พัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์กับส่วนขยายพันธุ์ของส้ม
Development of Viroid Detection on Citrus propagation

ผู้ดำเนินการ **นายปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์**[1] **นางสาวกาญจนา วาระวิชะนี**[1]
นางสาววันเพ็ญ ศรีชาติ[2] **นายวานิช คำพานิช**[2] **ปรียพรรณ พงศาพิชณ์**[2]

กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[1]
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช[2]

บทคัดย่อ

เชื้อไวรอยด์ที่เข้าทำลายพืชกลุ่มส้มที่มีรายงานมีอยู่ด้วยกันหลายชนิดเช่น *Citrus exocortis viroid* (CEVd) *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) *Citrus viroid* II (CVd-II) *Citrus viroid*-I-LSS (CVd-I-LSS) *Citrus viroid* III (CVd-III) *Citrus viroid* OS (CVd-OS) *Japanease citrus viroid* (JCVd) *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) และ *Hop stunt viroid* (HSVd) ซึ่งไวรอยด์หลายชนิดถูกประกาศให้เป็นเป็นศัตรูพืชกักกัน (Quarantine pest) ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. ๒๕๐๗ (ฉบับที่ ๖) พ.ศ. ๒๕๕๐ ต้องมีการตรวจวินิจฉัยส่วนขยายพันธุ์พืชที่นำเข้า แต่เนื่องจากไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุดประกอบด้วยอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นวงปิด และไม่มีโปรตีนห่อหุ้มเหมือนไวรัส ซึ่งไม่สามารถด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาได้ การนำใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) เข้าช่วยในการตรวจจึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม สำหรับการป้องกันการแพร่ระบาดและทำความเสียหายของโรค

รหัสการทดลอง 07-01-49-07-04-01-01-51

คำนำ

ส้ม (Orange, *Citrus sinesis*) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูง มีการปลูกกันแพร่หลายทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยด้วย โดยจังหวัดที่มีการปลูกมากได้แก่ เชียงใหม่ เชียงราย แพร่ น่าน สุโขทัย กำแพงเพชร สระบุรี ปทุมธานี พิจิตร ลพบุรี สมุทรสงคราม ชุมพร และนครศรีธรรมราช เป็นต้น พืชสกุลส้มมีอยู่ 130 สกุล ประมาณ 1,500 ชนิด สามารถปลูกได้ในสภาพภูมิอากาศเขตกึ่งร้อน ตั้งแต่ซีกโลกเหนือ เขตเมดิเตอร์เรเนียน จนถึงซีกโลกใต้ แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มใหญ่ คือ ส้ม ส้มเขียวหวาน เลมอนและมะนาว เกรปฟรุตและส้มโอ และส้มอื่น ๆ

ส้มเป็นผลไม้ที่มีรสชาติดีและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงเป็นที่นิยมบริโภคแพร่หลายทั่วโลกทั้งการบริโภคผลสด หรือนำมาผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น น้ำผลไม้ แยม ผลไม้เชื่อม สกัดน้ำมันเป็นน้ำมันหอมระเหย ใช้ในอุตสาหกรรมยา และเครื่องสำอาง ในปี พ.ศ. 2548 มีการนำเข้าผลส้มเข้ามาในปริมาณถึง 4,072 ตัน คิดเป็นมูลค่า 103.6 ล้านบาท และมีการส่งออกผลส้มในปริมาณ 12,939 ตัน คิดเป็นมูลค่า 248.8 ล้านบาท เนื่องจากส้มเป็นพืชที่มีโรคและแมลงศัตรูมากมายหลายชนิดด้วยกัน ประกอบกับประเทศไทยมีภูมิอากาศที่ร้อนชื้น ส่งเสริมให้โรคและแมลงศัตรูพืชสามารถเกิดและเข้าทำลายส้มได้ดี เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย ไวรัส และไวรอยด์ จากรายงานมีเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชสกุลส้มมีประมาณ 9 ชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd) *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) *Citrus viroid* II (CVd-II) *Citrus viroid*-I-LSS (CVd-I-LSS) *Citrus viroid* III (CVd-III) *Citrus viroid* OS (CVd-OS) *Japanease citrus viroid* (JCVd) *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) และ *Hop stunt viroid* (HSVd)

