ 6)

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติเมมเบรน (Conjugate Release Pad) จำนวน 3 ชนิด

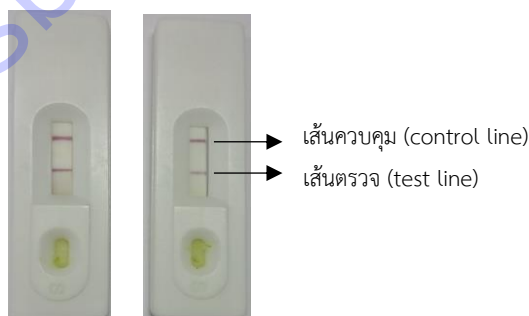
ชนิด CRD	ความหนา um@53kPA	อัตราการน้ำเคลื่อนที่ผ่าน (s/4cm)	อัตราการน้ำถูกดูดซับ (mg/cm)	อัตราการปลดปล่อย GC-IgG (after 90 s)
Standard 14	355	23.1	50.9	75
Standard 17	370	34.5	44.9	75
Fusion5	370	43.9	42.3	>94

ที่มา : Cytiva, USA



ภาพที่ 5 ตัวอย่างมะนาวเป็นโรคไวรัสทริสเทซ่า

- (ก) ใบมะนาวแสดงอาการตามแนวเส้นใบมีลักษณะสีซีดจาง
(ข) เส้นกลางใบมะนาวสำหรับนำไปตรวจด้วยชุดตรวจ



ภาพที่ 6 แสดงการตรวจโรคไวรัส CTV จากตัวอย่างมะนาว

- (ก) ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (analytical membrane) ชนิด CN140
(ข) ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (analytical membrane) ชนิด AE98

การทดลองที่ 2.11 การพัฒนาวิธีการตรวจสอบแมลงวันแดง *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillet) (Diptera: Tephritidae) ด้วยไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (ปีเริ่มต้น 2561 - 2563)

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักถังเปียกซึ่งบรรจุสารล่อเมธิลยูจินอลและคิวลัวร์ จาก 6 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคใต้ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคตะวันตกของไทย นำตัวอย่างที่ได้มาจำแนกชนิดเพื่อใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ พบแมลงวันผลไม้ทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *D. longicornis*, *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau*

2. การเตรียมดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ LCO1490 / HCO2198 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 2) เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (Table1) และจากข้อมูลที่ถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสามารถนำดีเอ็นเอจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาทดสอบกับไพรเมอร์ที่ออกแบบได้

3. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* โดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมของยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *D. longicornis*, *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และรวบรวมลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ GenBank มาจัดลำดับและตรวจหาตำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) ด้วยโปรแกรม Vector NIT (invitrogen) (<https://www.thermofisher.com/th/en/home/life-science/cloning/vector-nti-software.html>) พบตำแหน่ง SNPs ที่มีเฉพาะแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเป็นตำแหน่งที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ มาออกแบบ Forward primer และ Reverse primer ได้ 1 คู่ โดยพบลำดับนิวคลีโอไทด์ร่วมที่ตำแหน่งเริ่มต้นที่ 488 จำนวน 25 คู่เบส และตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 580 จำนวน 22 คู่เบส (Figure 3) เมื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Oligo (version 6.0) (DBA Oligo, Inc., USA) พบว่า % GC ของ Forward และ Reverse primers เท่ากับ 48 และ 59 ตามลำดับ มีค่า melting temperature (Tm) อยู่ที่อุณหภูมิ 53 และ 60 องศาเซลเซียส (Table 2) ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นไม่สามารถจับกันเป็น dimer ได้ ตั้งชื่อ Forward และ Reverse primers แต่ละเส้นว่า (*Zeugodacus cucurbitae* Forward: Zcu-F1 และ *Zeugodacus cucurbitae* Reverse: Zcu-R1) โดยไพรเมอร์คู่นี้สังเคราะห์ให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาดประมาณ

83 คู่เบส จากการวิเคราะห์ไพรเมอร์ทั้งสองเส้นด้วยโปรแกรม Primer map (https://www.bioinformatics.org/sms2/primer_map.html)

พบว่าทุกไพรเมอร์มีตำแหน่งอยู่บนยีน *cox1* ของแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เท่านั้น และเมื่อตรวจสอบความจำเพาะเจาะจงของไพรเมอร์ โดยโปรแกรม BLAST ของฐานข้อมูล GenBank พบว่าไพรเมอร์ทุกเส้นมีความเหมือนที่ 99 -100% กับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จากยีน *cox1* (Table 3)

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae*

เพื่อยืนยันว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีประสิทธิภาพและสามารถใช้ได้จริงโดยทำการทดสอบ 4 กรรมวิธี

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *D. longicornis*, *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบ และตรวจวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่สังเคราะห์ได้จากคู่ไพรเมอร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 83 คู่เบส ที่จำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ได้อย่างชัดเจน และไม่เกิดปฏิกิริยากับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ (Figure 4) แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และมีความเหมาะสมสำหรับการนำไปใช้แยกแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

4.2 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ต่อระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ด้วยเทคนิค PCR กับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ที่เลี้ยงจากห้องปฏิบัติการในระยะไข่ หนอน ดักแด่ และตัวเต็มวัย ระยะละ 50 ตัวอย่าง รวมเป็นจำนวน 300 ตัวอย่าง และตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอขนาด 83 คู่เบส ในทุกระยะการเจริญเติบโต (Figure 5) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และจากการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาตรดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และมีความถูกต้อง 99 - 100%

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations)

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบกับตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จาก 6 ภูมิภาคของประเทศไทย ได้แก่ ภาคใต้ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคตะวันตก ทำการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ภูมิภาคละ 50 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 300 ตัวอย่าง ผลที่ได้

สามารถยืนยันได้ว่าไพรมอร์ที่ออกแบบนั้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* จากภูมิภาคต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Figure 6)

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* กับตัวอ่อนที่พบปนเปื้อนในการส่งออก (intercepted samples)

จากการทดสอบไพรมอร์ที่ออกแบบไว้กับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ที่พบการปนเปื้อนจากผักและผลไม้ที่ต้องการส่งออกไปยังต่างประเทศ จำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง (Table 4) จากการสุ่มตรวจ ณ ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 83 คู่เบส จากตัวอย่างหนอนที่พบการปนเปื้อนในถั่วฝักยาวที่ต้องการส่งออกไปประเทศอังกฤษ และสวิตเซอร์แลนด์ (Figure 7) และยืนยันความถูกต้องโดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100% แสดงให้เห็นว่าไพรมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะกับแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และจากการนำตัวอย่างหนอนที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างบางส่วนมาเลี้ยงไว้เพื่อให้เป็นตัวเต็มวัย และจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐาน และพบว่าผลที่ได้จากนั้นสอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

ปัจจุบันหากมีการสำรวจพบระยะไข่ หรือตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ที่ติดไปกับพืช ผัก และผลไม้ ที่ต้องการส่งออกหรือการนำเข้านั้นใช้การตรวจสอบชนิดศัตรูพืชแบบดั้งเดิมด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของตัวเต็มวัยเพียงเท่านั้น แต่การจำแนกชนิดจากรูปร่างลักษณะของไข่ หรือตัวอ่อนนั้นเป็นเรื่องที่ทำการศึกษายาก เพราะไข่และตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้มีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก (ยุวรินทร์ และคณะ, 2562) ดังนั้นในการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชที่พบในการส่งออกหรือนำเข้านั้น หากมีการสำรวจพบระยะไข่ หรือตัวอ่อนของแมลงวันผลไม้ที่ติดไปกับพืช ผัก และผลไม้ ก็จะทำให้ต้องเสียเวลาในการเลี้ยงเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาประมาณ 1 เดือน ดังนั้นระยะเวลาที่ต้องเสียไปในการเลี้ยงแมลงวันผลไม้ในระยะไข่ หรือตัวอ่อนเพื่อให้เติบโตเป็นตัวเต็มวัยนั้นเป็นสิ่งที่ต้องคำนึงถึงเป็นอย่างมาก เพราะความล่าช้าที่เกิดขึ้นนั้นจะส่งผลกระทบต่อส่งออกและนำเข้าผักและผลไม้ระหว่างประเทศ (Armstrong and Ball, 2005) ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้เทคนิคด้านชีวโมเลกุล เช่นการออกแบบไพรมอร์ที่เจาะจงมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันผลไม้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งปัจจุบันมีการออกแบบไพรมอร์ที่เจาะจงต่อแมลงวันผลไม้เพียง 2 ชนิด ได้แก่ *B. correcta* (Jiang et al., 2013) และ *B. zonata* และ *B. tau* (Asokan et al., 2011) แต่ในปัจจุบันทั่วโลกยังไม่มีข้อมูลการออกแบบไพรมอร์ที่เจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ดังนั้นการศึกษารุ่นนี้เป็นครั้งแรกที่ได้ทำการออกแบบไพรมอร์ที่เจาะจงต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* โดยการประยุกต์หลักการพื้นฐานของกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR กับ species specific DNA Barcode และใช้เพียงขั้นตอนการทำปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการระบุชนิดแมลงวันผลไม้จะสั้นมากเพียง 2-3 ชั่วโมง เท่านั้น ก็สามารถตรวจวินิจฉัยยืนยันได้ว่าเป็นแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* หรือไม่ นอกจากนี้ไพรมอร์ที่ออกแบบนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต ไม่ว่าจะเป็นระยะ ไข่ หนอน ดักแด้

หรือตัวเต็มวัย จึงสามารถได้ว่าแมลงวันผลไม้ที่ตรวจพบนั้นเป็นแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* หรือไม่ จากประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความเจาะจง มีความรวดเร็ว และประหยัดเวลาในการตรวจวินิจฉัยนั้น ก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างยิ่งในการพัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชเพื่อการส่งออกและนำเข้าของประเทศไทย

การทดลองที่ 2.12 การผลิตโปรตีนและแอนติบอดีที่จำเพาะ ต่อ immunodominant membrane protein (Imp) ของเชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยอาศัยระบบเซลล์แบคทีเรีย (ปีเริ่มต้น 2562 - 2564)

1. ผลการเพิ่มบริเวณจดจำของ restriction enzyme site กับไพรเมอร์

ไพรเมอร์ที่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่บริเวณ 5' และบริเวณ 3' ได้แก่ *XhoI* (5'-C/TCGAG -3' 3'-GAGCT/C-5') และ *EcoRI* (5'-G/AATTC-3' 3'-CTTAA/G-5') ตามลำดับ และและเพิ่มตำแหน่ง ATG (start codon) บริเวณ 5' และ TAA (stop codon) บริเวณ 3' ของคู่ไพรเมอร์ และนำคู่ไพรเมอร์ IMP3-F (*XhoI*) และ IMP3-R (*EcoRI*) มาสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอ *imp* gene PstI/*EcoRI* (*imp* gene adapter) ที่ขนาดประมาณ 500 bp (Table 2) เมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA Ladder

Table 2 Primers for *imp* gene-adapter synthesis (IMP3-F (*XhoI*) / IMP3-R (*EcoRI*))

Primer Name	Primer Sequences 5' → 3'	bp	Tm °C
IMP3-F (<i>XhoI</i>)	5' CTATG C/TCGAG ACTACTATGCAAA ATGAAAATTTTT G 3'	36	64-67
IMP3-R (<i>EcoRI</i>)	5' ATC ATC ACC G/AATTC CTCATTAATT AATTTCTAAATCACT 3'	40	

หมายเหตุ

<i>XhoI</i>	คือ	5' C ↓ TCGAG 3'
<i>EcoRI</i>	คือ	5' G ↓ AATTC 3'
START codon	คือ	ATG
STOP codon	คือ	TTA

2. ผลการสังเคราะห์ *imp* gene-adapter เชื้อไฟโตพลาสมา ด้วยเทคนิค PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอ *imp* gene มาสังเคราะห์เชื้อไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพรเมอร์ IMP3-F (*XhoI*) และ IMP3-R (*EcoRI*) เมื่อตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า แลกดีเอ็นเอ *imp* gene *XhoI/EcoRI* (*imp* gene adapter) ขนาดที่ประมาณ 500 bp (fig 2) ซึ่งขนาดของแลกดีเอ็นเอที่ได้เทียบเท่าหรือใกล้เคียงกับขนาดของ *imp* gene เนื่องจากลำดับเบสที่เป็นตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XhoI* (C/TCGAG) และ *EcoRI* (G/AATTC) บริเวณปลาย 5'

ของคูไพรเมอร์มีจำนวนเพียง 6 เบสเท่านั้น จึงไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดแถบดีเอ็นเอเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

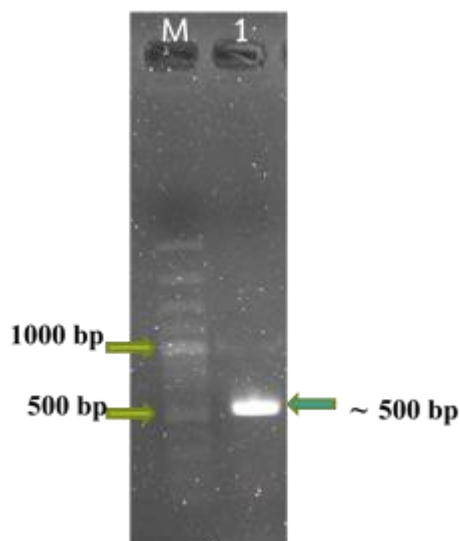


fig 2 Gel electrophoresis of *imp* gene *Xho*/EcoRI (*imp* gene adapter) using IMP3-F (*Xho*)/IMP3-R (EcoRI)

M = 100 bps DNA Ladder (fermentas®)

1 = Amplicon of *imp* gene adapter showed about 500 bp

3. ผลการโคลนยีนเข้า Expression vector

ตัดชิ้นยีน *imp* gene-adapter และพลาสมิดพาหะ pBad/HisA Expression vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I และ EcoRI แบบ Double digestion ทำการเชื่อมต่อด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase โคลนยีนเข้าแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Top 10 คัดเลือกด้วยเทคนิค colony PCR โดยคูไพรเมอร์ pBAD-F/pBAD-R พบว่าโคโลนีแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดสายผสมของชิ้น *imp* gene/6xHisTag จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ ~ 800 เบส เมื่อเทียบกับโคโลนีแบคทีเรียปกติที่ได้รับเฉพาะพลาสมิด Expression vector จะแสดงแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 303 เบส (**fig 3**) เมื่อทำการตรวจตำแหน่ง frame shift ของการแปลรหัสลำดับอะมิโนพบการจัดเรียงกรดอะมิโนได้ถูกต้องจำนวน 204 เรซิดิวส์ (**fig 4**) และพบตำแหน่งอะมิโนของ HHHHHH-Polyhistidine Region (6xHisTag) เพื่อประโยชน์สำหรับการเตรียมโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยระบบ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.)

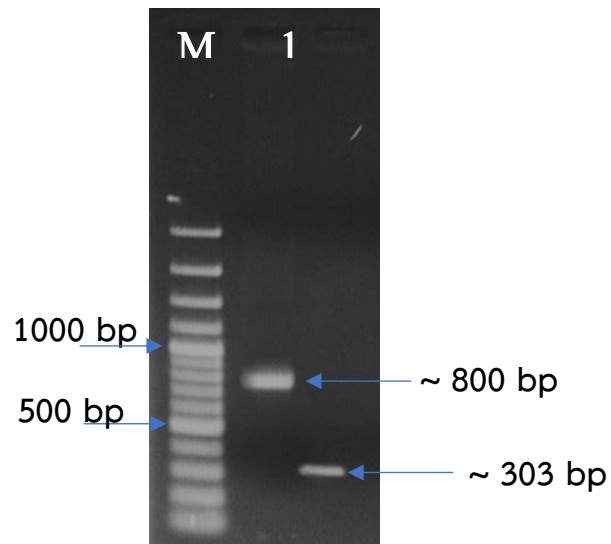


Figure 3 Gel electrophoresis of imp gene /6xHisTag plasmid using pBad-F / pBad-R primers by colony PCR

- M = 100 bp DNA Ladder (fermentas®)
 1 = pBad/HisA Expression vector inserted with imp gene /6xHisTag
 ~ 800 bp
 2 = pBad/HisA Expression vector without imp gene /6xHisTag 303 bp

5'3' Frame 1

MGGSHHHHHHGMASMTGGQQMGRDLYDDDDKDRWGSELETT**M**QN
 ENFWYTKKGKIAIITSSVVGFLAILLLTIAYYLKWWPFSKTLNEK
 TIKKFEKEIVLKSITEEEEVSDADKAEKALKELKGKKSQIEKLLG
 IVEKHNKKS PADKKVKDATIETFNSIVKSIGELKVDKSNYTKSD
 FKDKYNLAADSSKLSTAFSNLKS DLEIK

Figure 4 The amino acid sequences of imp gene from sugarcane white leaf phytoplasma with 6xHisTag.

4. การตรวจสอบคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม ProtScale (<https://web.expasy.org/protscale/>) พบว่าโปรตีนของ IMP recombinant protein จำนวน 204 เรซิดิวส์ มีความสามารถในการละลายน้ำได้ค่อนข้างดี โดยพิจารณาจากจำนวน amino acid position เป็นกลุ่มที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) (แสดงค่าต่ำกว่า 0 หรือค่าเป็น -) มีปริมาณมากกว่ากลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) (แสดงมากกว่า 0 หรือค่าเป็น +) และเมื่อพิจารณาสายเปปไทด์ทั้งเส้นแล้วสามารถประเมินได้ว่า Imp recombinant protein ยังคงละลายน้ำได้ค่อนข้างดี เมื่อตรวจสอบสภาพทางกายภาพต่างๆ ของโปรตีนด้วยโปรแกรม ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) แสดงค่า Grand average of hydropathicity เป็นค่า -0.698 (fig 5)

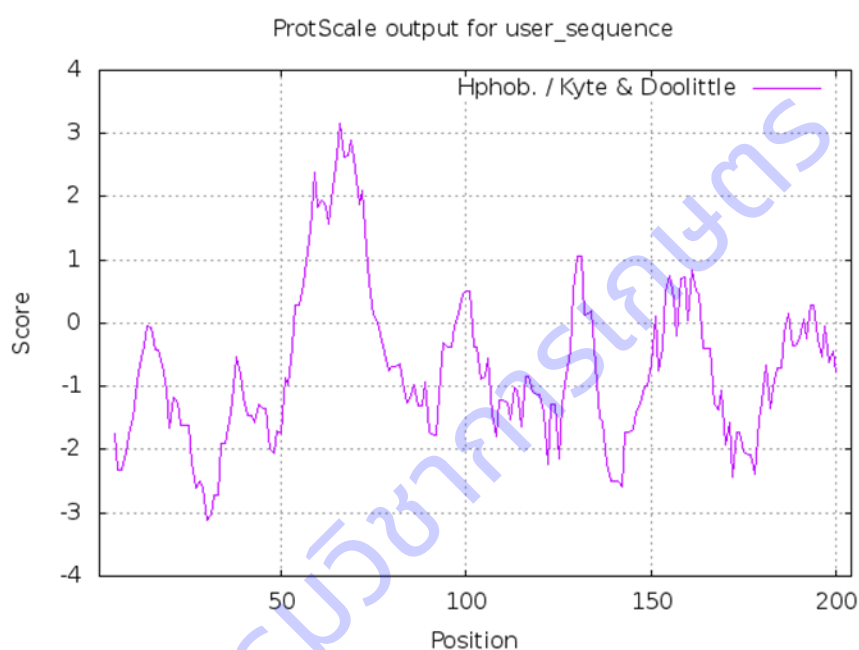


Figure 5 The line graph produced from imp amino acid sequence to estimate the hydrophobicity or hydrophilicity using ProtScale and ProtParam programmes.

- Number of amino acids : 204
- Molecular weight : 23.14 kDa
- Theoretical pI : 8.92
- Formula $C_{1035}H_{1649}N_{273}O_{317}S_5$
- Grand average of hydropathicity : -0.698

5. ผลการแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

ผลการแยกสกัดโปรตีนลูกผสม (fusion protein) ให้บริสุทธิ์ด้วยการผสมกับ ProBond™ Nickel-Chelating Purification System (Invitrogen, USA.) ทำการวิเคราะห์ปริมาณและความบริสุทธิ์ของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนที่ขนาดประมาณ 23 กิโลดาลตัน (โปรตีน Imp-Protein ขนาดประมาณ 18 กิโลดาลตัน และโปรตีน pBAD/HisA-6xHisTag ขนาดประมาณ 5 กิโลดาลตัน) วัดความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสมด้วยเครื่อง Microplate spectrophotometer (Multiskan™ Go, Thermo Scientific, USA) ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร พบว่ามีความเข้มข้นค่อนข้างต่ำเพียง 0.140 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และมีการปนเปื้อนของโปรตีนอื่น ๆ ค่อนข้างมาก โดยทั่วไปความเข้มข้นของโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการฉีดกระต่ายเพื่อแอนติบอดีอยู่ระหว่าง 0.3 – 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (300 – 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สำหรับใช้เป็นแอนติเจนฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง

6. ผลตรวจวัดค่าไตเตอร์โพลีโคลนอลแอนติบอดี

ผลการตรวจวัดค่าไตเตอร์ที่เหมาะสมของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิต ด้วยเทคนิค Indirect ELISA หลังฉีด IMP recombinant protein (Imp-adapter gene/6xHisTag) ของเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยเข้ากล้ามเนื้อให้กระต่ายทดลองพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White) จำนวน 3 ครั้ง เก็บเลือดและแอนติซีรัม รวมจำนวน 1 ครั้งได้ปริมาตรน้ำเลือด รวม 10 มิลลิลิตร สามารถให้แอนติซีรัมปริมาตรรวม 2 มิลลิลิตร นำไปทดสอบค่าไตเตอร์ แบบ two-fold dilutions ด้วยเทคนิค indirect ELISA อัตราตั้งแต่ 1:128 - 1:16,384 เท่า เมื่ออ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร พบว่า โพลีโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMP ที่ผลิตให้ค่าความเจือจางสูงสุดที่สามารถแสดงผลของปฏิกิริยาได้ชัดที่ระดับประมาณ 500-1000 เท่า



Figure 6 The two-fold dilution of pAbs-SWL-IMP against sugarcane whiteleaf disease tested with Indirect ELISA

7. ผลทดสอบประสิทธิภาพความจำเพาะโพลิโคลนอลแอนติบอดี

ตรวจสอบความจำเพาะโพลิโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMP ต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ด้วยเทคนิค Indirect ELISA โดยเลือกค่าความเจือจางแอนติซีรัมที่ 1:500 เท่า ทำการทดสอบกับน้ำคั้นจากใบอ้อยที่แสดงอาการใบขาวชัดเจนเมื่ออ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 1.3

การทดลองที่ 2.13 การตรวจสอบแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR (ปีเริ่มต้น 2562 - 2564)

1. เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

นำเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) จากศูนย์เก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช ของกรมวิชาการเกษตร มาเลี้ยงบนอาหาร Wakimoto's medium (PSA) เพื่อใช้ในการทดลอง

2. การแยก genomic DNA ของเชื้อ Xcc ให้บริสุทธิ์

แยก genomic DNA ของเชื้อ Xcc ตามวิธีการสกัด DNA โดยใช้ Phenaol : Chloroform และการแยก genomic DNA โดยใช้ชุด PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen จากนั้นนำ genomic DNA ของเชื้อ Xcc ที่แยกได้จากทั้ง 2 วิธี ไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

3. การตรวจสอบ genomic DNA ของ Xcc ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

การทดสอบทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DLH120 : 5'CCGTAGCACTTAGTGCAATG 3' DLH125 : 5'GCATTTCCATCGGTCACGATTG 3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *X. campestris* จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน *hrpF* และใช้คู่ไพรเมอร์ DLH109 : 5'-ATGTCGCTCAACACGCTTTC-3' DLH112 : 5'-GTTTTGCGTGAGCCCTTGC-3' เป็นคู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Brassica* spp. จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร (19 ul reaction mixture + 1 ul genomic DNA) โดยใช้สภาวะปฏิกิริยา PCR อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 94 องศาเซลเซียส 1 นาที 60 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 30 รอบ และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำ PCR product ที่ได้ไปรันเจลอีแอกโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH120/DLH125 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 619 คู่เบส (ภาพที่ 1) และผลการตรวจด้วยคู่ไพรเมอร์ DLH109/DLH112 ได้ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยา PCR ขนาด 1,400 คู่เบส (ภาพที่ 2)

4. การเลือกคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

สืบค้นข้อมูลไพรเมอร์ที่มีรายงานว่าสามารถใช้ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค Real-time PCR ได้ผลดี มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อแบคทีเรีย Xcc คัดเลือกไพรเมอร์และนำลำดับเบสของไพรเมอร์ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ Xcc ดังนี้

Xcc (*hrpF*)

DLH153

GTAATTGATACCGCACTGCAA

DLH154	CACCGCTCCAGCCATATT
Brassica spp. (ITS)	
DLH155	CAACGGATATCTCGGCTCTC
DLH156	TTGCGTTCAAAGACTCGATG

5. ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา real-time PCR

การทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ทำในสภาพพลาสติกหลุมขนาด 96 หลุม (LightCycler®480 Multiwell Plate 96, Roche) ใช้ปริมาณรวมของปฏิกิริยา จำนวน 20 ul ประกอบไปด้วย 1X LightCycler SYBR Green, Roche Diagnostic (FastStart Taq DNA polymerase, Reaction buffer, dNTP mix (with dUTP instead of dTTP) และ 6.4 mM MgCl₂) สำหรับคู่ primer DLH153 และ DLH154 ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.1- 0.4 uM (ปรับเปลี่ยนความเข้มข้นเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา) และ 1-5 ul DNA ของ Xcc แล้วนำไปเข้าเครื่อง real-time PCR (LightCycler® 480 System, Roche) โปรแกรมสำหรับปฏิกิริยา real-time PCR พบว่าโปรแกรมที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา Real time PCR คือ

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:02:30	4.40	none
Amplification	30	95	00:00:20	4.40	none
		60	00:00:20	2.20	none
		72	00:00:15	4.40	none
Melting curve	1	80	00:00:15	4.40	single
		95	00:00:15	4.40	none
		40	00:00:15	2.20	none
Cooling	1	95	00:00:00	0.11	continuous
		40	00:00:30	2.20	none

ในขณะที่ทำปฏิกิริยา SYBR green fluorescence จะแทรกเข้าไปในสาย DNA ที่มีการเพิ่มปริมาณผลผลิต PCR ในแต่ละรอบ โดยเครื่องจะตรวจติดตามการเพิ่มปริมาณ DNA เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น และแสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semi log curve) ของ SYBR green fluorescence ที่เกิดสะสมในแต่ละรอบของปฏิกิริยา Real time PCR ซึ่ง crossing point (Cp) ของแต่ละกราฟเส้นโค้งจะแสดงจำนวนรอบถึงระดับการสะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิต PCR เป้าหมาย (ภาพ 3) และใช้ค่า melting curve เป็นเกณฑ์ในการตรวจสอบการมีหรือไม่มีผลผลิต PCR เป้าหมาย พบว่าค่า Tm ของคู่ไพรเมอร์ DLH153 และ DLH154 ที่ความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc เท่ากับ 85.4 °C (ภาพที่ 4 และภาพ 5)

6. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

6.1 ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

นำดีเอ็นเอของ Xcc มาทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม นำไปทดสอบปฏิกิริยา real-time PCR ตามสถานะของปฏิกิริยา real-time PCR ที่เหมาะสม พบว่าปฏิกิริยา real-time PCR มีความไวในการตรวจ DNA ได้ที่ความเข้มข้น 500 พิโคกรัม (ภาพที่ 6)

6.2 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา real-time PCR

ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer พบว่าคู่ primer สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย Xcc ได้แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA จาก DNA ต้นแบบและเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ *X. axonopodis pv citri*, *X. axonopodis pv vesicatoria*, *X. axonopodis pv glycines*, *X. axonopodis pv dieffenbachiae*, *X. oryzae pv oryzae*, *X. oryzae pv oryzicola*, *Erwinia spp.* และแบคทีเรียที่แยกได้จากผิวใบคะน้าได้ (ภาพที่ 7)

7. ใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้า

จากผลการใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้าที่ปลูกเชื้อ Xcc ลงเมล็ดปริมาณเชื้อ 10^4 หน่วยโคลน/เมล็ด แล้วนำเมล็ดคะน้าที่ติดเชื้อไปเพิ่มในเมล็ดคะน้าที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว โดยเพิ่มในอัตราส่วน 1:100 1:1,000 และ 1:10,000 ต่อจำนวนเมล็ดดี ผลการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าวิธีการนำเมล็ดคะน้าไปแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) และเติม 0.02 % Tween 20 แช่ 2.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอน ละลายตะกอนด้วย 0.85% NaCl สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่อัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 ส่วนวิธีการนำเมล็ดคะน้าบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดแล้วนำไปตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสไหลลดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ทิ้งส่วนตะกอน นำตัวอย่างที่ได้ไปทำปฏิกิริยา real-time PCR พบว่าสามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่อัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี 1:100, 1:1,000 และ 1:10,000 ได้ผลเช่นเดียวกับวิธีการล้างเมล็ดด้วย 0.85% NaCl เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR พบว่าตรวจพบเชื้อ Xcc ที่ 1:100 จากทั้งสองวิธี แต่การแยกเชื้อ Xcc บนอาหาร semi-selective ไม่สามารถแยกเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดคะน้าได้ (ภาพ 8)

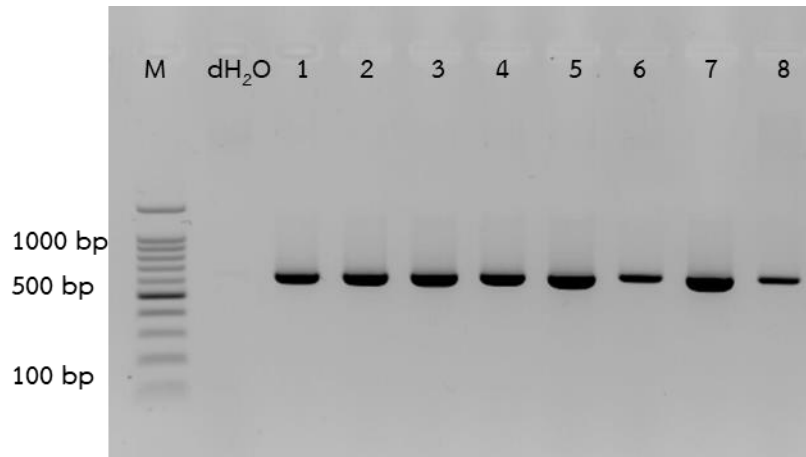
8. ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้า

จากผลการทดสอบความไวของปฏิกิริยา real-time PCR ในการตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้าโดยนำเมล็ดคะน้าที่ติดเชื้อไปเพิ่มในเมล็ดคะน้าที่ในอัตราส่วน 1:100 1:1,000 และ 1:10,000 นำตัวอย่างที่ได้จากวิธีการแช่และวิธีการบดเมล็ดทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} - 10^{-8} แล้วนำไปทำปฏิกิริยา real-time PCR พบว่าจากวิธีการแช่เมล็ดคะน้าใน 0.85% NaCl สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่อัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี 1:100 ได้ที่ค่าการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-3} และ 1:1,000 ที่ค่าการเจือจาง

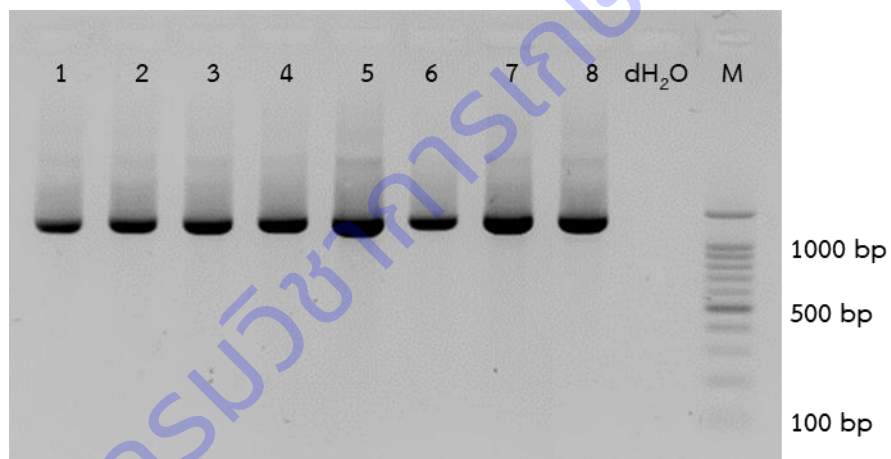
10^{-1} - 10^{-2} และ 1:10,000 วิธีการบดเมล็ดคั่วด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 สามารถตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc ที่อัตราส่วนเมล็ดตีดติดเชื้อต่อเมล็ดดี 1:100 ได้ที่ค่าการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-3} และ 1:1,000 ที่ค่าการเจือจาง 10^{-1} - 10^{-3} และที่ 1:10,000 (ภาพ 9)

9. ใช้เทคนิค real-time PCR ตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคั่วที่สุ่มตรวจ

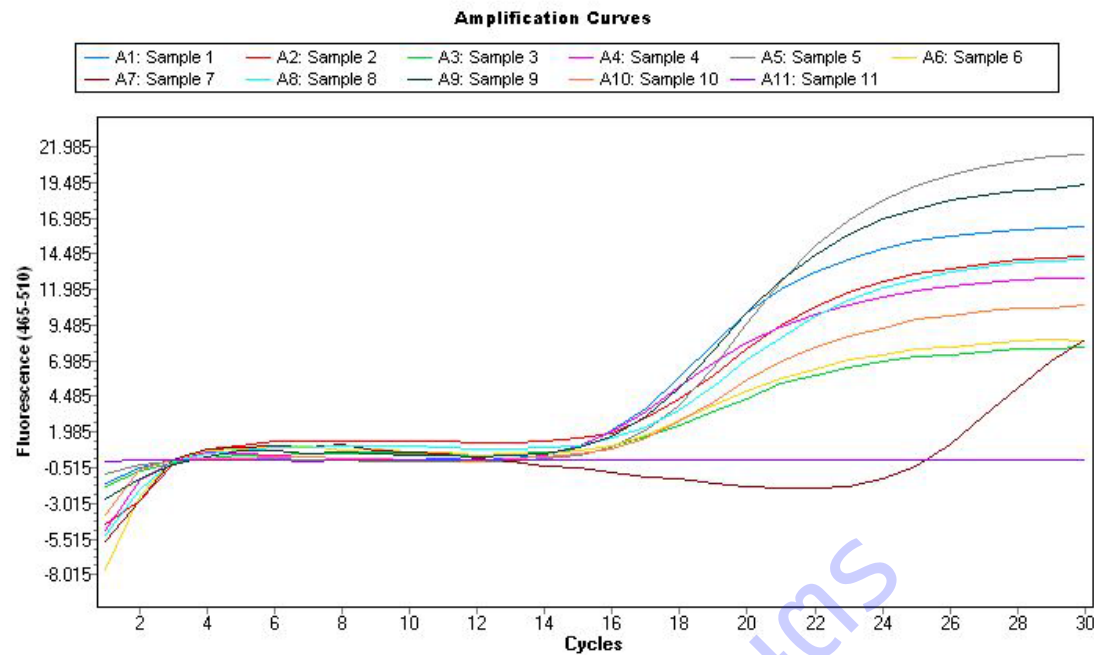
สุ่มตัวอย่างเมล็ดคั่วที่มีจำหน่ายเป็นการค้าจำนวน 30,000 เมล็ด (น้ำหนักประมาณ 150 กรัม) แบ่งออกเป็น 3 ตัวอย่างย่อย ตัวอย่างละ 10,000 เมล็ด จำนวน 2 ชุด ตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association) ชุดที่ 1 นำตัวอย่างเมล็ดไปทำตามขั้นตอนการแช่ใน 0.85% NaCl (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่อ 1,000 เมล็ด) แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} - 10^{-8} เปรียบเทียบกับชุดที่ 2 นำตัวอย่างเมล็ดคั่วไปทำตามขั้นตอนการบดด้วย phosphate buffer saline pH 7.0 แล้วทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} - 10^{-8} ผลการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากตัวอย่างเมล็ดคั่วทั้งสองชุดที่ความเข้มข้นสูงสุด เมื่อทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution 10^{-1} - 10^{-8} พบว่าตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากตัวอย่างเมล็ดคั่วทั้งสองชุด เมื่อเปรียบเทียบกับผลการตรวจด้วยเทคนิค conventional PCR และการแยกเชื้อด้วยอาหาร semi-selective พบว่าทั้งสองวิธีตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรีย Xcc (ภาพ 10)



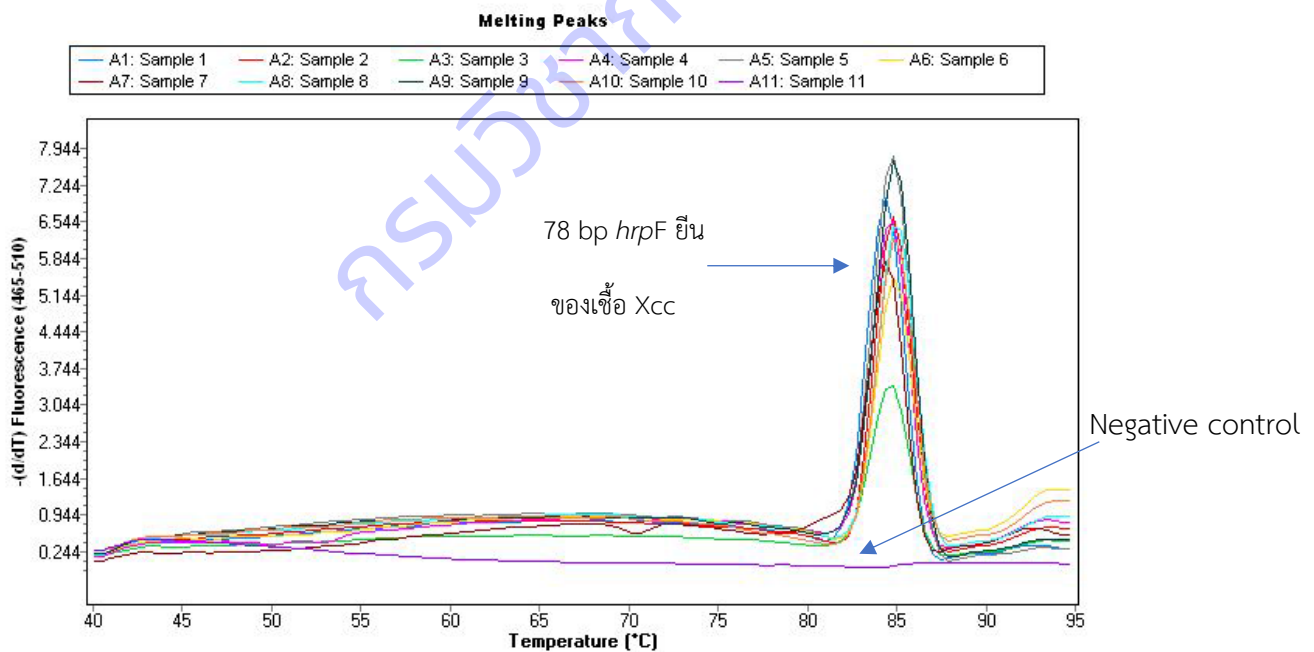
ภาพที่ 1 ผลิตรหัสจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DLH120/DLH125 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน *hrpF* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 619 คู่เบส



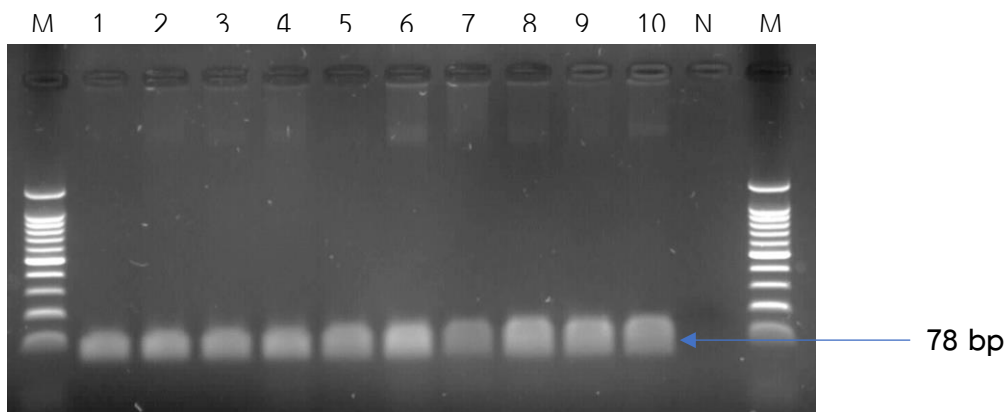
ภาพที่ 2 ผลิตรหัสจากปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ DLH109/DLH112 ที่จำเพาะต่อ *Brassica* spp. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน *ITS* ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1.4 kb



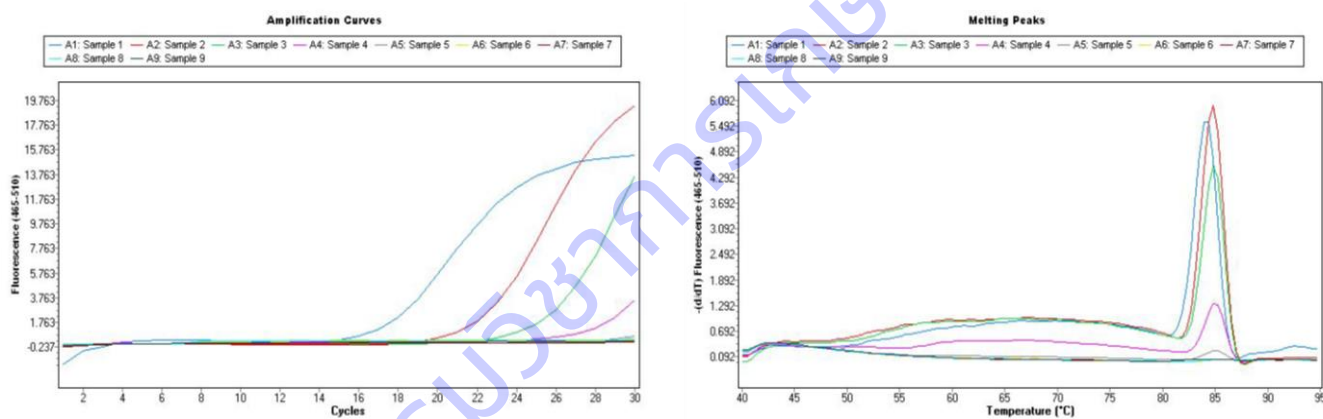
ภาพที่ 3 แสดงผลเป็นกราฟเส้นโค้ง (semi log curve) ค่า crossing point (Cp) ของแต่ละกราฟเส้นโค้งจะแสดงจำนวนรอบถึงระดับการสะสมของ SYBR green fluorescence ในผลผลิต PCR เป้าหมาย



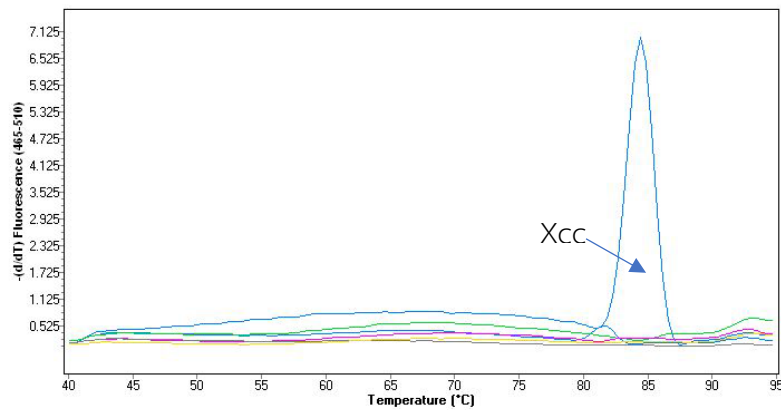
ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิต PCR ที่ได้จากคูไพรเมอร์ DLH153 และ DLH154 ที่ความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc พบว่ามีค่า T_m เท่ากับ $85.4\text{ }^{\circ}\text{C}$



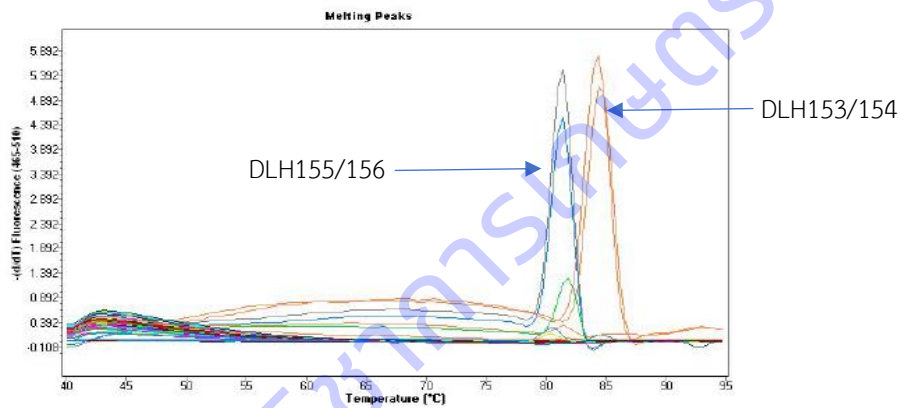
ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ melting curve ของผลผลิต PCR ที่ได้จากคูไพรเมอร์ DLH153 และ DLH154 ที่ความจำเพาะต่อแบคทีเรีย Xcc พบว่ามีค่า T_m เท่ากับ $85.4\text{ }^{\circ}\text{C}$