โดยลักษณะอาการของโรคที่สำคัญในพืชสกุลส้ม เช่น เชื้อ CEVd จะก่อให้เกิดอาการเปลือกแตกที่ต้นตอ ต้นพืชมีอาการแคระแกน และทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง ในมะนาวจะมีอาการแผลเป็นจุดที่ใบ และใน citron จะมีอาการใบย่นและม้วนลงอย่างรุนแรง ใบแตกและเซลล์ตายเป็นแผลสีน้ำตาลที่ใต้เส้นใบและใบยอด โดยมีอาการแคระแกรนร่วม เชื้อชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคจากการใช้กิ่งพันธุ์ที่เป็นโรค การปนเปื้อนเชื้อจากอุปกรณ์ทางเกษตรต่าง ๆ เข้าสู่บาดแผลของพืช dodder โดยสามารถทำความเสียหายให้กับการผลิตส้มได้สูงถึง 5,147 ดอนล่า ต่อ เฮคแตร์ ซึ่งหากเชื้อไวรอยด์เหล่านี้ติดเข้ามากับส่วนขยายพันธุ์ของพืชสกุลส้มอาจก่อให้เกิดความเสียหายกับการผลิตส้มและพืชชนิดอื่นในประเทศไทยได้ ดังนั้นการป้องกันและควบคุมไม่ให้โรคศัตรูพืชติดเข้ามากับส่วนขยายพันธุ์ส้มที่นำเข้าจากต่างประเทศจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการปกป้องภาคการเกษตรของประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
2. ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส

3. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
6. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
7. Gel electrophoresis
8. Gel Documentation UV-transilluminator
9. พืชทดสอบชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Citron มะเขือเทศพันธุ์ Rutgers และ Gynura
10. เอ็นไซม์ reverse transcriptase
11. เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase
12. 100 bp DNA Ladder
13. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ Rneasy Plant Mini Kit (Qiagen)
14. ชุด kit สกัด agarose gel: QIAquick Gel Extraction Kit c
15. pGEM-T easy vector (Promega)

วิธีการ

1. สำรวจโรคในสวนส้มและเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไวรอยด์

สำรวจโรคในส้มในพื้นที่จังหวัดนครปฐม ราชบุรี และชัยนาท เก็บตัวอย่างส้มที่แสดงอาการโรคที่คาดว่าเกิดจากเชื้อไวรอยด์ คือมีลักษณะอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบเหลืองซีด โค้งลง และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบ จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวปลูกถ่ายเชื้อบนพืชทดสอบ Citron (*Citrus medica*) และ Gynura ด้วยวิธีกล โดยการใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 9.0 บดตัวอย่างพืช จากนั้นโรยผง carborundum ลงบนใบพืชทดสอบ และทาใบพืชทดสอบด้วยน้ำคั้นจากพืชตัวอย่าง เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อให้เกิดโรค สังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืชทดสอบ คือ จะเกิดอาการต้นเตี้ยแคระแกร็น ใบเหลืองซีด ยอดโค้งงอลง และมีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบใน Citron ส่วนใน Gynura จะมีอาการใบย่น โดยอาการของโรคจะแสดงในระยะเวลาตั้งแต่ 1 - 2 เดือน หลังจากปลูกถ่ายเชื้อ

2. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในส้มเพื่อออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในส้มจากฐานข้อมูล NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) และนำข้อมูลลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในส้ม ทุก ๆ สายพันธุ์ที่มีรายงานมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อกลุ่มเชื้อไวรอยด์ดังกล่าว

3. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบส้ม

เปรียบเทียบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบส้ม โดยเปรียบเทียบจากคุณภาพของอาร์เอ็นเอของ Citron ที่สกัดได้ด้วยวิธีการ 4 วิธี ได้แก่ วิธี MacKenzie buffer

(MacKenzie, D.J. *et. al*., 1997), วิธี RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), วิธี CTAB buffer (Jeffries and Tina, n.d.) และ วิธี MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ จากนั้นนำอาร์เอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพด้วยการตรวจสอบ *ndhB gene* (NADH dehydrogenase ND2 subunit) ซึ่งเป็น housekeeping gene ในคลอโรพลาสต์ โดยเทคนิค RT-PCR ซึ่งวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธีมีขั้นตอนดังนี้