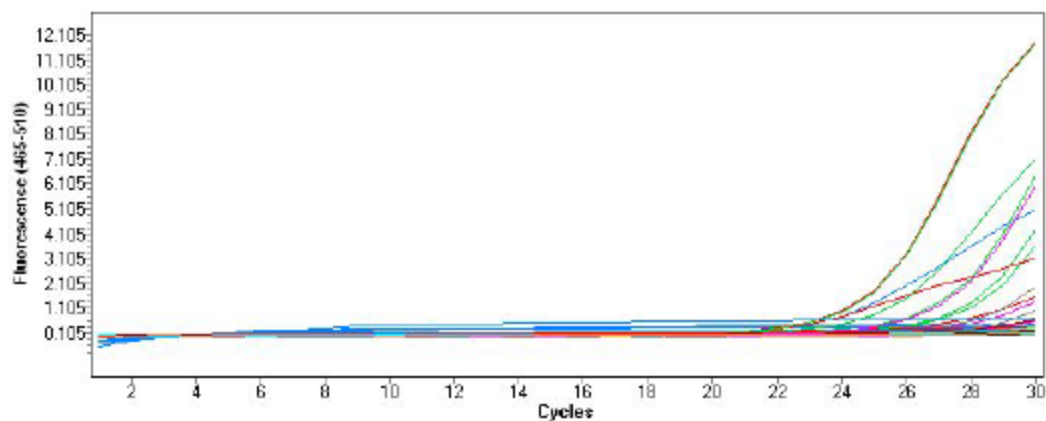
ภาพที่ 6 ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR นำดีเอ็นเอของ Xcc มาทำการเจือจางแบบ 10-fold dilution ให้มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม



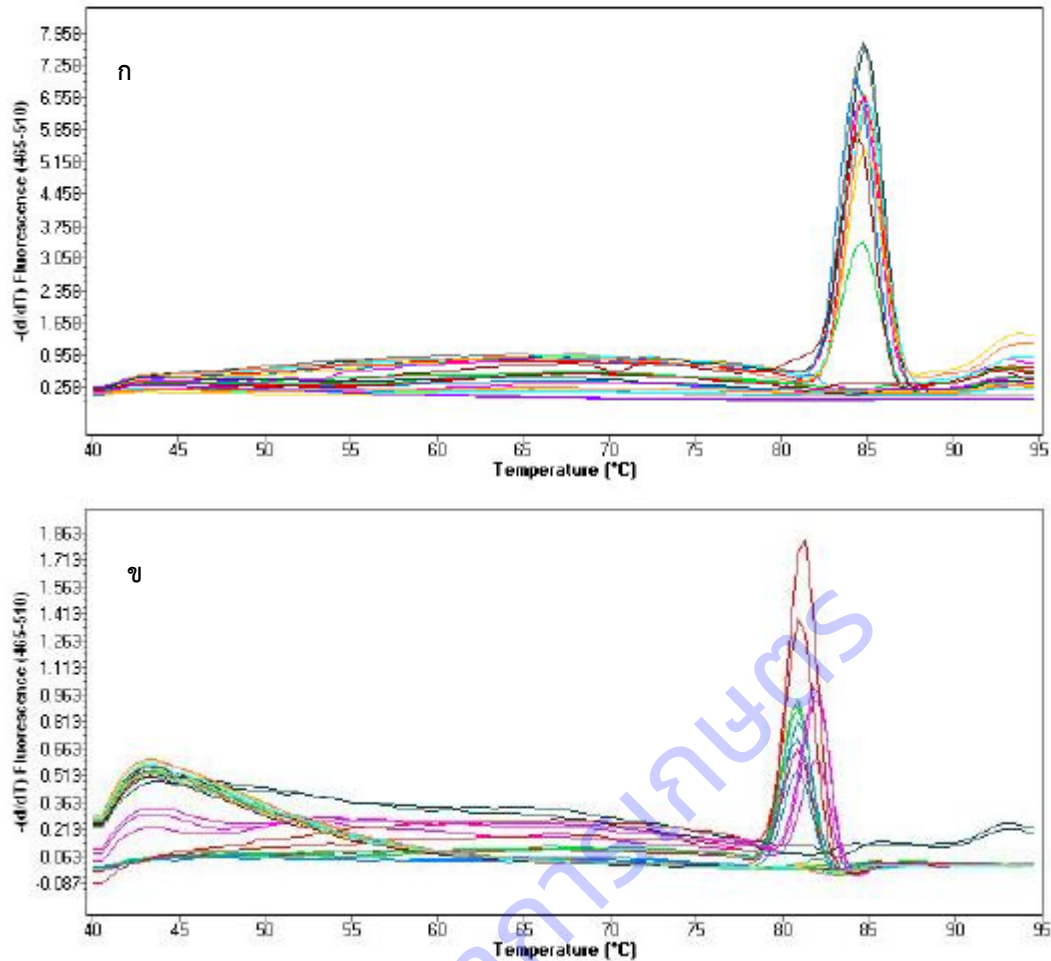
ภาพที่ 7 ทดสอบความจำเพาะ (specificity) ของปฏิกิริยา real-time PCR



ภาพที่ 8 การตรวจเชื้อแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดค่น้ำด้วยเทคนิค real-time PCR ด้วยคูไพรเมอร์ DLH153 และ DLH154 ที่จำเพาะต่อยีน *hrpF* ของแบคทีเรีย Xcc ซึ่งมีค่า melt temperature (t_m) เท่ากับ 85.4°C และคูไพรเมอร์ DLH155 และ DLH156 ที่จำเพาะต่อยีน *ITS* ของ *Brassica* spp. สำหรับเป็น internal control ซึ่งมีค่า melt temperature (t_m) เท่ากับ 84.5°C



ภาพที่ 9 ทดสอบความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา real-time PCR



ภาพที่ 10 ผลการตรวจแบคทีเรีย Xcc จากเมล็ดคะน้าที่สุ่มตรวจตามวิธีมาตรฐานของ ISTA (International Seed Testing Association) ด้วยเทคนิค Real-time PCR

ก) คู่ไพรเมอร์ DLH153: GTAATTGATACC GCACTGCAA และ DLH154: CACCGCTCC AGCCATATT ที่จำเพาะต่อยีน *hrpF* ของแบคทีเรีย Xcc ซึ่งมีค่า melt temperature (t_m) เท่ากับ 85.4°C

ข) คู่ไพรเมอร์ DLH155: CAACGGATATCTCGG CTCTC และ DLH156: TTGCGTTCAAAG ACTCGATG ที่จำเพาะต่อยีน *ITS* ของ *Brassica* spp. สำหรับเป็น internal control ซึ่งมีค่า melt temperature (t_m) เท่ากับ 84.5°C

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความไวในการตรวจแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* จากเมล็ดคะน้าด้วยเทคนิค Real-time PCR และ Conventional PCR

Sample	Infection rate	Conventional PCR	Real-time PCR	Real-time PCR Ct Value	
				<i>Xcc hrpF</i>	<i>Brassica</i> spp. ITS
Washed in 0.85% NaCl	1 : 100	+	+	23.83	25.00
grinding in PBS buffer	1 : 100	+	+	22.23	25.00
Washed in 0.85% NaCl	1 : 1,000	-	+	29.24	25.00
grinding in PBS buffer	1 : 1,000	-	+	29.13	25.00
Washed in 0.85% NaCl	1 : 10,000	-	+	30.13	25.00
grinding in PBS buffer	1 : 10,000	-	+	30.00	25.00
Washed in 0.85% NaCl	Naturally infected	-	+	27.08	25.00
grinding in PBS buffer	Naturally infected	-	+	27.08	25.00
Xcc DNA extract	NA	+	+	17.02	ND

การทดลองที่ 2.14 การตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิคแลมป์ (ปีเริ่มต้น 2562 - 2564)

1. การเก็บตัวอย่างดิน การแยกไส้เดือนฝอยออกจากตัวอย่างดิน การเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย

เก็บตัวอย่างดินจากสวนฝรั่งจำนวน 24 ตัวอย่าง จาก อ. สามพราน จ. นครปฐม 5 ตัวอย่าง อ. บ้านแพ้ว จ. สมุทรสาคร 4 ตัวอย่าง อ. กระทุ่มแบน จ. สมุทรสาคร 15 ตัวอย่าง แยกไส้เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม 16 ตัวอย่าง ปลูกมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ ในตัวอย่างดินที่ตรวจพบไส้เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ครบวงจรชีวิตและสร้างกลุ่มไข่ เพื่อใช้เตรียมประชากรไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์โดยการเลี้ยงจาก 1 กลุ่มไข่ เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปมได้ 9 ตัวอย่าง จาก ต.หนองนกไข่ อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร 4 ตัวอย่าง ต.เกษตรพัฒนา อ.บ้านแพ้ว จ.สมุทรสาคร 3 ตัวอย่าง ต.ท่าไม้ อ.กระทุ่มแบน จ.สมุทรสาคร 1 ตัวอย่าง และ ต. บ้านใหม่ อ. สามพราน จ. นครปฐม 1 ตัวอย่าง (Table 1)

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานของไส้เดือนฝอยรากปมที่ได้ จาก perineal pattern ของตัวเต็มวัย เพศเมีย ลักษณะของตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวอ่อนระยะที่สอง เปรียบเทียบกับ OEPP/EPPO Bulletin (2016) 46 (2), 190-201 พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* (Figure 2)

ตัวเต็มวัยเพศเมีย

Perineal pattern มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ส่วน dorsal arch ค่อนข้างสูงส่วนใหญ่มีลักษณะโค้งมน

ตัวเต็มวัยเพศผู้

มี labial disk ลักษณะกลมมีขนาดใหญ่ซึ่งรวมเข้ากับ medial lips กลายเป็น dorsoventrally elongate lip region ส่วน labial disk นูนขึ้นเล็กน้อย medial lips มีลักษณะ crescent-shaped ส่วน lip region มีลักษณะสูง โค้งมน แยกออกจากลำตัวเล็กน้อย ทางสั้นโค้งมน phasmids มีขนาดเล็ก ลักษณะเป็นรู อยู่ระดับเดียวกับ anus

ตัวอ่อนระยะที่สอง

ยาวประมาณ 436.6 (405.0-472.9) ไมโครเมตร hemizonid อยู่เหนือ excretory pore ประมาณ 1-2 annules lateral lips มีขนาดใหญ่ ลักษณะเป็นสามเหลี่ยม ส่วนหัวมีลักษณะปลายตัด (truncate) stylet knob ใหญ่และกลม ทางแหลม ปลายหางมน ส่วน hyaline tail terminus ชัดเจน

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยรากปมระยะที่สอง และตรวจสอบชนิดด้วยเทคนิค PCR

สกัดดีเอ็นเอใช้วิธีการตาม Schizas *et al.*, 1997 ร่วมกับคำแนะนำของ GeneReleaser® (BioVentures) นำไปตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้คู่ไพรเมอร์ MK7-F/MK7-R และคู่ไพรเมอร์ Me-F/Me-R ทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำ PCR product ที่ได้ไปตรวจด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1.5% agarose gel ใน 0.5x TBE buffer กระแสไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์เป็นเวลา 30 นาที ตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปมด้วยคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อ *M. enterolobii* โดยคู่

ไพรเมอร์ Me-F/Me-R ได้ผลผลิตจากปฏิกิริยาขนาด 236 คู่เบส และคู่ไพรเมอร์ MK7-F/MK7-R ผลิตจากปฏิกิริยาขนาด 520 คู่เบส ซึ่งตรงกับ *M. enterolobii* (Figure 3)

3. การทดสอบเทคนิคแลมป์พีซีอาร์

เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* แต่ละไอโซเลต สกัดดีเอ็นเอจากไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* และไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ เช่น *M. incognita* และ *M. javanica* และไส้เดือนฝอยชนิดต่าง ๆ สำหรับการทดสอบความจำเพาะเจาะจง

การทดสอบสภาวะที่เหมาะสม

ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา LAMP-PCR ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Figure 4)

การทดสอบความไว (sensitivity)

ทดสอบความไวของปฏิกิริยา โดยการทำให้ 10-fold dilution ของดีเอ็นเอไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* โดยใช้ดีเอ็นเอความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เปรียบเทียบกับวิธี conventional PCR (ใช้ไพรเมอร์ MeF3/B3) พบว่าสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอของ *M. enterolobii* ได้ถึงความเข้มข้น 15 พิโคกรัม (Figure 5)

การทดสอบความจำเพาะเจาะจง (specificity)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของเทคนิคแลมป์พีซีอาร์ โดยทดสอบกับดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดอื่น ๆ ไส้เดือนฝอยศัตรูพืชสกุลอื่น ๆ เช่น *Radopholus Pratylenchus Hirschmaniella Rotylenchulus Tylenchorhynchus Helicotylenchus* รวมทั้งไส้เดือนฝอยที่ไม่ใช่ศัตรูพืชชนิดต่างๆ ที่มักพบในตัวอย่างดิน ซึ่งเป็นตัวอย่างไส้เดือนฝอยจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศไทย พบว่าเทคนิคแลมป์พีซีอาร์มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* (Figure 6)

Table 1 Number of samples and locations.

No.	Location			RKN detection	Me Morpho logical ID	Me PCR ID
	Sub District	District	Province			
1	Ban Mai	Sam Phran	Nakhon Pathom	✗	✗	✗
2	Ban Mai	Sam Phran	Nakhon Pathom	✓	✓	✓
3	Tha Mai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
4	Ban Mai	Sam Phran	Nakhon Pathom	✗	✗	✗
5	Bang Chang	Sam Phran	Nakhon Pathom	✗	✗	✗
6	Bang Chang	Sam Phran	Nakhon Pathom	✗	✗	✗
7	Kaset Phatthana	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✓	✓	✓
8	Kaset Phatthana	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✓	✓	✓
9	Kaset Phatthana	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✓	✓	✓
10	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
11	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
12	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗
13	Khlong Tan	Ban Phaeo	Samut Sakhon	✗	✗	✗
14	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗
15	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗
16	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
17	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗
18	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗
19	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗
20	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✓	✓	✓
21	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗
22	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗
23	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗
24	Nong Nok Khai	Krathum Baen	Samut Sakhon	✗	✗	✗

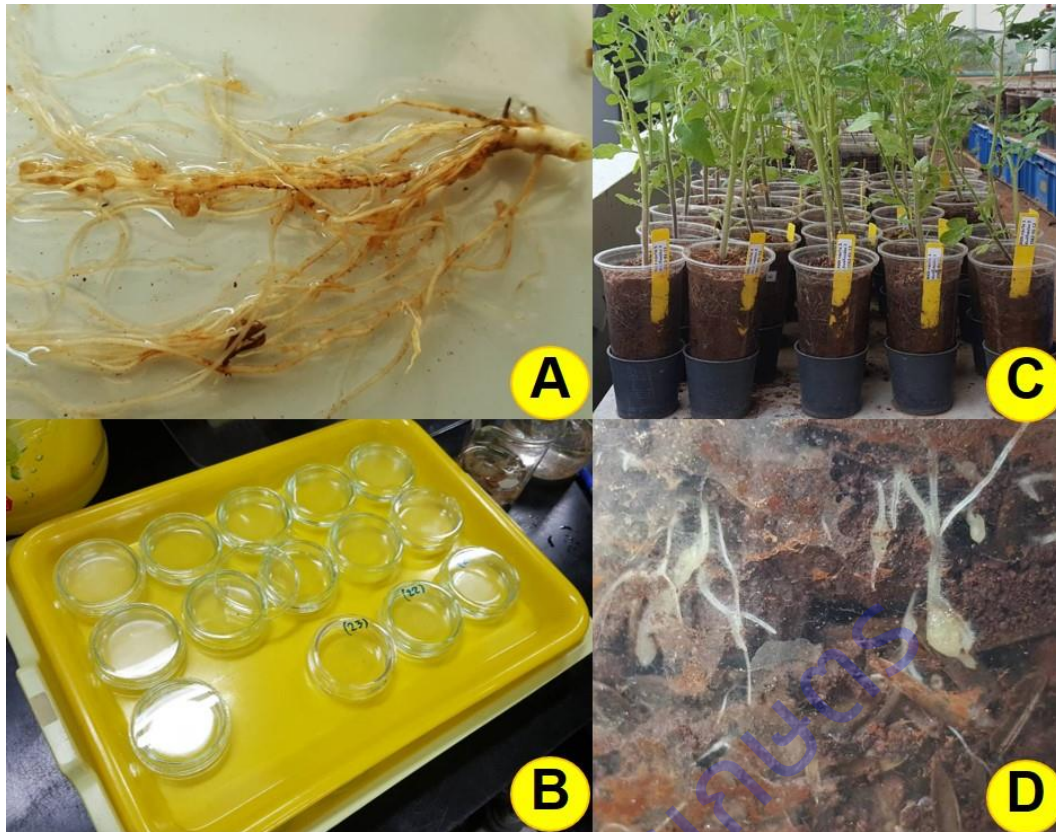


Figure 1 (A) Galled tomato root from tomato plant grown in soil samples from fields infested with root-knot nematodes. (B) Single eggmass was detached from the root and placed in sterile water (C) Hatched juveniles were inoculated into tomato plants grown in sterile soil (D) pure nematode population were obtained and used for further study.

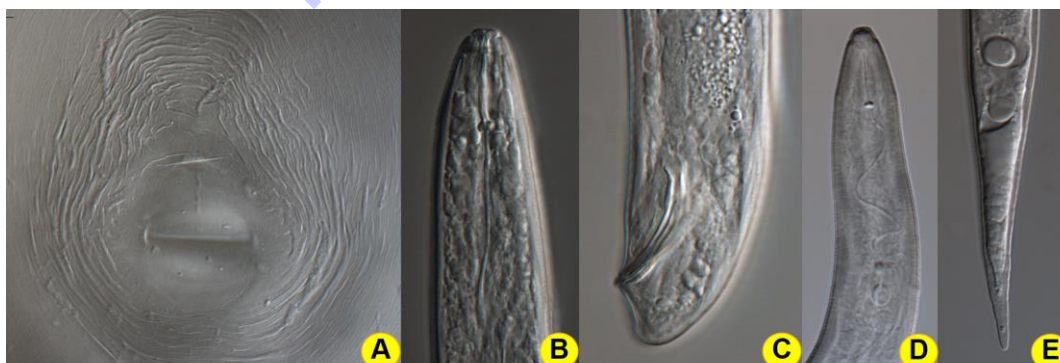


Figure 2 (A) Female perineal pattern (B, C) head and tail region of male and (D, E) head and tail of second stage juvenile of *M. enterolobii*.

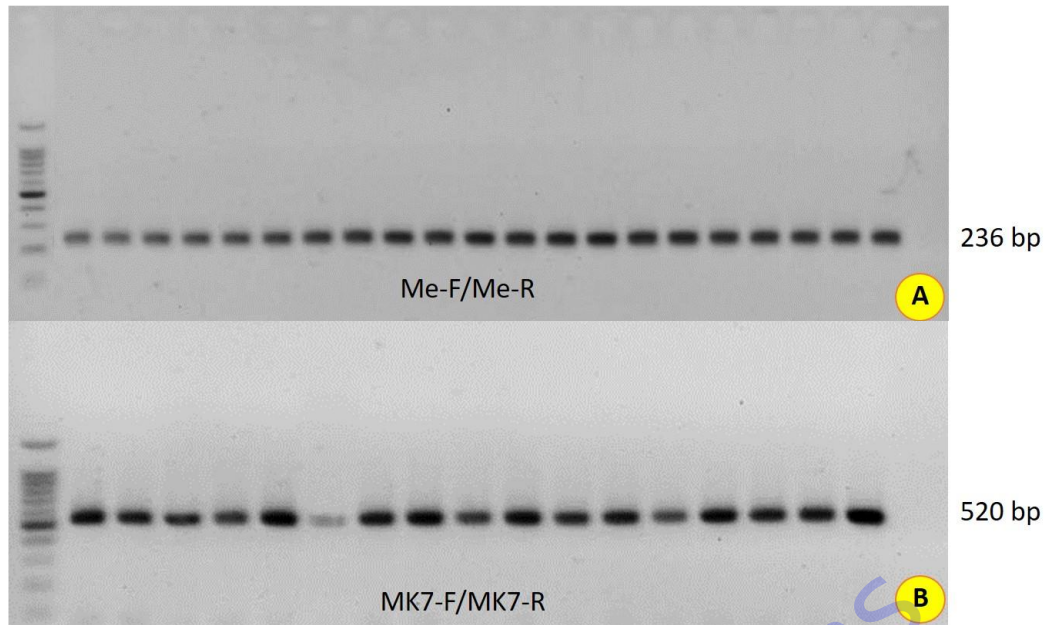


Figure 3 (A) Detection of *M. enterolobii* with Me-F/Me-R primers yielded 236 bp fragment and (B) Detection of *M. enterolobii* with MK7-F/MK7-R primers yielded 520 bp fragment.

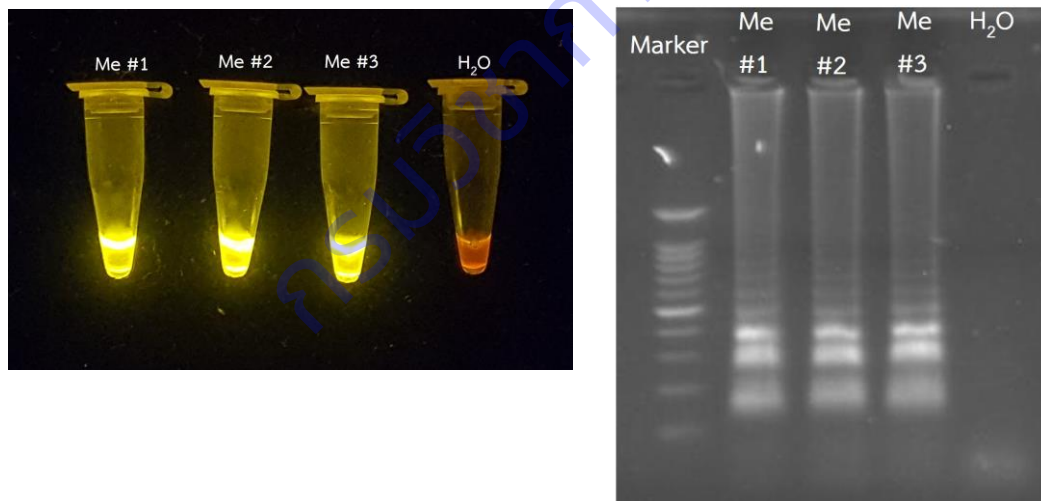


Figure 4 Detection of *M. enterolobii* with LAMP PCR

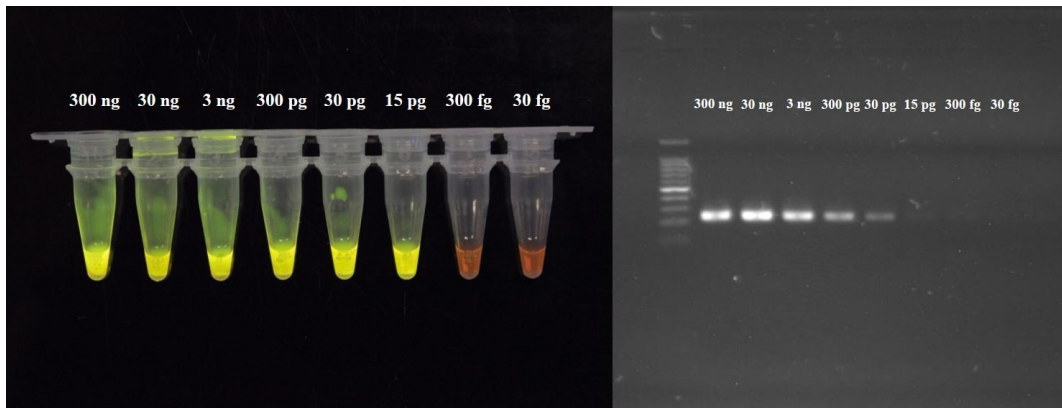


Figure 5 Sensitivity of LAMP-PCR to detect *M. enterolobii* compare with conventional PCR. LAMP-PCR could detect 15 pg DNA concentration.