3.1 วิธี MacKenzie buffer: บดใบ Citron 200 มิลลิกรัม ด้วย MacKenzie buffer (4M Guanindine thiocyanate, 0.2 M Sodium acetate, 25 mM EDTA pH 8.0 และ 2.5% PVP-40) ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร จนละเอียด เติม ß-mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติมสารละลาย Sarkosyl ความเข้มข้น 20% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นดูดของเหลวปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงบน QIAshredder™ column (QIAGEN) ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดสารละลายที่ผ่าน QIAshredder™ column ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม ethanol (96-100%) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและดูดสารละลายผสมดังกล่าวลงบน RNeasy® mini spin column (QIAGEN) ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube เดิมเข้ากับ column เติม QIAGEN buffer RW1 ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน column ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube ใหม่เข้ากับ column จากนั้นเติม QIAGEN buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน column ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube เดิมเข้ากับ column เติม QIAGEN buffer RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงใน column ปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 วินาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ผ่าน RNeasy® mini spin column และประกอบ collection tube เดิมเข้ากับ column และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ประกอบ RNeasy® mini spin column เข้ากับหลอด micro centrifuge ใหม่ เติม RNase-free sterile water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยหยดลงบน filter โดยตรง บ่มนาน 2 นาที จากนั้นปิดฝาและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อเก็บสารละลายอาร์เอ็นเอ

3.2 วิธี RNeasy Plant Mini Kit: บดใบ Citron 100 มิลลิกรัม ด้วย RLT buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่มี ß-mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จนกระทั่งตัวอย่าง

ละเอียด นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดของเหลวใสส่วนบน 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) ผสมเบา ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดของเหลวใสส่วนบน 300 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ absolute alcohol ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส 15 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิกและล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิกและล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ไม่มี nuclease ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

3.3 วิธี CTAB (Scottish Agricultural Science Agency): บดใบ Citron 100 มิลลิกรัม ด้วยสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 และ 2.0% PVP-40; Na_2SO_3 และ PVP-40 เติมก่อนใช้งาน) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน เติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ isopropanol แช่เย็น ปริมาตรเท่ากับของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที และตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3.4 วิธี MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ร่วมกับการใช้ chloroform: isoamyl alcohol: บดใบ Citron 200 มิลลิกรัม ด้วย MacKenzie buffer (4M Guanindine thiocyanate, 0.2 M Sodium acetate, 25 mM EDTA pH 8.0 และ2.5% PVP-40) ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร จนละเอียด เติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ดูดสารละลายใส่

หลอด micro centrifuge ใหม่ เติมสารละลาย Sarkosyl ความเข้มข้น 20% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดของเหลวใสส่วนบน เติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 0.5 เท่าของปริมาตรสารละลาย และ isopropanol แช่เย็นปริมาตรเท่ากับของปริมาตรสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วย TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol แช่เย็นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 4 นาที และตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

4. ตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดด้วยเทคนิค RT-PCR

4.1 นำตัวอย่างพืชกลุ่มส้ม และพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้

4.2 ตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) และหาสภาวะที่เหมาะสมของปฏิกิริยา โดยใช้ไพรเมอร์ทั้ง 16 เส้น ผลผลิตจากปฏิกิริยาที่ได้จะมีขนาดอยู่ในช่วงตั้งแต่ 300 ถึง 400 base pair โดยไพรเมอร์มีลำดับเบสดังต่อไปนี้

CEVd

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

CBLVd

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

CVdI

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

CVdII

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

CVdIII

c- GTC-GAC-GAC-GAC-AGG-TAA-GTT-CCC	(24 bps)	Tm = 64.4
h- GAA-GGC-AGC-TAA-GTT-GGT-GAC-GCC	(24 bps)	Tm = 66.7

CVdIV

c- TTC-CCC-GGG-GAT-CCC-TCT-TCA-GG	(23 bps)	Tm = 65.8
h- ATC-TCT-TCA-GAC-TCG-TCG-AGG-GG	(23 bps)	Tm = 65.3

CVdOS

c- TTA-CCC-TGG-GGA-CTC-CAC-CGC-CG	(23 bps)	Tm = 67.5
h- AAC-ACG-ATT-GGT-GTT-TCC-CCG-GAG-G	(25 bps)	Tm = 65.2

HSVd

c- TCG-GAA-GAG-CCA-GAA-GG	(17 bps)	Tm = 54.7
h- TGA-GAC-GCG-ACC-GGT-GGC-ATC-ACC-T	(25 bps)	Tm = 67.5

4.3 ขั้นตอนการทำ RT-PCR

4.3.1 ขั้นตอน Reverse Transcription (RT) เพื่อสร้างสาย cDNA จากเชื้อไวรอยด์ ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

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

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 1 รอบ จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งทันทีตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที 1 รอบ จากนั้นเติมสารดังนี้