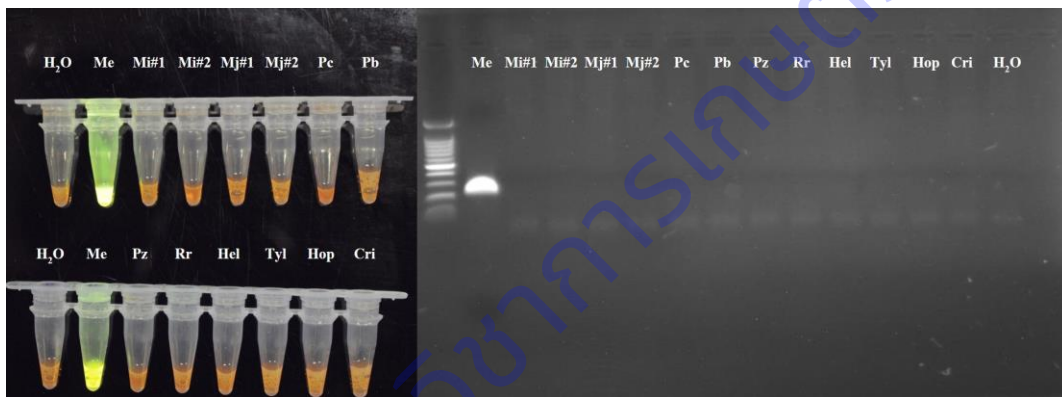


Figure 6 Specificity of LAMP-PCR to detect *M. enterolobii* (Me = *Meoidogyne enterolobii*, Mi = *Meloidogyne incognita*, Mj = *Meloidogyne javanica*, Pc = *Pratylenchus coffeae*, Pb = *Pratylenchus brachyurus*, Pz = *Pratylenchus zaeae*, Rr = *Rotylenchulus reniformis*, Hel = *Helicotylenchus* sp., Tyl = *Tylenchorhynchus* sp., Hop = *Hoplolaimus* sp., Cri = *Criconemoides* sp.)

การทดลองที่ 2.15 การพัฒนาการตรวจสอบแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) เพื่อการนำเข้าและส่งออกด้วยไฟร์เมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (ปีเริ่มต้น 2562 - 2564)

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้

การเก็บรวบรวมตัวอย่างแมลงวันผลไม้ด้วยกับดักถังเปียกซึ่งบรรจุสารล่อเมธิลยูจินอลและคิวลัวร์ จาก 6 ภูมิภาค ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ของไทย (Figure 1) พบแมลงวันผลไม้ทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *D. longicornis*, *Z. apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* นำตัวอย่างที่ได้มาจำแนกชนิดเพื่อใช้ในการออกแบบไฟร์เมอร์

2. การเตรียมดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไฟร์เมอร์ LCO1490/HCO2198 จากยีน *cox1* สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอได้ขนาด 650 - 700 คู่เบส (Figure 2) เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบพบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % และบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (Table1) และจากข้อมูลที่ถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าว แสดงว่าวิธีการสกัดดีเอ็นเอมีความเหมาะสมสามารถนำไปใช้สกัดดีเอ็นเอในตัวอย่างแมลงวันผลไม้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นสามารถนำดีเอ็นเอจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาทดสอบกับไฟร์เมอร์ที่ออกแบบได้

3. การออกแบบไฟร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

นำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน *cox1* จากแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Dacus longicornis*, *Zeugodacus apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* และลำดับนิวคลีโอไทด์แมลงวันผลไม้บางส่วนจากฐานข้อมูลของ GenBank มาเปรียบเทียบความเหมือนและความคล้ายกันเพื่อออกแบบไฟร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และตรวจหาตำแหน่ง SNPs ด้วยโปรแกรม Vector NTI (Invitrogen) พบตำแหน่ง SNPs ที่มีเฉพาะแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เท่านั้น ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไม่พบในแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ เลือกตำแหน่งดังกล่าวมาออกแบบไฟร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จำนวน 3 เส้น (Forward 1 เส้น และ Reverse 2 เส้น) โดยพบ Forward ที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งเริ่มต้นที่ 85 จำนวน 19 คู่เบส และ Reverse 2 เส้น (Table 1) ได้แก่ R1 บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 204 จำนวน 22 คู่เบส (Figure 3) และ R2 บริเวณตำแหน่งนิวคลีโอไทด์เริ่มต้นที่ 456 จำนวน 25 คู่เบส (Figure 4)

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติต่าง ๆ ของไฟร์เมอร์ที่ออกแบบด้วยโปรแกรม Oligo พบว่า % GC ของ Forward เท่ากับ 68.4 มีค่า melting temperature (Tm) อยู่ที่อุณหภูมิ 54.2 และ Reverse primers R1 และ R2 เท่ากับ 45.5 และ 36 ตามลำดับ มีค่า melting temperature (Tm) อยู่ที่อุณหภูมิ 50.3 และ 55.4 องศาเซลเซียส (Figure 5 และ Table 1) ไฟร์เมอร์ทั้งสองเส้นไม่สามารถจับกันเป็น dimer ได้

ตั้งชื่อไพรเมอร์ที่ออกแบบ Forward และ Reverse แต่ละเส้นดังนี้

1. ไพรเมอร์คู่ที่หนึ่ง (*Bactrocera correcta* Forward1: Bco-F1 และ *Bactrocera correcta* Reverse: Bco-R1) ดังนั้นไพรเมอร์คู่ที่หนึ่งคือ Bco-F1 และ Bco-R1 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ขนาดประมาณ 141 คู่เบส

2. ไพรเมอร์คู่ที่สอง (*Bactrocera correcta* Forward1: Bco-F1 และ *Bactrocera correcta* Reverse: Bco-R2) ดังนั้นไพรเมอร์คู่ที่สองคือ Bco-F1 และ Bco-R2 ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณยีน *cox1* ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ขนาดประมาณ 396 คู่เบส (Table1)

นำดีเอ็นเอต้นแบบของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ในระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ (ไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) ที่ได้จากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ทั้งสองคู่ (Bco-F1-R1 และ Bco-F1-R2) ด้วยเทคนิค PCR มีส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย

Reagents	Volume (µl) per reaction
GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA)	10
forward primer (10 µM)	1.0
reverse primer (10 µM)	1.0
nuclease-Free Water	6.0
template	2.0
final volume	20.0 µl

สภาวะปฏิกิริยา PCR ที่เหมาะสมสำหรับจำแนกแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยวิธี PCR ปรับ annealing temperature ที่ 53 สำหรับไพรเมอร์คู่ที่ 1 (Bco-F1-R1) และ 55 องศาเซลเซียส สำหรับไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Bco-F1-R2) กำหนดขั้นตอนและเวลาในปฏิกิริยา PCR cycle ดังนี้

Step	Temperature (°C)	Time	Number of cycles
1. initial-denaturing	94	4 min	1
2. denaturing	94	30 sec	35
3. annealing	53/55	30 sec	
4. extension	72	30 sec	
5. final-extension	72	4 min	1

ตรวจสอบขนาด PCR product ของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้ทั้ง 2 คู่ ด้วยวิธีการเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 1.5% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และอาศัยความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าและประจุไฟฟ้า พบขนาด PCR product ของ Bco-F1 กับ Bco-R1 ขนาด 141 คู่เบส (Figure 6) และ Bco-F1 กับ Bco-R2 ขนาด 396 คู่เบส (Figure 7)

นำ PCR product ที่ได้จากไพรเมอร์ที่ออกแบบไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ ณ บริษัท Macrogen นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์จากไพรเมอร์คู่ที่ 1 (Table 2) และไพรเมอร์คู่ที่ 2 (Table 3) บันทึกในฐานข้อมูล Genbank และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยการ Blast พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนที่ 99 - 100 % (Table 4 และ 5) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบทั้ง 2 คู่ นั้นมีประสิทธิภาพและมีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* แต่การบันทึกข้อมูลในฐานข้อมูล Genbank เพื่อจัดทำ accession number นั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บันทึกในฐานข้อมูล Genbank จะต้องมีการตัดส่วนหัวและส่วนท้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดการซ้อนทับกันของพีค (peak) บนโครมาโทแกรม (Chromatogram) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้อง ดังนั้นไพรเมอร์คู่ที่ 1 นั้น จึงมีขนาด 80 คู่เบส และไพรเมอร์คู่ที่ 2 นั้น จึงมีขนาด 330 คู่เบส และนิวคลีโอไทด์ที่สามารถบันทึกในฐานข้อมูล Genbank นั้น ต้องมีขนาดยาวไม่น้อยกว่า 200 คู่เบส ดังนั้นจึงไม่สามารถลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์คู่ที่ 1 ที่ได้ทำการออกลงในฐานข้อมูล Genbank ได้

4. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

จากคุณสมบัติของไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสม และสามารถนำไปพัฒนาใช้ต่อไป เช่น Real Time polymerase chain reaction หรือ quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) นั้น ไพรเมอร์ที่สามารถนำมาใช้ได้ นั้น ควรเป็นไพรเมอร์สั้น ๆ และไม่ควรมีขนาดเกิน 150 คู่เบส (life technologies, 2022) ดังนั้นจึงเลือกไพรเมอร์ที่ทำการออกแบบคือ Bco-F1 และ Bco-R1 มาทำการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

การทดสอบไพรเมอร์กับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ 11 ชนิด ได้แก่ *Bactrocera carambolae*, *B. correcta*, *B. dorsalis*, *B. latifrons*, *B. umbrosa*, *Dacus longicornis*, *Zeugodacus apicalis*, *Z. caudatus*, *Z. cilifer*, *Z. cucurbitae* และ *Z. tau* พบว่า เมื่อทำปฏิกิริยา PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบทั้งสองคู่ (Bco-F1 และ Bco-R1) และตรวจวิเคราะห์ขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ขนาด 141 คู่เบส ผลการตรวจสอบคู่ไพรเมอร์ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ (Figure 8) และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และมีความถูกต้อง 100% แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ (Bco-F1 และ Bco-R1) ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีความเหมาะสม สำหรับการนำไปใช้จำแนกชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ออกจากแมลงวันผลไม้ชนิดอื่น ๆ

4.2. การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ต่อระยะการเจริญเติบโต (life stages) ต่าง ๆ

จากการทดสอบคู่ไพรเมอร์ Bco-F1 และ Bco-R1 ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ด้วยเทคนิค PCR ต่อตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่เลี้ยงจากห้องปฏิบัติการในระยะไข่ หนอน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ระยะละ 10 ตัวอย่าง รวมเป็นจำนวน 40 ตัวอย่าง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์พบแถบดีเอ็นเอขนาด 141 คู่เบส ในทุกระยะการเจริญเติบโต (Figure 9) แสดงว่าไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบนั้นสามารถตรวจวินิจฉัยชนิดแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ได้ทุกระยะการเจริญเติบโต และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และมีความถูกต้อง 100%

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากกลุ่มประชากรต่างภูมิศาสตร์ (geographical populations)

จากการทดสอบไพรเมอร์ที่ออกแบบกับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จาก 6 ภูมิภาคของ ไทย ได้แก่ ภาคกลาง ภาคตะวันตก ภาคเหนือ ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ ทำการทดสอบกับตัวอย่างแมลงวันผลไม้ภูมิภาคละ 50 ตัวอย่าง /ชนิด (รวมทั้งหมด 300 ตัวอย่าง) ผลที่ได้สามารถยืนยันได้ว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นสามารถใช้ได้กับตัวอย่างแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* จากภูมิภาคต่าง ๆ ได้เป็นอย่างดี (Figure 10) และจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* และมีความถูกต้อง 100%

4.4 การทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอ่อนที่พบปนเปื้อนในการส่งออก (intercepted samples)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* กับตัวอ่อนที่พบปนเปื้อนจากการสุ่มตรวจผัก ผลไม้ (intercepted samples) โดยเจ้าหน้าที่ด่านตรวจพืชท่าอากาศยานสุวรรณภูมิ จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ ชมพู ถั่วฝักยาว มะไฟ น้อยหน่า มะม่วง ลิ้นจี่ จำนวนทั้งหมด 80 ตัวอย่าง (Figure 11 และ Table 6) นำตัวอย่างหนอนที่ตรวจพบในตัวอย่างพืชชนิดต่าง ๆ มาสกัดดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* (Bco-F1 กับ Bco-R1) พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 141 คู่เบส จากตัวอย่างตัวหนอนที่พบการปนเปื้อนในชมพูและมะม่วงที่ต้องการส่งออกไปประเทศอังกฤษ และสวิตเซอร์แลนด์ (Figure 12) ยืนยันความถูกต้องโดยการนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ให้ผลการตรวจสอบบวกต่อคู่ไพรเมอร์ Bco-F1 และ Bco-R1 วิเคราะห์ลำดับพันธุกรรม และทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างกับฐานข้อมูล GenBank พบความเหมือนที่ 99 - 100% แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบนั้นมีความจำเพาะกับแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta*

และจากการนำตัวหนอนที่ได้จากการสุ่มตัวอย่างบางส่วนมาเลี้ยงไว้เพื่อให้เป็นตัวเต็มวัย และจัดจำแนกชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าผลที่ได้จากการจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานนั้นสอดคล้องกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่ออกแบบมีความจำเพาะเจาะจงต่อการตรวจวินิจฉัยชนิดของแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* มีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำไปใช้ในการตรวจสอบแมลงวันผลไม้ที่เป็นศัตรูพืชกักกันในพืชผัก และผลไม้ ก่อนการส่งออกไปยังต่างประเทศ

การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* นี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งก่อนหน้านี้ ยูวรินทร์ และคณะ (2564) ได้ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันแตง *Z. cucurbitae* เป็นครั้งแรกของโลก แต่สำหรับไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* นั้น ประเทศจีนโดย Jiang et al., (2013) ได้ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง และนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* ที่ตรวจพบจากชมพูที่ส่งออกไปจากประเทศไทย แต่เมื่อนำมาทดสอบกับแมลงวันฝรั่ง *B. correcta* ที่ได้จากกบดักพีโรโมน และจากการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการกรมวิชาการเกษตรนั้น พบปัญหาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งต้องมีการปรับส่วนผสมและสภาวะปฏิกิริยา PCR ให้มีเหมาะสมที่จะนำมาใช้

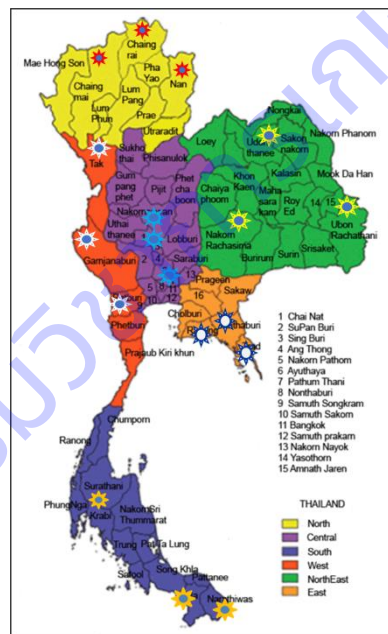


Figure 1 Locations of sampling sites in the six Thai biogeographical regions (North, Central, South, West, Northeast and East) at which fruit flies were collected.

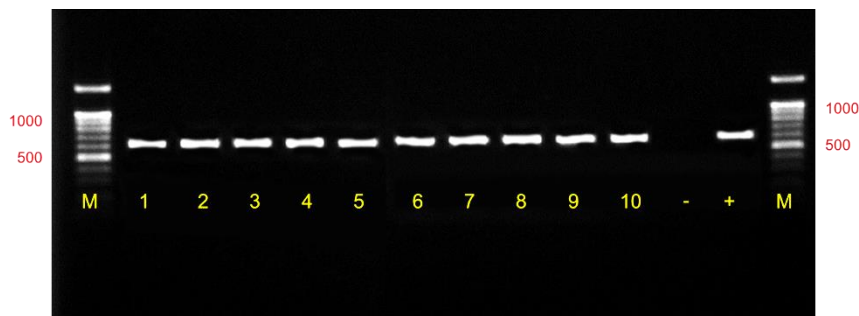


Figure 2 PCR results using the *cox1* (LCO1490/HCO2198) universal primer pair.

Lane 1 = *Bactrocera carambolae* Lane 2 = *B. dorsalis* Lane 3 = *B. latifrons*
 Lane 4 = *B. umbrosa* Lane 5 = *B. correcta* Lane 6 = *Dacus longicornis*
 Lane 7 = *Zeugodacus caudatus* Lane 8 = *Z. apicalis* Lane 9 = *Z. cilifer*
 Lane 10 = *Z. tau* Lane 11 = Negative (ddH₂O)
 Lane 12 = Positive (*B. correcta*)

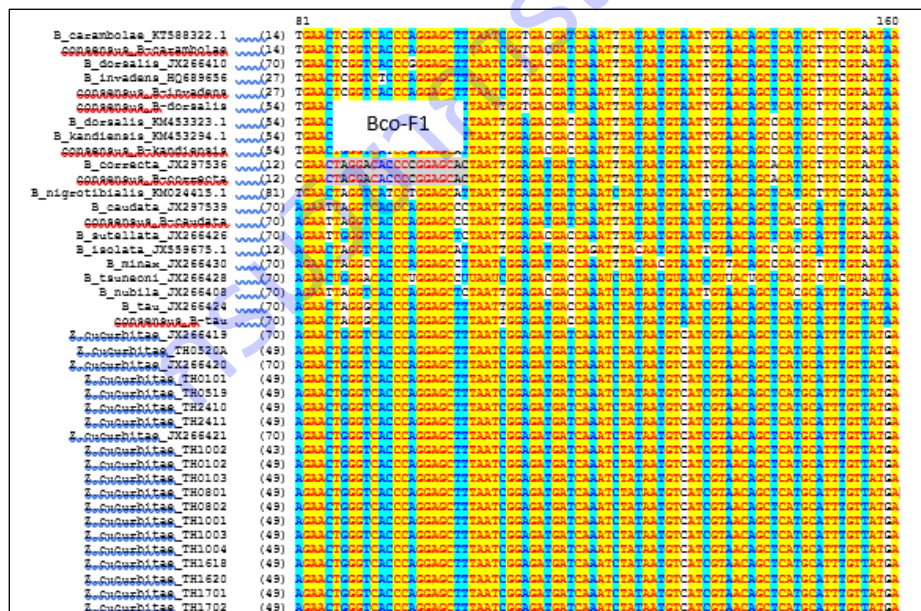


Figure 3 Alignment of the nucleotide sequence regions of *cox1* gene on fruit flies. Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for *Bactrocera correcta*. Nucleotide sequences of Bco-F1 primers are highlighted.

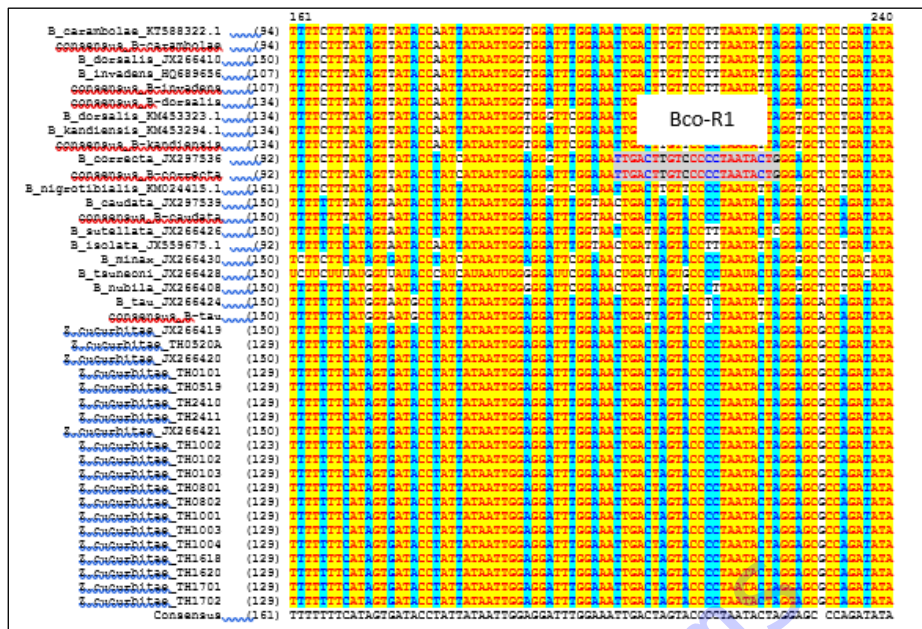


Figure 4 Alignment of the nucleotide sequence regions of *cox1* gene on fruit flies. Consensus sequences were used to design broad-spectrum primers for *Bactrocera correcta*. Nucleotide sequences of Bco-R1 and Bco-R2 primers are highlighted.

Oligo Analysis

Oligonucleotide: Length: 19
CTAGGACACCCCGGAGCAC

DNA RNA Complementary Analyze Save Results Close

Parameters		Results		Palindromes: 0 total
dG Temperature (C)	25.0	Mol. Wt	5829.8	Repeats: 1 total CCCC at 10
Probe Conc.(pMol)	250.0	%GC	68.4	
Salt Conc.(mMol)	50.0	Therm. Tm	54.2	
% Formamide	0.0	%GC Tm	52.4	
3' End Length (bp)	7	dG	-33.9	
Palindromes (bp)	6	3' End dG	-16.3	
Nucl. Repeats (bp)	4	dH	-149.7	
Stem Length (bp)	3	dS	-382.3	

Dimers & Hairpin Loops...

(A)

Oligo Analysis

Oligonucleotide: Length: 22
CAGTATTAGGGGGACAAGTCAA

DNA RNA Complementary Analyze Save Results Close

Parameters		Results		Palindromes: 0 total
dG Temperature (C)	25.0	Mol. Wt	6894.5	Repeats: 1 total GGGGG at 10
Probe Conc.(pMol)	250.0	%GC	45.5	
Salt Conc.(mMol)	50.0	Therm. Tm	50.3	
% Formamide	0.0	%GC Tm	47.9	
3' End Length (bp)	7	dG	-34.3	
Palindromes (bp)	6	3' End dG	-12.3	
Nucl. Repeats (bp)	4	dH	-163.4	
Stem Length (bp)	3	dS	-426.9	

Dimers & Hairpin Loops...

(B)

Oligo Analysis

Oligonucleotide: Length: 25
TCGCATGTTAATAACGGTTGTGATA

DNA RNA Complementary Analyze Save Results Close

Parameters		Results		Palindromes: 0 total
dG Temperature (C)	25.0	Mol. Wt	7773.1	Repeats: 0 total
Probe Conc.(pMol)	250.0	%GC	36.0	
Salt Conc.(mMol)	50.0	Therm. Tm	55.4	
% Formamide	0.0	%GC Tm	47.7	
3' End Length (bp)	7	dG	-39.8	
Palindromes (bp)	6	3' End dG	-11.2	
Nucl. Repeats (bp)	4	dH	-186.5	
Stem Length (bp)	3	dS	-485.9	

Dimers & Hairpin Loops...

(C)

Figure 5 Species specific primer of *Bactrocera correcta* from Oligo programme.

(A) Forward (F1): CTAGGACACCCCGGAGCAC (85-103)

(B) Reverse (R1): CAGTATTAGGGGGACAAGTCAA (204-225)

(C) Reverse (R2): TCGCATGTTAATAACGGTTGTGATA (456-480)

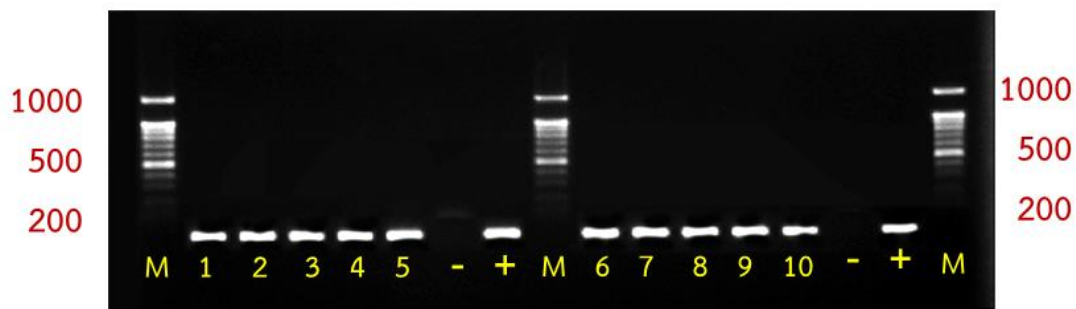


Figure 6 DNA from all stage of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* -specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker.

Lane 1 - 2 = eggs

Lane 3 - 5 = larvae

Lane 6 - 7 = pupae

Lane 8 - 10 = adults

Lane - = Negative (ddH₂O)

Lane + = Positive (*B. correcta*)

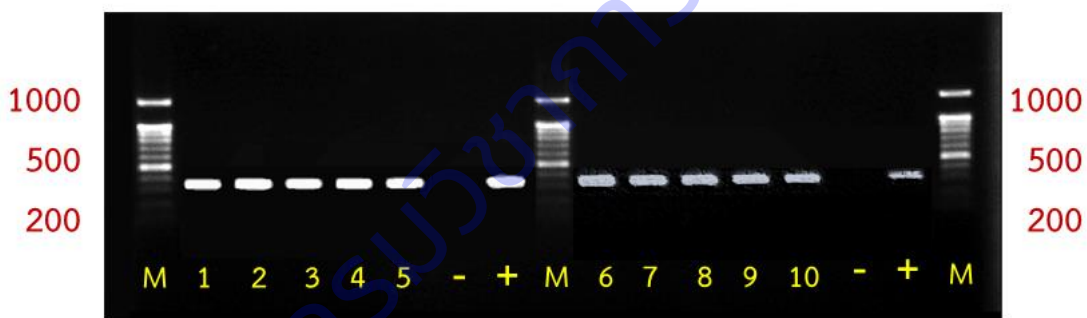


Figure 7 DNA from all stage of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* -specific primer pair Bco-F1 and Bco-R2. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker.

Lane 1 - 2 = eggs

Lane 3 - 5 = larvae

Lane 6 - 7 = pupae

Lane 8 - 10 = adults

Lane - = Negative (ddH₂O)

Lane + = Positive (*B. correcta*)

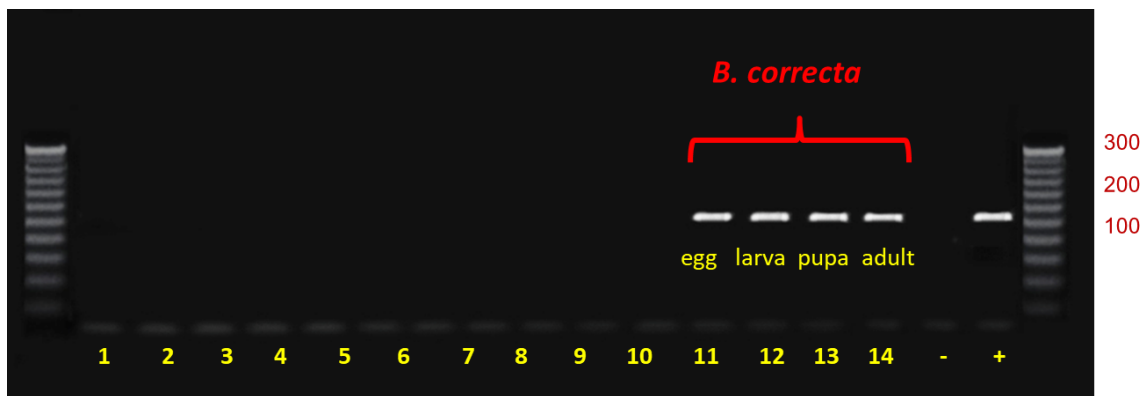


Figure 8 Specificity testing of the *Bactrocera correcta* -specific primer pair (Bco-F1 and Bco-R1).

Lane 1 = *B. carambolae*

Lane 2 = *B. dorsalis*

Lane 3 = *B. latifrons*

Lane 4 = *B. umbrosa*

Lane 5 = *D. longicornis*

Lane 6 = *Z. apicalis*

Lane 7 = *Z. caudatus*

Lane 8 = *Z. cucurbitae*

Lane 9 = *Z. cilifer*

Lane 10 = *Z. tau*

Lane 11-14 = *B. correcta*

Lane 15 = Negative (ddH₂O)

Lane 16 = Positive (*B. correcta*)

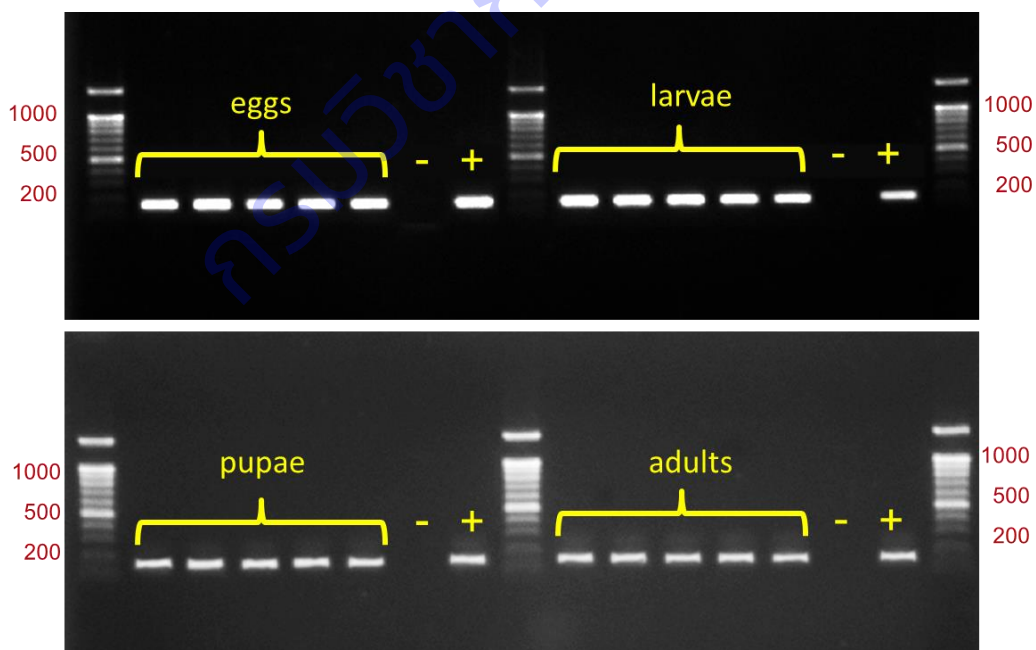


Figure 9 DNA from all stage of *Bactrocera correcta* (eggs, larvae, pupae and adults) was amplified using the *B. correcta* -specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker.

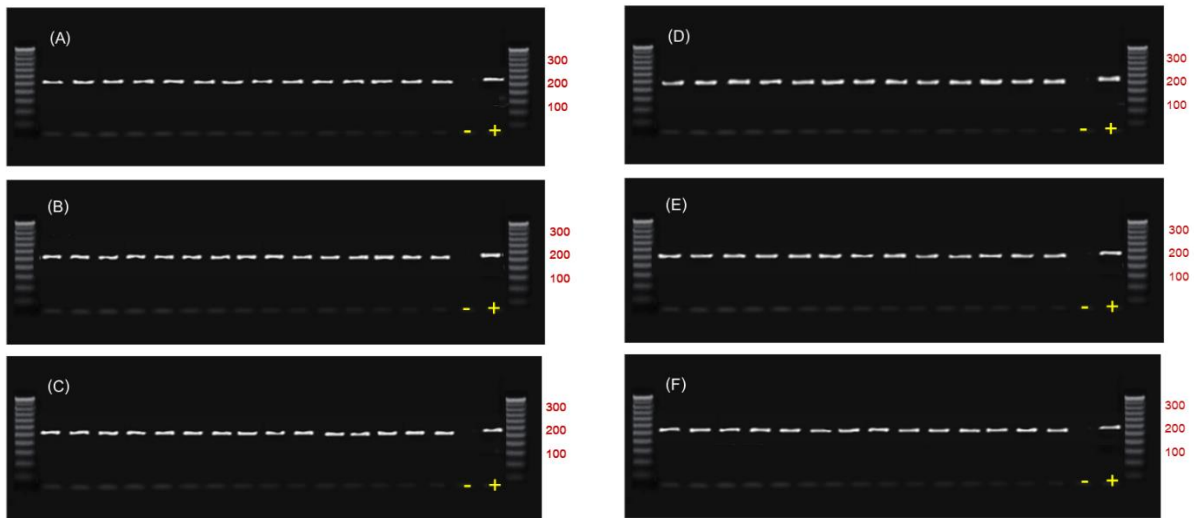


Figure 10 DNA of *Bactrocera correcta* from six Thai biogeographical regions (A=North, B=Central, C=South, E=West, F=Northeast and G=East) was amplified using the *B. correcta* - specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1. Negative control is ddH₂O. Positive control sample is *B. correcta*. Lane M: D2000 Marker.



Figure 11 Fruit fly larvae were intercepted by plant inspections at Suvarnabhumi airport of agricultural products destined for export from Thailand.

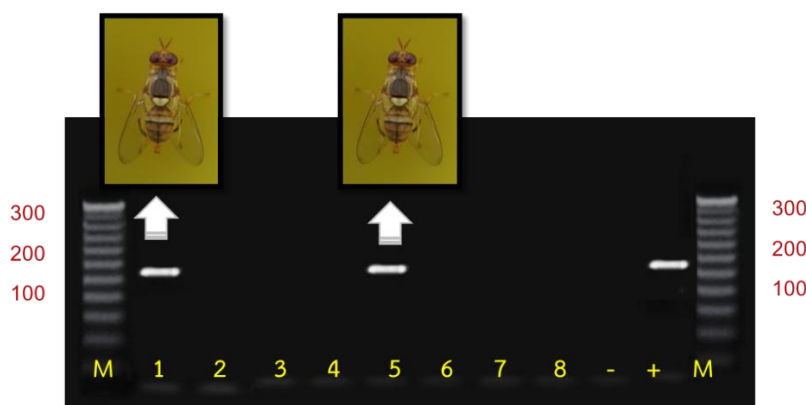


Figure 12 DNA from unknown larvae species was amplified using the *Bactrocera correcta* specific primer pair Bco-F1 and Bco-R1.

Lanes 1- 8: intercepted fruit fly larvae.

Lane 9: negative (ddH₂O)

Lane 10: *B. correcta* positive control sample.

Lane M: D2000 Marker

Table 1 Nucleotide of sequences and properties of broad-spectrum primer set used in *Bactrocera correcta* screening in this study primer (primer name, sequences, position, no. of base pair, temperature (T_m), % GC and size of PCR product).

No.	Primer name	Sequences	Position	No. of base pair	T _m	%GC	Size of PCR product
1	Forward (F1)	CTAGGACACCCCGGAGCAC	(85-103)	19	54.2	68.4	141
2	Reverse (R1)	CAGTATTAGGGGACAAGTCAA	(204-225)	22	50.3	45.5	
3	Reverse (R2)	TCGCATGTTAATAACGGTTGTGATA	(456-480)	25	55.4	36	396

Table 2 Nucleotide sequence analysis of the 83 bp DNA fragments from 10 guava fly samples amplified by species-specific primers (Bco-F1 and Bco-R1).

No.	Scientific name	Nucleotide sequence
1.	<i>B. correcta</i>	GCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGG TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA
2.	<i>B. correcta</i>	GCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA
3.	<i>B. correcta</i>	GCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA
4.	<i>B. correcta</i>	GCGCATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA
5.	<i>B. correcta</i>	GCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGG TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA
6.	<i>B. correcta</i>	GCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA
7.	<i>B. correcta</i>	GCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA
8.	<i>B. correcta</i>	GCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGA TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA
9.	<i>B. correcta</i>	GCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGAT TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA
10.	<i>B. correcta</i>	GCACATGCTTTCGTAATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTGGAGGAT TTTGAAATTGACTTGTCCTCCCTAATACTGA

Table 3 Table 2 Nucleotide sequence analysis of the 330 bp DNA fragments from 10 guava fly samples amplified by species-specific primers (Bco-F1 and Bco-F2).

No.	Scientific name	Nucleotide sequence
1	<i>B. correcta</i>	TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACATTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCAGTTGATCTAGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTATCACAACCGTT
2	<i>B. correcta</i>	TGTAACAGCGCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACATTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGTTGATCTTGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCCGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTATCACAACCGTT
3	<i>B. correcta</i>	TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACGTTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTATTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGTTGATCTAGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTATCACAACCGTT
4	<i>B. correcta</i>	TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACATTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGTTGATCTAGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTATCACAACCGTT
5	<i>B. correcta</i>	TGTAACAGCGCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACATTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGTTGATCTTGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCCGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTATCACAACCGTT
6	<i>B. correcta</i>	TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACGTTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTATTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGTTGATCTAGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCTGGTATTTCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTATCACAACCGTT

7	<i>B. correcta</i>	<p>TGTAACAGCGCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACATTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGATCTTGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCCGGTATTTCCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACCGTT</p>
8	<i>B. correcta</i>	<p>TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACATTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGATCTAGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCTGGTATTTCCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACCGTT</p>
9	<i>B. correcta</i>	<p>TGTAACAGCGCATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGATTTGGAAATTGACTTGTCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACATTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGATCTTGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCCGGTATTTCCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACCGTT</p>
10	<i>B. correcta</i>	<p>TGTAACAGCACATGCTTTCGTAATAATTTCTTTATAGTTATACCTATCATAATTG GAGGGTTTGGAAATTGACTTGTCCCCCTAATACTGGGAGCTCCTGATATAGCATT CCACGAATAAATAATATAAGATTTTGATTATTACCCCTTCCCTTACATTACTATT AGTAAGAAGTATAGTAGAAAATGGAGCTGGTACAGGTTGAACAGTTTACCCTCCC CTATCATCTGTTATTGCTCACGGAGGAGCTTCGGTTGATCTAGCTATTTTCTCACT CCACTTAGCTGGTATTTCCCTCAATTTTAGGAGCAGTAAATTTTATCACAACCGTT</p>

Table 4 Nucleotide sequence analysis of the 141 bp DNA fragments (Bco-F1 and Bco-F1) from 20 guava fly samples amplified by species-specific primers compared with the GenBank database.

No.	Guava fly with Acc. no. in GenBank	Voucher specimens	Primer	Samples with Acc. No	%Identity
1	N/A	EMBT(SS)0601	Bco-F1	MN255894.1	100%
2	N/A	EMBT(SS)0602	Bco-F1	MN016975.1	100%
3	N/A	EMBT(SS)0603	Bco-F1	MN016974.1	100%
4	N/A	EMBT(SS)0604	Bco-F1	MH125331.1	100%
5	N/A	EMBT(SS)0605	Bco-F1	MF095191.1	100%
6	N/A	EMBT(SS)0606	Bco-F1	MF970799.1	100%
7	N/A	EMBT(SS)0607	Bco-F1	MF970794.1	100%
8	N/A	EMBT(SS)0608	Bco-F1	MF970791.1	100%
9	N/A	EMBT(SS)0609	Bco-F1	KU669692.1	100%
10	N/A	EMBT(SS)0610	Bco-F1	KU669315.1	100%
11	N/A	EMBT(SS)0611	Bco-F1	KU669308.1	100%
12	N/A	EMBT(SS)0612	Bco-F1	KU669300.1	100%
13	N/A	EMBT(SS)0613	Bco-F1	KJ879920.1	100%
14	N/A	EMBT(SS)0614	Bco-F1	KJ879918.1	100%
15	N/A	EMBT(SS)0615	Bco-F1	KJ879899.1	100%
16	N/A	EMBT(SS)0616	Bco-F1	KJ879861.1	100%
17	N/A	EMBT(SS)0617	Bco-F1	KJ879859.1	100%
18	N/A	EMBT(SS)0618	Bco-F1	KJ879823.1	100%
19	N/A	EMBT(SS)0619	Bco-F1	KJ879812.1	100%
20	N/A	EMBT(SS)0620	Bco-F1	KJ879811.1	100%

Table 5 Nucleotide sequence analysis of the 396 bp DNA fragments (Bco-F1 and Bco-F2) from 20 guava fly samples amplified by species-specific primers compared with the GenBank database.

No.	Guava fly with Acc. no. in GenBank	Voucher specimens	Primer	Samples with Acc. No	%Identity
1	MW715009	EMBT(SS)0601	Bco-F2	MF095192.1	100%
2	MW715010	EMBT(SS)0602	Bco-F2	MF970796.1	100%
3	MW715011	EMBT(SS)0603	Bco-F2	KU669314.1	100%
4	MW715012	EMBT(SS)0604	Bco-F2	KJ879875.1	100%
5	MW715013	EMBT(SS)0605	Bco-F2	MW715009.1	100%
6	MW715014	EMBT(SS)0606	Bco-F2	JX297523.1	100%
7	MW715015	EMBT(SS)0607	Bco-F2	MF095193.1	100%
8	MW715016	EMBT(SS)0608	Bco-F2	MF970798.1	100%
9	MW715017	EMBT(SS)0609	Bco-F2	MF970795.1	100%
10	MW715018	EMBT(SS)0610	Bco-F2	MF970793.1	100%
11	MW821404	EMBT(SS)0611	Bco-F2	KU669297.1	100%
12	MW821405	EMBT(SS)0612	Bco-F2	KJ879886.1	100%
13	MW821406	EMBT(SS)0613	Bco-F2	KJ879885.1	100%
14	MW821407	EMBT(SS)0614	Bco-F2	KJ879819.1	100%
15	MW821408	EMBT(SS)0615	Bco-F2	MW715017.1	100%
16	MW821409	EMBT(SS)0616	Bco-F2	MW715015.1	100%
17	MW821410	EMBT(SS)0617	Bco-F2	MW715013.1	100%
18	MW821411	EMBT(SS)0618	Bco-F2	MW715010.1	100%
19	MW821412	EMBT(SS)0619	Bco-F2	JX297524.1	100%
20	MW821413	EMBT(SS)0620	Bco-F2	DQ116265.1	100%

Table 6 Detection of *Bactrocera correcta* Intercepted using species-specific primer (Bco-F1 and Bco-R1). The details of intercepted fruits, scientific name, exporting country, number of samples, results and scientific name of fruit fly were intercepted at plant quarantine, Suvarnabhumi airport, Bangkok, Thailand.