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

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 1 รอบ ซึ่งจะได้ cDNA (Complement DNA) และนำมาเพิ่มปริมาณต่อได้โดยเทคนิค PCR ในขั้นตอนต่อไป

4.3.2 ขั้นตอน Polymerase Chain Reaction (PCR) เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ให้มากพอที่จะตรวจสอบได้ ปฏิกิริยาประกอบไปด้วย

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

นำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

สำหรับเชื้อ CEVd

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

สำหรับเชื้อ CBLVd, CVdII, CVdIV และ CVdOS

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

สำหรับเชื้อ CVdI

ขั้นที่ 1:	94°C	นาน 3 นาที	1 รอบ
ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 45 วินาที	
ขั้นที่ 3:	60°C	นาน 45 วินาที	

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

สำหรับเชื้อ CVdIII

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

สำหรับเชื้อ HSVd

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

4.4 ตรวจสอบขนาดของผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ ด้วยวิธีการอีเล็คโตรโฟริซิสโดยการใช้ 2% agarose gel ละลายในสารละลาย 0.5X TBE buffer แล้วนำมาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

4.5 ทำการโคลนผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ที่ได้ เพื่อเพิ่มปริมาณ cDNA ของไวรอยด์ ด้วย pGEM-T easy vector (Promega) และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

4.5.1 เตรียม cDNA ให้บริสุทธิ์ โดยการนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ โดยนำผลผลิตของปฏิกิริยา RT-PCR มาแยกดีเอ็นเอตามขนาดโดยใช้วิธีการอีเล็คโตรโฟริซิส ด้วย 2% agarose gel ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์ คือมีขนาดประมาณ 370 คู่เบส ใส่หลอด centrifuge tube ชั่งน้ำหนักของเจล โดยจะต้องไม่เกิน 400 มิลลิกรัม

4.5.2 สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) โดยเติมสารละลาย QG buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกระทั่งเจลละลายอย่างสมบูรณ์ เติม isopropanol ปริมาตร 1 เท่าของน้ำหนักเจล ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจัดชุด column โดยนำ QIAquick spin column วางบน collection tube ดูดสารละลายผสมใส่ใน ชุด column โดยดูดสารละลายไม่เกิน 800 ไมโครลิตร นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งน้ำใสในหลอด collection tube ล้าง QIAquick spin column ด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้าง QIAquick spin column อีกครั้งด้วยสารละลาย PE buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย EB buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ตรวจสอบขนาดและปริมาณ cDNA ที่ได้ด้วย 2% agarose gel electrophoresis หากได้แถบดีเอ็นเอมากกว่า 1 แถบ จะต้องทำการตัดแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและทำการสกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) ซ้ำอีกครั้งจนได้แถบดีเอ็นเอแถบเดียว

4.5.3 เชื่อมต่อ cDNA ของเชื้อไวรอยด์เข้ากับพลาสมิดพาหะ โดยเชื่อมต่อ cDNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วกับพลาสมิด pGEM-T Easy (Promega) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase ซึ่งมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

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

บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

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

แทน เพื่อละลายตะกอนของเชื้อแบคทีเรีย ทำการ spread ผิวหน้าอาหารแข็ง LB agar ที่มีแอมพิซิลินความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยสารละลาย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-6-D-galactoside (X-gal) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร กับสารละลาย isopropyl-6-D thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ทิ้งให้ผิวหน้าของอาหารแห้ง จากนั้นนำสารละลายของเชื้อแบคทีเรีย spread บนอาหารแข็ง LB agar ดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน เพื่อคัดเลือก colony ของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วน cDNA ของเชื้อไวรอยด์

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

4.5.6 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะ โดยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI ไปตัดโคลนของพลาสมิดลูกผสม เพื่อแยก cDNA ของไวรอยด์ออกจากพลาสมิดลูกผสม มีส่วนประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

ดีเอ็นเอ	5.0 ไมโครลิตร
10X EcoRI buffer	1.0 ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ EcoRI	0.3 ไมโครลิตร
เอ็นไซม์ RNase A	0.5 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ	3.2 ไมโครลิตร
รวม	10.0 ไมโครลิตร

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 6 - 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วย 2% agarose gel electrophoresis นำโคลนของพลาสมิดลูกผสมที่ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 300 - 400 คู่เบสไปวิเคราะห์หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