Intercepted fruits	Scientific name (host plants)	Exporting country	No. of samples	Results	Scientific name (fruit flies)
1 Rose apple	<i>Syzygium samarangense</i>	England	10	+	<i>B. correcta</i>
2 Yard long bean	<i>Vigna unguiculata</i> L.	England	10	-	<i>Z. cucurbitae</i>
3 Ramble Bambi	<i>Baccaurea ramiflora</i> Lour.	Spain	10	-	<i>B. carambolae</i>
4 Custard apple	<i>Annona reticulate</i> L.	China	10	-	<i>B. dorsalis</i>
5 Mango	<i>Mangifera indica</i> L.	Switzerland	10	+	<i>B. correcta</i>
6 Lychee	<i>Litchi chinensis</i> Sonn	Switzerland	10	-	<i>B. dorsalis</i>
7 Custard Apple	<i>Annona reticulate</i> L.	Denmark	10	-	<i>B. dorsalis</i>
8 Yard long bean	<i>Vigna unguiculata</i> L.	Switzerland	10	-	<i>Z. cucurbitae</i>
Total			80		

การทดลองที่ 2.16 การใช้เทคนิค Multiplex PCR ในการตรวจไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* (ปีเริ่มต้น 2563 - 2564)

1. เตรียมไล่เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* สำหรับการทดสอบ

เลี้ยงเพิ่มปริมาณไล่เดือนฝอยรากปมจากประชากรไล่เดือนฝอยที่เก็บรักษาไว้ ในงานเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมไล่เดือนฝอยศัตรูพืช เก็บตัวอย่างดินเพิ่มเติมจากพื้นที่ภาคเหนือ และจังหวัดอุบลราชธานีรวม 60 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) แยกไล่เดือนฝอยจากตัวอย่างดิน ตรวจสอบตัวอย่างไล่เดือนฝอยรากปม เลี้ยงเพิ่มปริมาณไล่เดือนฝอยรากปม โดยปลูกมะเขือเทศลงในตัวอย่างดินที่ตรวจพบตัวอย่างไล่เดือนฝอยรากปม เพื่อให้ตัวอย่าง

ที่อยู่ในดินข้าวรากและเจริญเติบโตสร้างกลุ่มไข่ จากนั้นเลี้ยงไส้เดือนฝอยรากปมโดยเริ่มจาก 1 กลุ่มไข่ เพื่อให้ได้ประชากรไส้เดือนฝอยรากปมที่บริสุทธิ์ ตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปมที่แยกจากตัวอย่างดิน 21 ตัวอย่าง โดยใช้ลักษณะรูปร่างส่วนกัน พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ทดสอบคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิดพบว่าได้ผลตรงกับกรจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยา

2. ทดสอบคู่ไพรเมอร์ต่างๆ และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR ในการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii*

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR

ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา multiplex PCR โดยเลือกใช้คู่ไพรเมอร์ที่มีความเหมาะสมและเฉพาะเจาะจงต่อชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* และ *M. enterolobii* ร่วมกับคู่ universal primer MF 5'-GGGGATGTTTGAGGCAGATTTG-3' และ MR 5'-AACCGCTTCGGACTTCCACCAG-3' ซึ่งเป็นคู่ไพรเมอร์ internal control สำหรับตรวจไส้เดือนฝอยรากปม (ตารางที่ 2) ทดสอบปฏิกิริยา multiplex PCR โดยปรับองค์ประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้การทำปฏิกิริยาให้มีปริมาตรรวม 35 μ l โดยใช้คู่ไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยาทั้งหมดจำนวน 5 คู่ (ตารางที่ 2) ปรับความเข้มข้นของแต่ละคู่ไพรเมอร์ในช่วง 0.02-0.4 mM, ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ 1.5, 1.8, 2.0, 2.5 และ 3.0 mM, ความเข้มข้นของ dNTPs 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 mM จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเตรียมปฏิกิริยา (ตารางที่ 3) หาสภาวะของปฏิกิริยาที่เหมาะสมโดยการปรับอุณหภูมิ เวลา และจำนวนรอบของปฏิกิริยา โดยปรับ annealing temperature ในช่วง 58-66°C โดยเพิ่มขึ้นทีละ 1°C และแต่ละ annealing temperature ปรับ extension time 30, 60, 90 และ 120 วินาที พบว่าการใช้ denature temperature 94°C เวลา 1 นาที annealing temperature 64°C เวลา 30 วินาที และ extension temperature 68°C เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา multiplex PCR (ตารางที่ 4)

ทดสอบความจำเพาะเจาะจงของ multiplex PCR ในการตรวจไส้เดือนฝอยรากปม 4 ชนิด

จากการทดสอบสภาวะปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ได้ ในการตรวจสอบชนิดไส้เดือนฝอยรากปม พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดตรงตามเป้าหมาย และสามารถจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ได้ในการทำปฏิกิริยาครั้งเดียว (ภาพที่ 1) การทดสอบการตรวจตัวอย่างไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ชนิดละ 5 ไอโซเลต โดยใช้ดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ เป็น negative control พบว่าเทคนิค multiplex PCR มีความแม่นยำในการตรวจ (ภาพที่ 2)

ทดสอบความสามารถในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืช

การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืช ที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยแต่ละชนิด คือ *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* สกัดดีเอ็นเอจากปมรากมะเขือเทศที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยรากปมแต่ละชนิด ที่ 15 20 และ 30 วันหลังปลูกเชื้อ ชนิดละ 10 ปม นำไปตรวจด้วยวิธี multiplex PCR พบว่าสามารถตรวจสอบไส้เดือนฝอยทุกชนิด ทุกช่วงเวลาได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจตัวอย่างดินจากพื้นที่ภาคเหนือ และ จ. อุบลราชธานี

ลำดับที่	ชนิดพืช	N	E	การตรวจหาไส้เดือน	การตรวจสอบชนิด
				ฝอยรากปม	ไส้เดือนฝอยรากปม
1	พริก	15.4325	104.8208333	พบ	<i>M. javanica</i>
2	พริก	15.43194444	104.8213889	พบ	<i>M. javanica</i>
3	พริก	15.41361111	104.7869444	ไม่พบ	-
4	พริก	15.43	104.8208333	ไม่พบ	-
5	พริก	15.42972222	104.8208333	ไม่พบ	-
6	พริก	15.435	104.8186111	พบ	<i>M. javanica</i>
7	หม่อน	15.435	104.8186111	พบ	<i>M. incognita</i> <i>M. javanica</i>
8	หม่อน	15.1475	104.9008333	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
9	หม่อน	15.14777778	104.9008333	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
10	ขึ้นฉ่าย	15.14777778	104.9008333	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
11	จิงจูฉ่าย	15.1475	104.9011111	พบ	<i>M. javanica</i>
12	มะเขือเทศ	15.1475	104.9011111	พบ	<i>M. javanica</i>
13	ผักสลัด	15.1475	104.9011111	ไม่พบ	-
14	พริก	15.14777778	104.9011111	ไม่พบ	-
15	ผักสลัด	15.14777778	104.9011111	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
16	ผักสลัด	15.24527778	104.9936111	ไม่พบ	-
17	มะเขือ	15.24527778	104.9933333	ไม่พบ	-
18	พริก	15.00222222	104.7877778	พบ	<i>M. javanica</i>
19	พริก	15.00194444	104.7883333	ไม่พบ	-
20	ผักชีฝรั่ง	15.00166667	104.7880556	พบ	<i>M. incognita</i> , <i>M. javanica</i>
21	หนุ่ยหวานอิตาลี	15.00694444	104.7844444	ไม่พบ	-
22	พริก	15.00111111	104.7855556	ไม่พบ	-
23	ผักสลัด	14.99722222	104.7938889	พบ	<i>M. incognita</i>
24	หม่อน	14.99722222	104.7947222	พบ	<i>M. incognita</i>

ลำดับที่	ชนิดพืช	N	E	การตรวจหาไส้เดือน ฝอยรากปม	การตรวจสอบชนิด ไส้เดือนฝอยรากปม
25	พริก	15.22	104.9341667	พบ	<i>M. incognita</i>
26	ข้าว	15.21972222	104.9344444	ไม่พบ	-
27	ข้าว	15.08277778	104.5361111	ไม่พบ	-
28	พริก	15.06527778	104.5422222	ไม่พบ	-
29	พริก	15.07138889	104.5494444	พบ	<i>M. incognita</i>
30	พริก	15.15944444	104.5813889	ไม่พบ	-
31	พริก	15.21527778	104.5372222	ไม่พบ	-
32	พริก	15.21555556	104.5388889	ไม่พบ	-
33	พริก	15.21527778	104.5394444	ไม่พบ	-
34	พริก	15.21666667	104.5494444	ไม่พบ	-
35	พริก	15.21	104.5380556	ไม่พบ	-
36	ข้าว	14.92666667	104.3486111	ไม่พบ	-
37	พริก	14.92666667	104.3488889	ไม่พบ	-
38	พริก	14.96916667	104.2469444	ไม่พบ	-
39	พริก	14.92166667	104.2002778	ไม่พบ	-
40	ยาสูบ	20.22777778	99.895	ไม่พบ	-
41	ยาสูบ	20.23111111	99.85666667	พบ	<i>M. javanica</i>
42	พริก	20.23111111	99.89833333	พบ	<i>M. javanica</i>
43	ยาสูบ	20.23138889	99.89861111	พบ	<i>M. incognita</i>
44	ฝรั่ง	20.23166667	99.89888889	ไม่พบ	-
45	แตงกวา	20.23138889	99.89916667	ไม่พบ	-
46	กล้วย	20.27972222	99.9575	ไม่พบ	-
47	กล้วย	20.18777778	100.0358333	ไม่พบ	-
48	กล้วย	20.18722222	100.0327778	ไม่พบ	-
49	กล้วย	20.16194444	99.97944444	ไม่พบ	-
50	กล้วย	19.73194444	99.62472222	พบ	<i>M. incognita</i>
51	กล้วย	19.43972222	99.50138889	ไม่พบ	-
52	กล้วย	19.30888889	99.41805556	ไม่พบ	-
53	กล้วย	19.37722222	99.17166667	ไม่พบ	-
54	กล้วย	19.37138889	99.17805556	ไม่พบ	-
55	พริก	19.36694444	99.18333333	ไม่พบ	-
56	ยาสูบ	19.36666667	99.18611111	ไม่พบ	-
57	กล้วย	19.13611111	99.16527778	พบ	<i>M. incognita</i>
58	กล้วย	19.09138889	99.00027778	ไม่พบ	-
59	กล้วย	19.02055556	98.98055556	ไม่พบ	-
60	พริก	19.0175	98.98222222	ไม่พบ	-

ตารางที่ 2 คู่มือเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Species	Sequence of primers	Size	References
<i>Meloidogyne</i> spp. (universal primer)	MF 5'-GGGGATGTTTGGAGGCAGATTTG-3' MR 5'-AACCGCTTCGGACTTCCACCAG-3'	500bp	Hu <i>et al.</i> (2011)
<i>Meloidogyne incognita</i>	Mi-F 5'-GTGAGGATTCAGCTCCCCAG-3' Mi-R 5'-ACGAGGAACATACTTCTCCGTCC-3'	1,000bp	Hu <i>et al.</i> (2011)
<i>Meloidogyne javanica</i>	Fjav 5'-GGTGC GCGATTGAACTGAGC-3' Rjav 5'-CAGGCCCTTCAGTGGA ACTATAC-3'	700bp	Meng <i>et al.</i> (2004)
<i>Meloidogyne arenaria</i>	Far 5'-TCGGCGATAGAGGTAATGAC-3' Rar 5'-TCGGCGATAGACTACAAACT-3'	420bp	Zijlstra <i>et al.</i> (2000)
<i>Meloidogyne enterolobii</i>	Me-F 5'-AACTTTTGTGAAAGTGCCGCTG-3' Me-R 5'-TCAGTTCAGGCAGGATCAACC-3'	200bp	Long <i>et al.</i> (2006)

ตารางที่ 3 องค์ประกอบและปริมาณของสารเคมีที่ใช้การทำปฏิกิริยา multiplex PCR

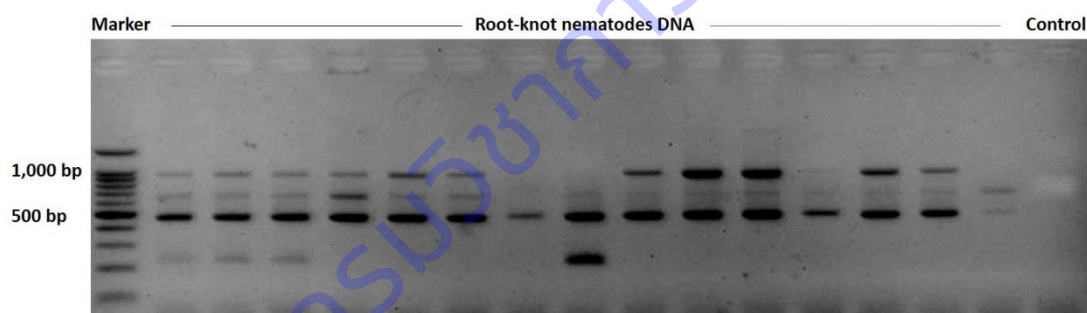
component	Final conc.	1X
5x Gotaq Flexi (Promega, Inc.)	1X	7 ul
25mM MgCl ₂ (Promega, Inc.)	2.5 mM	3.5 ul
dNTP (Promega, Inc.)	0.4 mM	1.4 ul
MF	0.07 uM	0.245 ul
MR	0.07 uM	0.245 ul
Me-F	0.12 uM	0.525 ul
Me-R	0.12 uM	0.525 ul
Mi-F	0.24 uM	0.840 ul
Mi-R	0.24 uM	0.840 ul
Fjav	0.245 uM	0.875 ul
Rjav	0.245 uM	0.875 ul
Far	0.24 uM	0.840 ul
Rar	0.24 uM	0.840 ul
Taq DNA Polymerase (Promega, Inc.)	0.5 U/ul	0.28 ul
Template DNA		3 ul
dH ₂ O		13.17 ul
Total volume		35 ul

ตารางที่ 4 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา multiplex PCR ที่ใช้ในการทดลอง

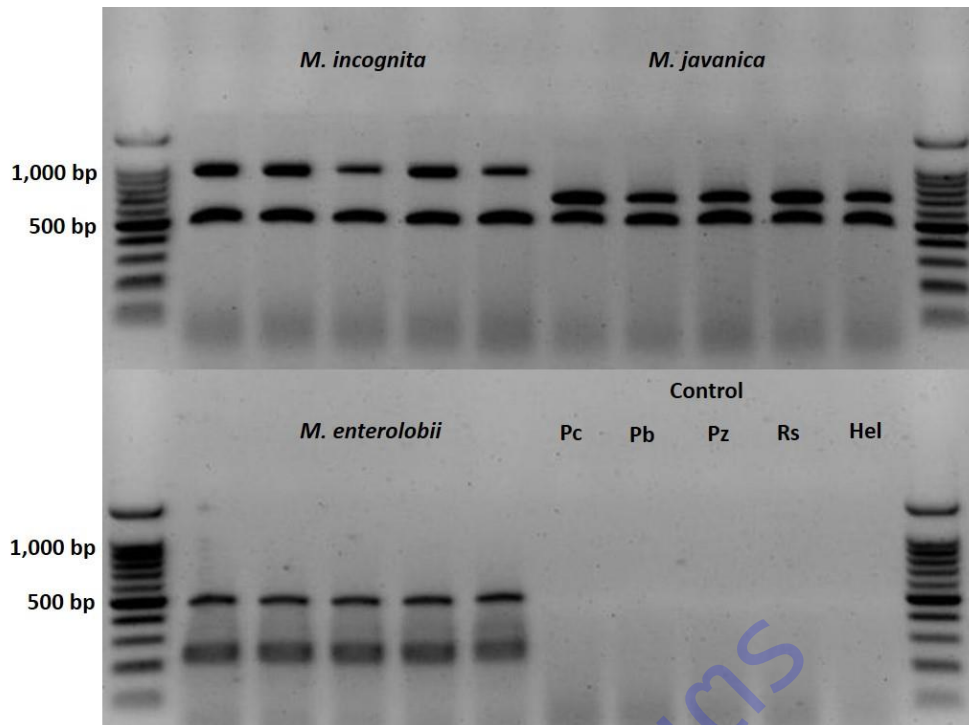
Step 1 : hot-start	95°C	5 minutes	1 cycle
Step 2 : denaturation	94°C	1 minutes	} 35 cycles
annealing	64 °C	30 seconds	
extension	68°C	1 minutes	
Step 3 : final extension	72°C	5 minutes	1 cycle

ตารางที่ 5 ผลการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากมะเขือเทศ ที่ปลูกด้วยไส้เดือนฝอยแต่ละชนิด คือ *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ที่ 15 20 และ 30 วัน

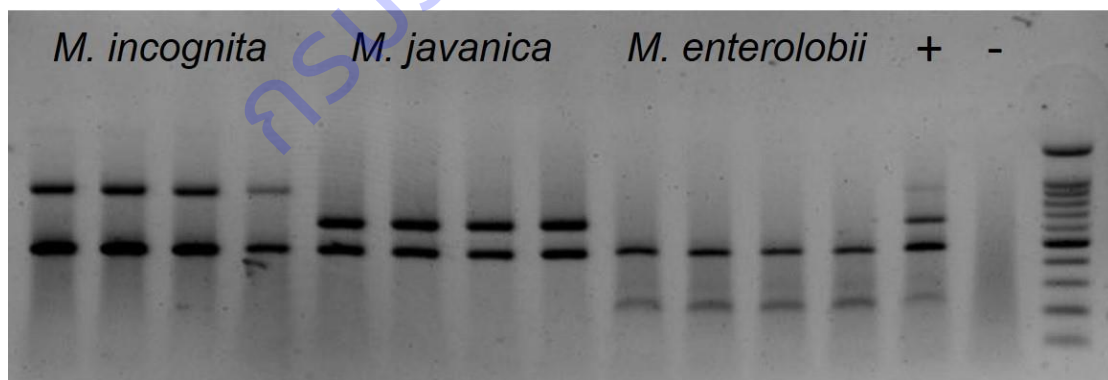
ผลการตรวจไส้เดือนฝอยแต่ละชนิด (%)			
วันหลังปลูกเชื้อ	<i>M. incognita</i>	<i>M. javanica</i>	<i>M. arenaria</i>
15	100	100	100
20	100	100	100
30	100	100	100



ภาพที่ 1 การทดสอบสถานะปฏิกิริยา multiplex PCR กับตัวอย่างดีเอ็นเอผสมของไส้เดือนฝอยรากปมชนิดต่าง ๆ พบว่าไพรเมอร์คู่ต่าง ๆ สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดตรงตามเป้าหมาย (*Meloidogyne* internal control 500 คู่เบส, *M. incognita* 1,000 คู่เบส, *M. javanica* 700 คู่เบส และ *M. enterolobii* 200 คู่เบส)



ภาพที่ 2 การทดสอบความจำเพาะเจาะจงของปฏิกิริยา multiplex PCR กับไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ไอโซเลตต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอของไส้เดือนฝอยศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ ได้แก่ *Pratylenchus coffeae*, *P. brachyurus*, *P. zaeae*, *Radopholus similis* และ *Helicotylenchus* sp.



ภาพที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพในการตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืช ที่ปลูกเชื้อด้วยไส้เดือนฝอยแต่ละชนิด คือ *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* (*Meloidogyne* internal control 500 คู่เบส, *M. incognita* 1,000 คู่เบส, *M. javanica* 700 คู่เบส และ *M. enterolobii* 200 คู่เบส)

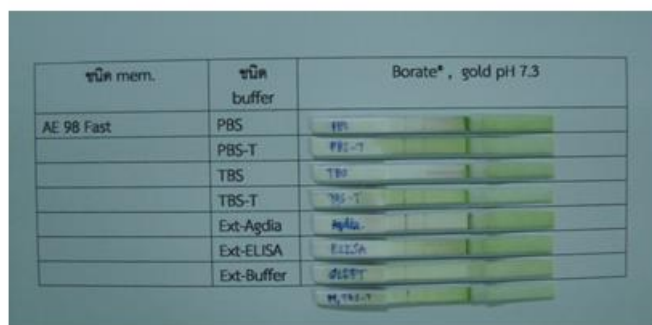
การทดลองที่ 2.17 การผลิตชุดตรวจสอบแบบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) (ปีเริ่มต้น 2563 - 2564)

เมื่อนำ Immuno gamma-globulin (IgG) ของ LYSV มาปรับให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และทำการทดสอบคุณภาพของ IgG ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการตรวจสอบไวรัส LYSV โดยวิธี NCM-ELISA พบว่า IgG ที่ผลิตได้สามารถตรวจหาเชื้อไวรัสได้และมีค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA คือ 1:1,000 นำ IgG ที่เตรียมได้ไป conjugate กับสารละลายอนุภาคทองแขวนลอย (colloidal gold) ได้เป็น IgG ที่ติดสลากรด้วยอนุภาคทอง (gold conjugated IgG or gold particle labeled IgG) เป็นสี cherry red เนื่องจากอนุภาคของทอง ที่มีลักษณะ monodisperse colloid ที่มีความคงตัวและมีขนาดประมาณ 40 nm มีความไวและคงรูปเมื่อนำไปใช้ในการ conjugate กับ IgG ของไวรัส (Hampton *et al.*, 1990) เมื่อทดลองหยอด Gold labeling IgG ในปริมาณ 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร พบว่าที่อัตรา 1.5-2.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร ให้ปฏิกิริยาของสีที่เส้น test line ชัดเจนใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นที่ 2.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จะมีปริมาณของ Gold labeling IgG มากเกินไป ทำให้เกิดการไหลกลับลงมาที่ control line และ test line ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงได้เลือกใช้อัตรา 2.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จากนั้นทำการเตรียมแผ่น Conjugate Release pad (CRP) ด้วยการใส่เครื่องสเปร์ Bio dot หัวสเปร์รี่ Air jet ลงบนแผ่น CRP ปริมาณ 2 ไมโครลิตร/เซนติเมตร แล้วนำไปอบแห้ง ที่ 37°C นาน 2 ชั่วโมง มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5x15 เซนติเมตร แล้วนำไปเก็บไว้ในกล่องดูความชื้นที่แห้ง ความชื้นไม่เกิน 40 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นได้นำแผ่น nitrocellulose membrane (NCM) เปรียบเทียบกัน 3 ชนิด คือ AE 98 Fast, AE 99 และ AE 100 มาทำเส้น test line และ control line โดยใช้เครื่องสเปร์ Bio dot หัวสเปร์รี่ Bio jet พร้อมกัน 2 หัว โดยหัวสเปร์รี่ที่ 1 พ่น Goat anti-rabbit (GAR) โดยใช้ GAR ที่เจือจาง 1:3 เป็นเส้น control line อัตรา ในอัตรา 1.0 ไมโครลิตร/เซนติเมตร และหัวสเปร์รี่ที่ 2 พ่น IgG ของ LYSV เป็นเส้น test line อัตรา 1.5 ไมโครลิตร/เซนติเมตร จากนั้นนำไปอบแห้งที่ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำแผ่น CRP ที่ติดสลากรด้วยอนุภาคทอง และแผ่น NCM ที่ได้สเปร์รี่เส้น test line และ control line มาประกอบเป็นชุดตรวจสอบ บนแผ่น backing โดยประกอบร่วมกับแผ่น Sample pad และแผ่น Absorbent pad รวมเป็นชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip และเมื่อนำชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip ทดสอบด้วยการตรวจสอบเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นใบกระเทียมที่แสดงอาการโรค ใบต้นกระเทียมปกติ พร้อมเปรียบเทียบชนิดของ sample buffer ต่อปฏิกิริยาบนชุดตรวจสอบโดยใช้บัฟเฟอร์ จำนวน 7 ชนิด พบว่าปฏิกิริยาเกิดได้ดีใน nitrocellulose membrane (NCM) ชนิด AE 98 Fast แม้มีความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจนเท่าที่ควรบนเส้น test line ของชุดตรวจสอบ และทำปฏิกิริยาบนเส้น control line เกิดได้เร็วที่สุด (ตารางที่ 1) ส่วนบัฟเฟอร์ที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาบนเส้น control line และไม่เกิดปฏิกิริยาแบบ false positive คือเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line หรือปฏิกิริยาข้ามนั้นคือบัฟเฟอร์ TBS-T และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของสีที่ control line พบว่า การใช้ TBS-T ให้ผลดีที่สุดถึงแม้จะจาง แต่ไม่ทำให้เกิด false positive คือเกิดปฏิกิริยาบนเส้น test line ส่วนเมื่อใช้

บัฟเฟอร์ชนิดอื่นที่นำมาทดสอบเปรียบเทียบนั้น จะไม่เหมาะสมกับตัวอย่างพืชและมี background สีเข้มและสกปรกและเกิด false positive และเมื่อทดสอบกับพืชปกติด้วยการใช้บัฟเฟอร์ TBS-T บดใบกระเทียม ไม่ทำให้เกิด false positive เช่นกัน (ภาพที่ 6) และในการทดสอบประสิทธิภาพความไวในการตรวจหาไวรัส LYSV ในน้ำคั้นที่เจือจางในอัตราส่วนต่างๆ กัน เมื่อนำ Lateral flow test strip มาจุ่มตรวจสอบ อ่านผลของปฏิกิริยาใน 5-6 นาที พบว่าชุด Lateral flow test strip สามารถตรวจพบไวรัสได้ ที่ความเข้มข้นของน้ำคั้นที่เจือจาง 1:10 ซึ่งให้สีแดงม่วงของปฏิกิริยาที่ไม่เข้มมากแต่ดีกว่าเมื่อเทียบกับระดับเจือจางอื่น จึงสรุปว่าชุด Lateral flow test strip มีความไวในการตรวจ LYSV ในน้ำคั้นตัวอย่างที่อัตรา 1:10 ชัดเจนที่สุดในเส้น test line เช่นเดียวกับ control line ภายในระยะเวลาประมาณ 5-6 นาที โดยที่ตัวอย่างน้ำคั้นใบกระเทียมปกติปรากฏเฉพาะ control line ทั้งนี้ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น เส้น test line ยังไม่ชัดเจนเท่าที่ควร อาจเนื่องจากในขั้นตอนการสกัด IgG ของ LYSV ที่ใช้สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิมตัวในการตกตะกอน IgG แล้วทำการ dialyse ใน ½ PBS นั้น อาจเนื่องมาจากแอมโมเนียมซัลเฟตละลายออกไปไม่หมด จึงมีผลกับการ conjugate IgG กับอนุภาคทอง เนื่องจาก colloidal gold ตกตะกอน ทำให้การ conjugate IgG และอนุภาค ทองไม่ดี ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจึงไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจต้องนำ IgG ไป dialyse ใน ½ PBS ซ้ำ เพื่อให้ IgG สะอาดและมีคุณภาพขึ้น นอกจากนี้ในขั้นตอนการเตรียม Gold conjugated IgG เวลาที่มีผลต่อการเชื่อมต่อ (conjugate) การกวนสารละลายของ IgG และสารละลายอนุภาคทองแขวนลอย เมื่อเติม BSA แล้วทำการกวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคทองจับกับ IgG ดีขึ้น

ตารางที่ 1 Different types of nitrocellulose membranes were compared

NCM	AE 100	AE 99	AE 98 Fast
Line			
LYSV	+	+	+++
Control line	++	++	+++



ภาพที่ 6 เปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ 7 ชนิด บน nitrocellulose membrane ชนิด AE 98 Fast

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ (Conclusion and Suggestion)

กิจกรรมการพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก ได้พัฒนาเทคนิคการตรวจสอบศัตรูพืชที่สำคัญในพืชเศรษฐกิจหลายชนิด ผลการพัฒนาทำให้ได้วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชที่ทันสมัย มีประสิทธิภาพ ลดขั้นตอนการจำแนกชนิด สามารถตรวจหาศัตรูพืชอย่างถูกต้องได้อย่างรวดเร็ว นำมาสู่การแนะนำการควบคุมโรคในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพได้แก่

ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ในพืชตระกูลกระหล่ำ มีความไวในการตรวจเชื้อ Xcc 10^4 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSMoV ที่สร้างจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส WSMoV ค่าความเจือจางของแอนติซีรัมสูงสุดที่ 16,384 เท่า

วิธีการตรวจสอบรา *P. citriasiana* ในไม้ผลหลายชนิด ได้แก่ สมอ ฝรั่ง กล้วย แก้วมังกร ทับทิม ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อรา *P. citriasiana* จำนวน 3 คู่ ได้แก่ PcDOAF1/ITS4 PcDOAF3/ITS4 และ PcDOAF3/ PcDOAR3

วิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยใช้ primers ที่ออกแบบจากยีน immunodominant membrane protein genes (IDPs)

โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส LYSV โดยมีค่าไตเตอร์ 1:102400 โดยวิธี ELISA

วิธีการตรวจสอบราในสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* สาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์จำเพาะต่อรา *N. dimidiatum* จำนวน 2 คู่ ได้แก่ NdDOA-8F/NdDOA-6R และ NdDOA-7F/ITS4 ที่สามารถตรวจผลได้รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ

การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ NAD, คู่ไพรเมอร์ PC2 และคู่ไพรเมอร์ PCFVd ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนและคมชัดสามารถนำไปใช้กับงานในห้องปฏิบัติการที่เป็นงานประจำได้อย่างดีและเหมาะสม

การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SCMV-NSW (PAb-SCMV-NSW) มีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 6,400 - 12,800 โดยอัตราความเจือจางที่ 1:1,000 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพด และมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพด

การพัฒนาต้นแบบ (Prototype) ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย แต่ยังไม่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบได้ เนื่องจากความเข้มข้นไม่เหมาะสมสำหรับนำมาพัฒนาชุดตรวจสอบ แต่สามารถนำแอนติซีรัมที่ผลิตไปใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA แทนได้

การพัฒนาชุดตรวจ(strip test) เชื้อไวรัสทริสเทฮาในพืชตระกูลส้มโดยใช้ crude CTV-IgG จากแอนติบอดีของไวรัสทริสเทฮาเชื่อมเข้ากับ อนุภาคทองเท่ากับ 30 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ร่วมกับ standard 14 เป็น conjugate release และเมมเบรนชนิด CN140 (analytical membrane) แสดงผลปฏิกิริยาได้ชัดเจน

ผลปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นประมาณ 5-15 นาที ชุดตรวจเชื้อไวรัสทริสเทซ่าแบบ strip test ช่วยให้การตรวจสอบทำได้รวดเร็ว สะดวกโดยเฉพาะกับการนำไปตรวจในสภาพแปลง

การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* สามารถใช้จำแนกแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* ทุกระยะการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว สามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยเพื่อเฝ้าระวังแมลงศัตรูพืชและการนำเข้าและส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย

การผลิตโพลิโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMP จาก *imp* gene ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อย มีค่าไตเตอร์ 1:128 - 1:16,384 เท่า มีความจำเพาะต่อเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

การพัฒนาวิธีการตรวจแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค real-time PCR พบว่าสามารถตรวจเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดได้ในอัตราส่วนเมล็ดติดเชื้อต่อเมล็ดดี เพียงแค่ที่อัตรา 1:100 เทคนิค real-time PCR จึงมีความไวเหมาะสมที่นำไปใช้เพื่อการตรวจเชื้อ Xcc ที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์

วิธีการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification เป็นวิธีการที่สะดวกรวดเร็วใช้เวลาประมาณ 30 นาที มีความจำเพาะเจาะจง มีความไวในการตรวจสอบดีเอ็นเอของ *M. enterolobii* ได้ถึงความเข้มข้น 15 พิโคกรัม

การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* สามารถใช้จำแนกทุกระยะการเจริญเติบโต (ไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย) ได้ภายในระยะเวลา 2 - 3 ชั่วโมง สามารถนำไปใช้ในการวินิจฉัยเพื่อเฝ้าระวังแมลงศัตรูพืชและการนำเข้าและส่งออกผักผลไม้ของประเทศไทย

วิธีการตรวจจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค multiplex PCR สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ขนาดตรงตามเป้าหมาย และสามารถจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม ทั้ง 3 ชนิดได้ในการทำปฏิกิริยารั้งเดียว มีความจำเพาะเจาะจงและแม่นยำในการตรวจ และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอที่สกัดจากปมรากพืชได้

การพัฒนาชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส LYSV สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างน้ำคั้นใบกระเทียมที่เป็นโรค ที่ความเข้มข้น 1:10 เห็นผลภายในเวลา 5-6 นาที โดยสามารถตรวจหาไวรัส LYSV ในสภาพแปลงปลูกเพื่อคัดเลือกและตรวจสอบกระเทียมก่อนนำไปใช้ในการผลิตหัวพันธุ์กระเทียมปลอดโรคหรือการปรับปรุงพันธุ์กระเทียมได้ด้วยโดยสามารถนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัยได้ด้วยตนเอง

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชชุกักกันเข้ามาในประเทศ และใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจรับรองสินค้าเกษตรในการส่งออกตามเงื่อนไขของประเทศคู่ค้า ประกอบด้วย 2 กิจกรรม ดังนี้

กิจกรรมที่ 1 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชชุกักกัน จำนวน 8 ชนิด ให้ทันสมัย รวดเร็ว แม่นยำมากขึ้นได้แก่แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*, *Burkholderia glumae*, *Ralstonia solanacearum* species complex, *Pseudomonas fuscovaginae*, ไวรัส African Cassava Mosaic Virus, Sri Lankan cassava mosaic virus และ รา *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* สายพันธุ์ Tropical Race 4 เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการป้องกันไม่ให้ศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชชุกักกันเข้ามาสู่การเกษตรในประเทศไทยและเป็นเครื่องมือในการตรวจสอบติดตามและตรวจหาศัตรูพืชเหล่านี้ในประเทศไทยเพื่อคงสภาพการเป็นศัตรูพืชชุกักกัน

กิจกรรมที่ 2 สามารถพัฒนาวิธีการตรวจสอบศัตรูพืชที่สำคัญในพืชเศรษฐกิจหลายชนิดให้ทันสมัย มีประสิทธิภาพ ลดขั้นตอนการจำแนกชนิด สามารถตรวจหาศัตรูพืชได้อย่างถูกต้องได้อย่างรวดเร็ว นำมาสู่การแนะนำการควบคุมโรคในสภาพแปลงได้อย่างมีประสิทธิภาพได้แก่ ชุดตรวจสอบอิมมูโนสตริปสำหรับแบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* ในพืชตระกูลกระหล่ำ ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป SecA-SWL kit เพื่อตรวจสอบเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย ชุดตรวจ(strip test) เชื้อไวรัสทริสเทซาในพืชตระกูลส้ม และชุดตรวจสอบ Lateral flow test strip เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* ในกระเทียม วิธีการตรวจหาวิธีการตรวจสอบรา *Phyllosticta citriasiana* ในไม้ผลหลายชนิด ได้แก่ ส้มโอ ฝรั่ง กัลยัม แก้ว มังกร ทับทิม ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล วิธีการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย โดยใช้ primers ที่ออกแบบจากยีน immunodominant membrane protein genes (IDPs) วิธีการตรวจสอบราในสกุล *Neoscytalidium* และรา *N. dimidiatum* สาเหตุโรคลำต้นจุดสีน้ำตาลของแก้วมังกรด้วยเทคนิค PCR วิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) การพัฒนาไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อแมลงวันแดง *Zeugodacus cucurbitae* และ แมลงวันทองฝรั่ง *B. correcta* เพื่อใช้ในการวินิจฉัยแมลงวันแดง *Z. cucurbitae* และแมลงวันทองฝรั่ง *Bactrocera correcta* ด้วยเทคนิค PCR วิธีการตรวจแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *campestris* ที่ติดมากับเมล็ดด้วยเทคนิค real-time PCR วิธีการตรวจสอบไส้เดือนฝอยรากปม *Meloidogyne enterolobii* ด้วยเทคนิค Loop Mediated Isothermal Amplification และ วิธีการตรวจจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยรากปม *M. incognita*, *M. javanica* และ *M. enterolobii* ด้วยเทคนิค multiplex PCR นอกจากนี้ยังได้ แอนติบอดีที่เฉพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคพืชได้แก่ โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus*

แอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (PAb-SCMV-NSW) โพลีโคลนอลแอนติบอดี SWL-IMP จาก *imp* gene ที่ความจำเพาะต่อเชื้อสาเหตุโรคใบขาวอ้อย

ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป วิธีการตรวจสอบศัตรูพืชด้วยเทคนิคเซรัมวิทยา และชีวโมเลกุล และแอนติบอดีที่เฉพาะต่อศัตรูพืชที่ได้ที่พัฒนาได้ในโครงการนี้ สามารถนำไปปรับใช้ในการตรวจหาศัตรูพืช ให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาศัตรูพืชในสินค้าเกษตรป้องกันศัตรูพืชต่างถิ่นร้ายแรงหรือศัตรูพืชกักกันไม่ให้เข้ามาในประเทศ และเพื่อการป้องกันกำจัด และ ใช้ในการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการค้าระหว่างประเทศ เป็นวิธีการตรวจหาศัตรูพืชที่ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับ และสามารถตรวจสอบศัตรูพืชได้ในปริมาณของเพียงเล็กน้อย ย่นระยะเวลาการตรวจให้เร็วขึ้นทำให้ทันต่อสถานการณ์การค้าระหว่างประเทศ และสามารถวางแผนการป้องกันกำจัดได้รวดเร็วทันต่อเหตุการณ์ นอกจากนี้เป็นการประหยัดเงินในการนำเข้าชุดตรวจสอบศัตรูพืชจากต่างประเทศ เป็นการพัฒนางานวิจัยของนักวิชาการไทยให้เป็นที่ยอมรับของต่างประเทศอีกด้วย

กรมวิชาการเกษตร

บรรณานุกรม

- กรมการค้าต่างประเทศ. 2559. สถิติการส่งออกข้าวโพด เดือนธันวาคม 2558. <http://www.dft.go.th/Default.aspx?tabid=164>
- กรมส่งเสริมการเกษตร. ระบบสารสนเทศการผลิตทางด้านเกษตร online. 2562. (ระบบออนไลน์).
แหล่งข้อมูล: <https://production.doae.go.th/service/report-product-statistic/> (11 กุมภาพันธ์ 2562).
- กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, 2554, โรคผักและการป้องกันกำจัด, หน้า 138.
- จันทร์เพ็ญ ปุกสูงเนิน. 2551. การสำรวจและการตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Brome mosaic virus* ในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 88 หน้า.
- ธีระ สุตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. บริษัทพินนี่พับบลิชชิง, กรุงเทพฯ.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย กาญจนา วาระวิชณี และวันเพ็ญ ศรีชาติ. 2555. การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1859-1889.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยต์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภาควิชาโครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว 2542. โรคใบขาวของอ้อยและยุทธการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว 2542. โรคใบขาวของอ้อยและยุทธการป้องกันกำจัด. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว, ยุพา หาญบุญทรง พิศาล ศิริธร สมคิด บุญครอง และชุตินันท์ ชูสาย. 2541. การพัฒนาเทคนิคการตรวจเชื้อไฟโตพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยในระดับไรโดยวิธี DNA probe. รายงานการประชุมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติครั้งที่ 3, หน้า 50-61. กรุงเทพฯ. สมาคมวิชาการอ้อยและน้ำตาลทรายแห่งชาติร่วมกับสำนักคณะ กรรมการอ้อยและน้ำตาล.
- พรทิพย์ วงศ์แก้ว. 2544. มอลลิวีทส์สาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืชวิทยา คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พรพิมล อธิปัญญาคม ศรีสุรางค์ ลิขิตเอกราช สุธามาศ ฦ น่าน บุรณี พัวพงษ์แพทย์ ดารุณี ปุญญพิทักษ์ และ ไมตรี พรหมมินทร์. 2550. โรคจุดดำของส้มโอสาเหตุเกิดจากรา *Phyllosticta citricarpa*.

- หน้า 1-12. ใน การประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 8 “อารักขาพืชไทยได้ร่วมพระบารมี” ณ โรงแรมอมรินทร์ลากูน จังหวัดพิษณุโลก. 20-22 พฤศจิกายน 2550.
- พรพิมล อธิปัญญาคม สุณีรัตน์ สิมะเต็อ และ ชนินทร ดวงสะอาด. 2558. การจำแนกชนิดของราสกุล *Phyllosticta* สาเหตุโรคพืช โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางพันธุกรรม ใน รายงานความก้าวหน้าสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
- พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ อมรรัตน์ หล้าพรหม วิมล สีเทา และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2549. การตรวจพบ *Maize chlorotic mottle virus* ข้าวโพดหวานร่วมกับ *Sugarcane mosaic virus*. ประชุมเชิงปฏิบัติการ โครงการวิจัยแม่บทข้าวโพดข้าวฟ่างแห่งชาติครั้งที่ 2 วันที่ 9-11 มีนาคม 2549 ณ สีตารีสอร์ท อ. เมือง จ. นครนายก (โปสเตอร์).
- พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ อมรรัตน์ หล้าพรหม และ วิมล สีเทา. 2547. การตรวจพบ *Maize chlorotic mottle virus* เข้าทำลายข้าวโพดหวานร่วมกับ *Sugarcane mosaic virus*. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ. 2543. เอกสารประกอบคำบรรยาย เรื่องไวรัสสาเหตุโรคพืช. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, นครปฐม 45 หน้า.
- พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ. 2544. โรคของมะเขือเทศที่เกิดจาก *tomato spotted wilt virus*. รายงานประจำปี 2544. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน นครปฐม.
- ไมตรี พรหมมินทร์ แสนชัย คำหล้า และมนต์ชัย คงสมโอษฐ์. 2555. โรคที่สำคัญของส้ม. หน้า 9 – 25. ใน การประชุมวิชาการส้ม “เหลียวหลัง แลหน้า อนาคตส้มไทย”. กรมวิชาการเกษตร และสมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย 21 -22 กุมภาพันธ์ 2555 ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส จังหวัดเชียงใหม่
- ไมตรี พรหมมินทร์. 2534. โรคทริสเทซาและโรคใบเหลืองต้นโทรมหรือโรคกรีนนิง. เอกสารวิชาการเทคโนโลยีป้องกันและกำจัดโรคส้ม กองป้องกันและกำจัดศัตรูพืชกรมส่งเสริมการเกษตร. หน้า 41 – 47.
- ยุพา โพธิ์แก้ว. 2556. การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในพืชตระกูลส้ม. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.ศุจิรัตน์ สงวนรังศิริกุล อธิรุฒิ วงศ์นารินทร์ สุรศักดิ์ แสนโคตร ทักษิณา ศันสยะวิชัย และสุนี ศรีสิงห์ 2555. SecA เครื่องหมายโมเลกุลใหม่ในการตรวจโรคใบขาวของอ้อยที่แม่นยำสูง. ผลงานวิจัยดีเด่นกรมวิชาการเกษตรประจำปี 2555. หน้า 1-15.กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ISBN : 978-974-436-832-4.
- รัชนิวรรณ ทวีแก้ว. 2549. เทคนิคเรื่อง PCR. รายวิชาวิทยาไวรัสเบื้องต้น ภาคเรียนที่ 1 ปีการศึกษา 2549. มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.
- รัตนา สดุดี. 2555. การพัฒนาการตรวจโรคทริสเทซาของส้มโดยเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีคลาเทอรัลโพลี. ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

- ลำพิ่ง เรียงวงษ์ สุภาภรณ์ เอี่ยมแข่ง และ อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2547. การสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียวในระบบเซลล์แบคทีเรีย. รายงานการประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. หน้า 110-117.
- วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี (2557). กระเทียม สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2557 Web site: <http://th.wikipedia.org/wiki/กระเทียม>
- วิมล สีเทา. 2548. การตรวจวินิจฉัยและจำแนกทอสปอไวรัสของพริก มะเขือ แตงโม และถั่วลิสง ที่พบในประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.
- ศศิประภา มาราช คณินนิตย์ เจริญวรการ สุพัฒน์ อรรถธรรม และรัชณี ฮงประยูร. 2550. ผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้าที่เกิดจากเชื้อ *Columnea latent viroid*. **วารสารโรคพืช**. ปีที่ 21 เล่มที่ 1-2. หน้า 47-60.
- ศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 2551. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ครั้งที่ 1. 25 น.
- ศูนย์สารสนเทศการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2562. กล้วย: เนื้อที่ให้ผล ผลผลิต และผลผลิตต่อไร่ ปี 2551 – 2561. (ระบบออนไลน์). แหล่งข้อมูล: <http://www.oae.go.th/download/prcai/farmcrop/banana.pdf> (11 กุมภาพันธ์ 2562).
- สำนักข่าวแห่งชาติ กรมประชาสัมพันธ์. 2551. ไบโอมเทคพัฒนาชุดตรวจโรคใบขาวในอ้อย ชุดแรกของโลก แก้ปัญหาชาวไร่ อ้อย. แหล่งที่มา :(http://thainews.prd.go.th/view.php?m_newsid=255108050293&tb=N255108, 24 สิงหาคม 2554)
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2559. สถิติการส่งออก.http://www.oae.go.th/oae_report/export_import/export_result.php
- สุภาพร กลิ่นคง พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ สุพัฒน์ อรรถธรรม และรุ่งโรจน์ อุทศน์. 2540. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ ไฟโตพลาสมา สาเหตุโรคพืชบางชนิดที่พบในประเทศไทย,น.418 - 425.ในการประชุม ทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่35 สาขาพืช ส่งเสริมและนิเทศศาสตร์เกษตร อุตสาหกรรมเกษตร วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. กรุงเทพฯ.
- สุรภี กิรติยะอังกูร วันเพ็ญ ศรีทองชัย ญัฐธิดา โฆษิตเจริญกุล และ เขียวภา ตันติวานิช. 2551. รายงานผลวิจัยเรื่องเต็ม “โครงการผลิต GLIFT kit เพื่อวินิจฉัยโรคไวรัสและแบคทีเรียของพืชเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์” กรมวิชาการเกษตร. 67 หน้า.
- Armstrong, K. F., and Ball, S. L. 2005. DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 360(1462): 1813-1823.
- Athipunyakom P, S. Seemadua and C. Dungsard. 2015. Diseases of dragon fruit in Thailand: Incidence and Management Strategies pp. 95-106. In International Workshop on

- Improving Pitaya Production and Marketing, Frengshan, Kaohsiung, Taiwan, 7 - 9 September 2015.
- Barbara, D. J., Mortor, A., Clark, M. F., and Davies, D. L. 2002. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasma in the aster yellows clade (chlorante aster yellow and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology*. 148 : 157-167.
- Bentley S., N.Y. Moore and J. Pattemore. 2003. *Fusarium wilt diagnostics laboratory manual*. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane.
- Berg, M., Davies, D. l., Clark, M. F., Vetten, H. J., Maier, G., Marcone, C. and Seemuller, E. 1999. Isolation of gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product. *Microbiology*. 145 : 1937-1943.
- Blomquist, [C. L.](#), Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., and Kirkpatrick, [B. C.](#) 2001. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology*. 147 : 571-580.
- Blomquist, [C. L.](#), Barbara, D. J., Davies, D. L., Clark, M. F., and Kirkpatrick, [B. C.](#) 2001. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas. *Microbiology*. 147 : 571-580.
- Boonham, N., P. Smith, K. Walsh, J. Tame, J. Morris, N. Spence, J. Bennison and I. Barker. 2002. The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). *J. Virol. Methods*. 101: 37-48.
- Boontop, Yuvarin. 2016. Natural variation and biogeography of *Zeugodacus cucurbitae* in south-east Asia and the west-Pacific. Ph.D. Thesis. Queensland University of technology, Brisbane, Australia. 346 pp.
- Bos, L. 1983. Viruses and virus diseases of Allium species. *Acta Horticulturae* 127: 11-29.
- Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., and Maat, D.Z. 1978. Leek yellow stripe virus and its relationships to Onion yellow dwarf virus - characterization, ecology, and possible
- Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P., Rivera- sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160, 1593-1619.