4.5.7 วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ หลังจากการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เชื่อมต่อในพลาสมิดพาหะและได้โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามที่ต้องการแล้ว นำโคลนดังกล่าวส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยเครื่อง Automated DNA sequencer แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรอยด์ที่มีการรายงานอยู่แล้วในฐานข้อมูลของ GenBank โดยอาศัยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุดในการจำแนกชนิดของไวรอยด์

เวลาและสถานที่

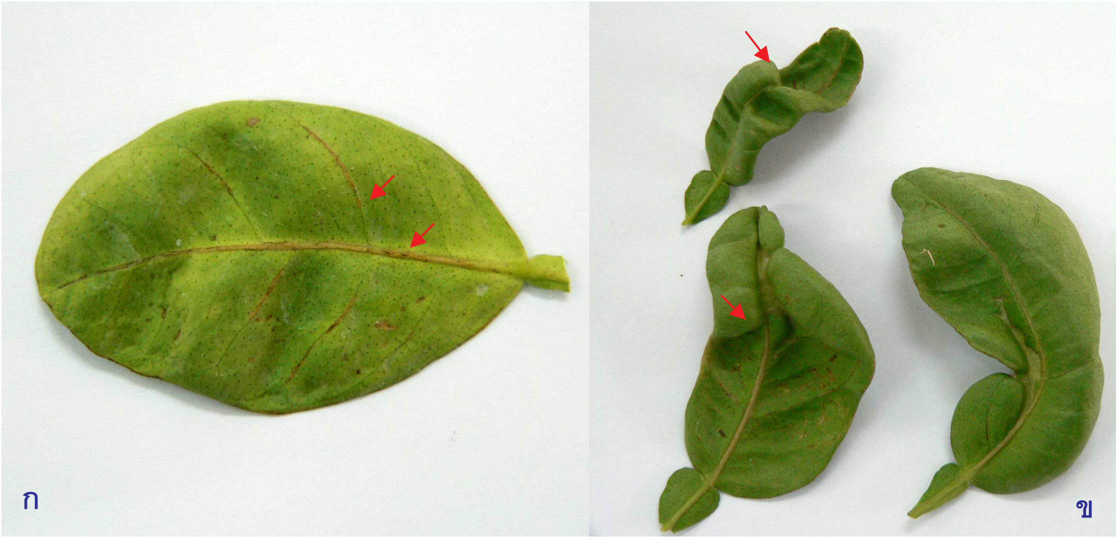
ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 ถึงกันยายน 2553 รวม 3 ปี

สถานที่วิจัย :
1. กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
2. สวนส้มของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดราชบุรี นครปฐม ชัยนาท

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. สำรวจโรคในสวนส้มและปลูกถ่ายเชื้อบนพืชทดสอบ Citron และ Gynura

จากการสำรวจโรคและเก็บตัวอย่างอาการในสวนส้มและมะนาวในพื้นที่จังหวัด ราชบุรี นครปฐม ชัยนาท ได้ตัวอย่างใบมะนาวที่แสดงอาการโรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์รวม 2 ตัวอย่าง โดยมีลักษณะอาการใบเหลืองซีด หดลดรูป มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบและก้านใบ และอาการใบบิดม้วน (**ภาพที่ 1**) ผลการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบไม่พบอาการผิดปกติบน Citron



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการบนตัวอย่างมะนาวที่เป็นโรค

ก: อาการใบเหลืองซีด มีอาการเซลล์ตายที่บริเวณเส้นใบและก้านใบ

ข: อาการใบหดลดรูป และใบบิดม้วนก้านใบ

2. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในมะเขือเทศและออกแบบไพรเมอร์