- Calvert L.A. and J.M. Thresh. 2002. The Viruses and Virus Diseases of. Cassava,chapter 12. *In* CAB Internacional 2002. Cassava : Biology, Production and Utilization (ed. K. J. Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti) Kent ME4 4TB,UK. : 237-260.
- Cenis, J.L., Perez, P., Fereres, A., 1993. Identification of aphid (*Homoptera*, Aphidae) species and clones by Random amplified polymorphic DNA, *Ann. Entomol Soc Am.* 86 : 545-550.
- Cerovska, N., T. Moravec, P. Rosecka, P. Dedic and M. Filigarova. 2003. Production of polyclonal antibodies to a recombinant coat protein of Potato mop-top virus. *Journal of Phytopathology* 151 (4) : 195-200.
- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993 A simple and efficient method for isolating RNA from pine. *Plant Mol. Biol. Rep.* 11: 113-116.
- Chittarath, K., Jimenez, J., Vongphachanh, P., Leiva, A.M., Sengsay, S., Lopez-Alvarez, D., Bounvilayvong, T., Lourido, D., Vorlachith, V., Cuellar, W.J., 2021. First report of *Sri Lankan cassava mosaic virus* and Cassava Mosaic Disease in Laos. *Plant Dis.* 105 (6). 1861.
- Conde, B.D. and R.N. Pitkethley. 2001. The discovery, identification and management of banana Fusarium wilt outbreaks in the Northern Territory of Australia. In: Molina AB, Nik Masdek NH, Liew KW (eds) *Banana Fusarium wilt management: towards sustainable cultivation. Proceedings of the International workshop on the banana Fusarium wilt disease, Genting Highlands Resort, Malaysia, 18–20 October 1999.* INIBAP, Montpellier. p 260–265.
- control. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 84(5): 185-204. CAB International. 2007. *Crop Protection Compendium 2007 Edition.* (Computer Program).CAB International. Wallingford, UK.
- Cove, D.J. 1976. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterization of chlorate resistant mutants. *Heredity* 36, 191-203.
- De Meyer, M., Delatte, H., Mwatawala, M., Quilici, S., Vayssieres, J. F., & Virgilio, M. (2015). A review of the current knowledge on *Zeugodacus cucurbitae* (Coquillett)(Diptera, Tephritidae) in Africa, with a list of species included in *Zeugodacus*. *ZooKeys*, (540), 539.
- De Queiroz, K. (2007). Toward an integrated system of clade names. *Systematic Biology*, 56(6), 956-974.

- Dhillon, M. K., Singh, R., Naresh, J. S., & Sharma, H. C. (2005). The melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae*: A review of its biology and management. *Journal of Insect Science*, 5(1), 40. doi.org/10.1016/j.ympev.2012.05.006
- Dita M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, Jr M.T. Souza and G.H.J. Kema. 2010. A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana fusarium wilt pathogen. *Plant Pathology* 59: 348-357.
- Dita, M.A., C. Waalwijk, I.W. Buddenhagen, M.T. Jr Souza and G.H. Kema. 2011. Corrigendum. *Plant Pathology* 60: 384.
- Divinagracia, G.G., B.L. Candole and E.T. Cadapan. 1984. Some studies on bacterial brown spot of orchids caused by *Pseudomonas cattleyae* (Pavarino) saverlesco. Summary in Philippine Phytopathology 20: 3-4.
- Doungsa-ard, C., A.R. McTaggart, A.D.W. Geering, T.U. Dalisay, J. Ray and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44: 25-30.
- Doungsa-ard, C., McTaggart, A.R., Geering, A.D.W., Dalisay, T.U., Ray, J. and R.G. Shivas. 2015. *Uromycladium falcatarium* sp. nov., the cause of gall rust on *Paraserianthes falcataria* in south-east Asia. *Australasian Plant Pathology* 44: 25-30.
- Drew, R. A. I., & Romig, M. C. (2013). *Tropical Fruit Flies (Tephritidae: Dacinae) of South-East Asia: Indomalaya to North-West Australasia*. CABI.
- Druka, A., T. Burns, S. Zhang and R. Hull. 1996. Immunological characterization of rice tungro spherical virus coat proteins and differentiation of isolates from the Philippines and India. *J. Gen. Virology*. 77: 1975-1983.
- Dutt, N., Briddon, R.W., Dasgupta, I., 2005. Identification of a second begomovirus, *Sri Lankan cassava mosaic virus*, causing cassava mosaic disease in India. *Arch. Virol.* 150, 2101-2108.
- Eran, O., Dana, B., Stephanie G., Jonathan B. and Tom R. 2005. The Bacterial ATPase SecA Functions as a Monomer in Protein Translocation. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(10) : 9097-9105.
- Eran, O., Dana, B., Stephanie G., Jonathan B. and Tom R. 2005. The Bacterial ATPase SecA Functions as a Monomer in Protein Translocation. *The Journal of Biological Chemistry*. 280(10) : 9097-9105.

- Fargette, D., M. Jeger., C. Fauquet. and L.D. Fishpool. 1994. Analysis of Temporal Disease Progress of African Cassava Mosaic Virus. *Phytopathology* 54 ; 1 91-98.
- Fauquet C. and D Fargette. (1990) African Cassava Mosaic Virus: Etiology, Epidemiology, and Control. Laboratoire de Phytovirologie, ORSTOM, Abidjan, Ivory Coast. *Plant Disease*. 74 : 404-411.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. FAOSTAT Database. Rome, Italy: FAO. Retrieved on June 2019 from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Fraser-Smith, S., E. Czulowski, R.A. Meldrum, M. Zander, G.R. Balali and E.A.B. Aitken. 2014. Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Pathology* 63: 1044 – 1052. doi: 10.1111/ppa.12184.
- Freeman W. M., S. J. Walker and K. E. Vrana. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques*. 26(1): 112-22, 124-5.
- Garland, D.L., S. Leuy, R. Miller, S. Moore and S. Reicherg. 1986. Comparison of techicon latex particle immunoassay for theophylline with the abbot TDX and high pressure liquid chromatography methods. *Clinical Chemistry* 32: 1104.
- Gemechu A.L., Chiemsombat P., Attathom S., Reanwarakorn K. and Lersrutaiyotin R. 2006. Cloning and sequence analysis of coat protein gene for characterization of *Sugarcane mosaic virus* isolated from sugarcane and maize in Thailand. *Arch Virol*. 151: 167–172
- German, TL., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. *Tospoviruses : diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships*
- Gross DC, Vidaver AK, 1979. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. *Phytopathology*, 69(1):82-87
- Guamán Sarango (2009). Monitoring and pest control of Fruit flies in Thailand. Retrieved from <http://stud.epsilon.slu.se/699/>
- Gudmestad, N. C., Mallik, I., Pasche, J. S., Anderson, N. R., and Kinzer, K. 2009. A real-timePCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. *Plant Dis*. 93:649-659.
- Gudmestad, N. C., Mallik, I., Pasche, J. S., Anderson, N. R., and Kinzer, K. 2009. A real-timePCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. *Plant Dis*. 93:649-659.

- Gutierrez, C., 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from geminiviruses. *EMBO J.* 19, 792-799.
- Harrison, B.D. and D.J. Robinson. 2002. Green shoots of geminivirology. *Physio. and Mol. Plant Pathology* 60 : 215-218.
- Higuchi, R., Dollinger, G, Walsh,P.S. and Griffith,R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10:413-417.
- Higuchi, R., Dollinger, G, Walsh,P.S. and Griffith,R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)* 10:413-417.
- Hillocks R.J. and J. M. Thresh. 2000. Cassava Mosaic and Cassava Brown Streak Virus Disease in Africa : A comparative guide to symptoms and aetiologies. *In Roots7 (1) Special Issue December 2000. Kent ME4 4TB,UK.* : 1-8.
- Hiroyuki, M. and Koreaki, I. (2001). The Sec protein-translocation pathway. *TRENDS in Microbiology.* 9(10) : 494-500.
- Hiroyuki, M. and Koreaki, I. 2001. The Sec protein-translocation pathway. *TRENDS in Microbiology.* 9(10) : 494-500.
- Ibrahim, R. & Ibrahim, G.A. 1990. Handbook on Identification of Fruit Flies in the Tropics. Kaulalumpur, Malaysia, Universit Pertanian Malaysia Press.
- le, T.S. 1970. Tomato Spotted wilt Virus. C.M.I./A.A.B. Plant Virus Description No. 39. 4 p.
- Jeffries, C. and J. Tina. 2 n.d. 2004. Protocol for the Diagnosis of Quarantine Organism: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, EH 12 8NJ, United Kingdom.
- Jiang, F., Jin, Q., Liang, L., Zhang, A. B., & Li, Z. H. (2014). Existence of species complex largely reduced barcoding success for invasive species of Tephritidae: a case study in *Bactrocera* spp. *Molecular ecology resources*, 14(6), 1114-1128.0
- Jiang, F., Li, Z. H., Deng, Y. L., Wu, J. J., Liu, R. S., & Buahom, N. (2013). Rapid diagnosis of the economically important fruit fly, *Bactrocera correcta* (Diptera: Tephritidae) based on a species-specific barcoding cytochrome oxidase I marker. *Bulletin of entomological research*, 103(03), 363-371.
- Jose, A., Makesh Kumar T. and Edison S., 2008. Host range of *Sri Lankan cassava mosaic virus*. *J. Root Crops* 334, 21-25.

- Kakizawa, S., Oshima, K., Ishii, Y., Hosh, A., Maejima, K., Jung H.-Y., Yamaji, Y., and Namba, S., 2009. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung H.-Y., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S.-I., Ugaki, M., and Namba, S., 2001. Cloning and Expression Analysis of Phytoplasma Protein Translocation Genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14(9) : 1043-1050.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung H.Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S., 2004. Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellow phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 150 : 135-142.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies and A. Drummond. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28(12): 1647-1649.
- Klinkong, S. and Seemuller, E., 1993. Detection and differentiation of the mycoplasma-like organism associated with sugarcane white leaf disease using cloned extrachromosomal DNA probe. *Kasetsart J.* 27 : 98-103.
- Kotze, I.M. 1981. Epidemiology and control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease* 65:945-950.
- Koyama, J., Kakinohana, H., & Miyatake, T. (2004). Eradication of the melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, in Japan: importance of behavior, ecology, genetics, and evolution. *Annual Reviews in Entomology*, 49, 331-349.
- Krosch, M.N., Schutze, M., Armstrong, K.F., Graham, G.C., Yeates, D.K. & Clarke, A.R. 2012. A molecular phylogeny for the Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. A molecular phylogeny for the Tribe Dacini (Diptera: Tephritidae): Systematic and biogeographic implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547-1549.
- Kumar, T., Sankar, A., R Nair, R., Edison, S., 2005. Detection of Cassava mosaic virus in India: Using polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization technique. *J. Root Crops* 31, 1-6.
- Laufs, J., Jupin, I., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F., Gronenborn, B., 1995. Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* 77, 765-773.
- Lee, I M., Hammond, R.W., Davis, R.E., and Gunderson. D.E., 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16 SrDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms *Phytopathology* 83 : 834-842.
- Li, L., Wang, X. F., and Zhou G., 2004. Study on seed transmission of *Sugarcane mosaic virus*. *Acta Phytopath. Sinica.* 34(1): 37-42.
- Li, L., Wang, X.F., and Zhou G., 2007. Analyses of maize embryo invasion by *Sugarcane mosaic virus*. *Plant Sci.* 172(1): 132-138.
- Linderman J. R. and A. S. Greene. 2001. Distribution of angiotensin II receptor expression in the microcirculation of striated muscle. *Microcirculation.* 8(4): 275-81.
- Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., and Delecote, B. 1998. Effects of onion yellow dwarf and leek yellow stripe viruses on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. *Plant Disease* 82(12): 1381-1385.
- Lunello, P., Ducasse, D.A., Heiguera, M., Nome, S.F., and Conci, V.C. 2002. An Argentinean isolate of Leek yellow stripe virus from leek can be transmitted to garlic. *Journal of Plant Pathology* 84(1): 11-17.
- Mackenzie, D.J., M.A. Mclean, S. Mukerji and M. Green. 1997. Improved RNA extraction from woody plant for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 81 : 222-226.
- Maryani, N; L. Lombard, Y.S. Poerba, S. Subandiyah, P.W. Crous and G.H.J. Kema. 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana Fusarium wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology* 92:155-194.
- Marzachi, C., 2006. Molecular Diagnosis of Phytoplasmas. *Arab J. Pl. Prot.* 24 : 139-142.

- Mavrodieva, V., Levy L. and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology* 94:61-68.
- Morton, A., Davies, DL., Blomquist, CL., and Barbara, DJ., 2003. Characterization of homologues of the apple proliferation immunodominant membrane protein gene from three related phytoplasma. *Mol. Plant Pathol.* 4 : 109-114.
- Nader, M.M.E. 2005. Development and validation of lateral flow device (LFD) field test kit for diagnosis of potato ring rot. M.S. Thesis, Newcastle upon Tyne University.
- Nakashima, K., Chaleeprom, W., Wongkaew, P., and Sirithorn, P., 1994 . Detection of mycoplasma-like organism associated with white leaf disease of sugarcane in Thailand using DNA probes. *JIRCAS.* 1 : 57-67.
- Nickel Osmar, Maria, L.P.N. Targon, Thor V.M. Fajardo, Marcos A. Machado and A. Trivilin. 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of Apple stem grooving virus expressed in *Escherichia coli* : production and use in immunodiagnosis. *Fitopatologia Brasileira* 29 (5) : 558-562.
- Nurhadi, Kamaruzaman Sijam and Inon Saiman. 2003. Production of polyclonal antibody to the coat protein of Citrus tristeza virus in chicken eggs. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 4(1) : 18 -26.
- O'Donnell, K., H.C. Kistler, E. Cigelnik and R.C. Ploetz. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 2044–2049.
- Opina, N.L. and S.A. Miller. 2005. Evaluation of immunoassays for detection of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of tomato and eggplant in the Philippines. *Acta Horticulturae* 695: 353-356.
- Or E., Boyd, D., Gon, S., Beckwith, J., and Rapoport, T., 2005. The Bacterial ATPase SecA Functions as a Monomer in Protein Translocation. *The Journal of Biological Chemistry.* 280(10) : 9097-9105.
- Pastrik K-H and Rainey FA. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology* 147, 687-693..

- Patrick Ollitraul and Luis Navarro in Marisa L.Badenes and David H. Byrne editor. 2012. Handbook of Plant Breeding.Springer press,N.Y.892 p.
- Paul Campbell. 2015. Handout of virus training in Thailand by Mr. Murray Sharman and Mr. Paul Campbell.
- PestID. 2012. Pest Identification Database (PestID). United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Plant Protection and Quarantine. <https://moks14.aphis.usda.gov/aqas/login.jsp>. (Archived at PERAL).
- Peter, D. and R. Goldbach. 1995. The biology of tospoviruses, pp. 199-210. In R. P. Singh and K. Kohmoto (eds.) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases Volume III : Viruses&Viroide. Elsevier Science Ltd., Kidlington, Oxford.
- Piñero, J. C., Jácome, I., Vargas, R., & Prokopy, R. J. (2006). Response of female melon fly, *Bactrocera cucurbitae*, to host-associated visual and olfactory stimuli. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 121, 261-269.
- Puhalla, J.E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. *Canadian Journal of Botany* 63: 179-183.
- 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.
- Reischi, U. and Kochanowski B. 1999. Quantitative PCR. In *Method in Molecular Medicine: Quantitative PCR Protocol*. Edited by Kochanowski B. and Reischi, U. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp 3-30.
- Reischi, U. and Kochanowski B. 1999. Quantitative PCR. In *Method in Molecular Medicine: Quantitative PCR Protocol*. Edited by Kochanowski B. and Reischi, U. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp 3-30.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 74, 5463-5467.
- Uke, A., Hoat, T.X., Quan, M.V., Liem, N.V., Ugaki, M., Natsuaki, K.T., 2018. First Report of *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* Infecting Cassava in Vietnam. *Plant Dis.* 102, 2669.
- Santos C. F., E. B. Oliveira, M. C. O. Salgado and A. S. Greene. 2002. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastase-2, an angiotensin II-forming enzyme. *J Cardiovasc Pharmacol.* 39(5): 628-35.

- Schubert, T., B. Sutton, and A. Jeyaprakash. 2010. Pest Alert: Citrus Black Spot (*Guignardia citricarpa*) discovered in Florida (DACS-P-01723). Plant Pathology Section, Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, FL.
- Seemuller, E., Schneider, B., Murer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.-H., Hoffmann, A., Firrao, G., Avinet, L., and Stackebrandt, E., 1994. Phylogenetic Classification of Plant pathogenic mycoplasmas by sequence analysis of 16S rDNA. IOM letter 3 : 224-225.
- Seemuller, E., Schneider, B., Murer, R., Ahrens, U., Daire, X., Kison, H., Lorenz, K.-H., Hoffmann, A., Firrao, G., Avinet, L., and Stackebrandt, E., 1994. Phylogenetic Classification of Plant pathogenic mycoplasmas by sequence analysis of 16S rDNA. IOM letter. 3 : 224-225.
- Seif, A.A. 1982. Effect of cassava mosaic virus on yield of cassava. Plant disease Reporter 66 (8): 661-662.
- Shen, W.C. and Lin, C.P., 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organisms associated with sweetpotato witches' broom. Phytopathol. 83 : 671-675.
- Shen, W.C. and Lin, C.P., 1993. Production of monoclonal antibodies against a mycoplasma-like organisms associated with sweetpotato witches' broom. Phytopathol. 83 : 671-675.
- Shikata, E., Teng, W.S., and Matsumoto, T., 1969. Mycoplasma or PLT-like micro-organism detected in leaf of sugarcane plant infected with white leaf disease and suppression of the disease symptoms by the antibiotics of tetracycline group, J.Fac.Agr., Hokkaido Univ. 56(2) : 70-90.
- Shikata, E., W.S. Teng and T. Matsumoto, 1969. Mycoplasma or PLT-like micro-organism detected in leaf of sugarcane plant infected with white leaf disease and suppression of the disease symptoms by the antibiotics of tetracycline group, J.Fac. Agri., Hokkaido Univ. 56(2) : 70-90.
- Singer, J.M. and C.M. Plotz. 1956. The latex fixation test application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. American Journal of Medicine 21: 888-892.
- Snyder, W.C. and H.N. Hansen. 1940. The species concept in *Fusarium*. *American Journal of Botany* 27:64-67.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313.

- Sutton, B.C and J.M Waterson. 1966. *Guignardia citricarpa*. No. 85 In: CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. Commonwealth Mycological Institute. Ferry Lane, Kew, Surrey, UK.
- Tamura, K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. and Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.* 30(12): 2725-2729.
- Tosic, M. and R.E. Ford. 1972. Grass differentiating *sugarcane mosaic virus* and *maize dwarf mosaic virus*. *Phytopathology* 62: 1466-1470.
- Virgilio, M., Jordaens, K., Verwimp, C., White, I. M., & De Meyer, M. 2015. Higher phylogeny of frugivorous flies (Diptera, Tephritidae, Dacini): Localised partition conflicts and a novel generic classification. *Molecular phylogenetics and evolution* 85: 171-179.
- Viswanathan, R., Karuppaiah, R. and Balamuralikrishnan, M. 2010. Detection of three major RNA viruses infecting sugarcane by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (multiplex-RT-PCR). *Australas. Plant Path.* 39(1): 79-84.
- Wang, D., Yao, X.M., Huang, G.X., Shi, T., Wang, G.F., Ye, J., 2019. First Report of *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus* Infected Cassava in China. *Plant Dis.* 103, 1437.
- Wang, D., Zhang, X., Yao, X., Zhang, P., Fang, R., Ye, J., 2020. A 7-Amino-Acid Motif of Rep Protein Essential for Virulence Is Critical for Triggering Host Defense Against *Sri Lankan Cassava Mosaic Virus*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 33, 78-86.
- Wang, H.L., Cui, X.Y., Wang, X.W., Liu, S.S., Zhang, Z.H., Zhou, X.P., 2016. First Report of *Sri Lankan cassava mosaic virus* Infecting Cassava in Cambodia. *Plant Dis.* 100, 1029.
- Wang, X., G. Chen, F. Huang, J. Zhang, K. D. Hyde, and H. Li. 2012. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. *Fungal Diversity* 52:209-224.
- Warman, N.M. and E.A.B. Aitken. 2018. The Movement of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (Sub-Tropical Race 4) in Susceptible Cultivars of Banana. *Frontiers in Plant Science* 9: 1-9.
- White, I. M., & Hancock, D. L. (1997). CABIKEY to the Dacini (Diptera, Tephritidae) of the Asia Pacific Australasian regions. Wallingford, UK: CAB International.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" (M. Innis, D. Gelfand, J. Shinsky and T. White, eds.), pp. 315-322. Academic Press.

- Wikee, S., D. Udayanga, P. W. Crous, E. Chukeatirote, E. H. C. McKenzie, A. H. Bahkali, D.-Q. Dai, and K. D. Hyde. 2011. Phyllosticta—an overview of current status of species recognition. *Fungal Diversity* 51:43-61.
- Wu, Y., Li, Z. H., & Wu, J. J. (2009). Polymorphic microsatellite markers in the Melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) (Diptera: Tephritidae). *Molecular Ecology Resources*, 9, 1404-1406.
- Wulandari, N. F., C. To-anun, K. D. Hyde, L. M. Duong, J. de Gruyter, J. P. Meffert, J. Z. Groenewald, and P. W. Crous. 2009. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of Citrus maximain Asia. *Fungal Diversity* 34:23-39.
- Xia, X.C., Melchinger, A.E., Kuntetz, L and Lubberstedt, T., 1999. Qualtitative trait loci mapping of resistance to *Sugarcane mosaic virus* in maize. *Phytopathology* 89(8): 660-667.
- Yallow, R.S. and S.A. Berson. 1959. Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* 184: 1648-1649.
- YE Lu-fei, SU Han, ZHOU Guo-liang, YIN Li-ping, LI Xiao-jun, YANG Sai-jun, YI Jian-ping, 2014. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in imported corn by PCR. *ACTA Phytopathological sinica* 44(2) 121-128.

กรมวิชาการเกษตร