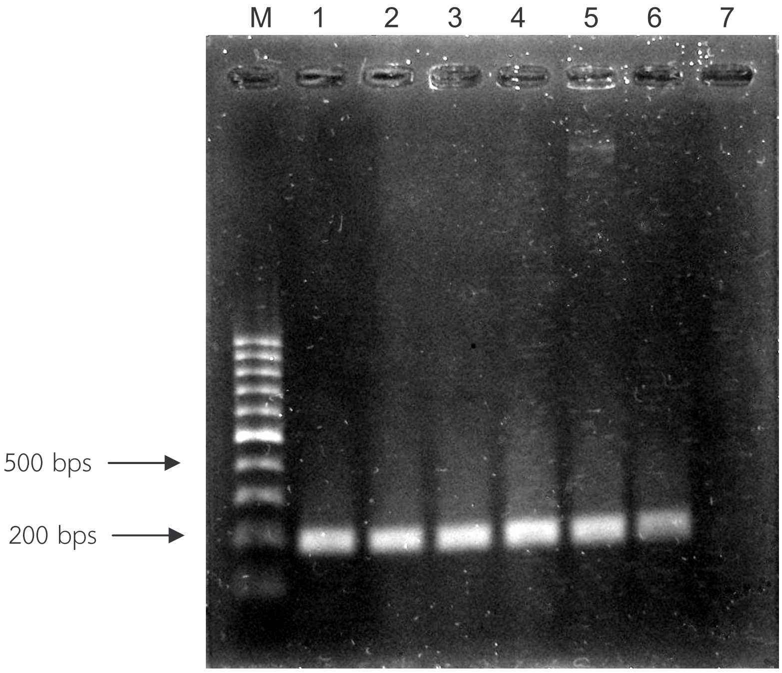
จากการสืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชกลุ่มส้มจากฐานข้อมูล NCBI (http://www. ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่ามีเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชกลุ่มส้ม 8 ชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Citrus viroid* II (CVd-II) *Citrus viroid*-I-LSS (CVd-I-LSS), *Citrus viroid* III (CVd-III), *Citrus viroid* OS (CVd-OS) *Citrus viroid*-IV (CVd-IV) และ *Hop stunt viroid* (HSVd) (Hadidi *et al*., 2003)

นำข้อมูลลำดับพันธุกรรมของเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืชกลุ่มส้ม ทุก ๆ สายพันธุ์ที่มีรายงานจากฐานข้อมูลดังกล่าวมาใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ ซึ่งได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อกลุ่มเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวจำนวนทั้งสิ้น 16 เส้น

3. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบส้ม

ผลการตรวจเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธีการ ได้แก่ MacKenzie buffer, RNeasy Plant Mini Kit, CTAB buffer และ MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ พบว่าทั้ง 4 วิธีการสามารถสกัดอาร์เอ็นเอจากใบ Citron ได้ทั้งหมด เมื่อนำมาตรวจสอบหา *ndhB gene* (NADH dehydrogenase ND2 subunit) ด้วยเทคนิค RT-PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 188 bp (**ภาพที่ 2**) แสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีคุณภาพที่ดีทั้ง 4 วิธีการ ยกเว้นวิธีการ MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์ พบว่าตะกอนอาร์เอ็นเอที่ได้จะปริมาณแป้งค่อนข้างมากซึ่งอาจ

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



ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธี โดยการตรวจสอบ *ndhB gene*

M = 100 bps DNA Ladder

1 = MacKenzie buffer,

2 และ 3 = CTAB buffer

4 = RNeasy Plant Mini Kit

5 และ 6 = MacKenzie buffer ที่นำมาประยุกต์

7 = buffer

4. ตรวจวินิจฉัยจำแนกชนิดด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการตรวจตัวอย่าง ส้ม ส้มโอ และมะนาว จำนวน 30 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Reverse RT-PCR ทดสอบหาเชื้อ *Citrus exocortis viroid*, *Citrus bent leaf viroid* และ *Hop stunt viroid* ผลปรากฏว่าไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างอาการที่นำมาตรวจสอบทั้งหมดมาจากแหล่งพื้นที่ปลูกเพียง 4 แหล่ง ซึ่งอาจไม่ได้เป็นสวนที่มีการแพร่ระบาดของโรค

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองในขั้นแรกพบว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อส้มมี 3 วิธี ได้แก่ MacKenzie buffer, RNeasy Plant Mini Kit และ CTAB buffer โดยทั้ง 3 วิธีให้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพสูง แต่วิธี MacKenzie buffer และ RNeasy Plant Mini Kit มี unit cost ที่สูงกว่าวิธี CTAB buffer มาก

ผลการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR ไม่พบเชื้อไวรอยด์ อาจเนื่องจากแหล่งพื้นที่ที่เข้าสำรวจไม่ได้มีการแพร่ระบาดของโรค รวมถึงจำนวนแปลงเกษตรกรที่เข้าไปสำรวจมีปริมาณที่น้อย ซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากการทดลองนี้ไม่ได้รับเงินวิจัยสนับสนุนในปีที่ 3 (ปีงบประมาณ 2553) ทำให้ไม่สามารถดำเนินการสำรวจโรคเพื่อเก็บตัวอย่างและจัดซื้อสารเคมีที่จำเป็นสำหรับทำการตรวจสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลได้

ปัญหาและอุปสรรค

เนื่องจากงานวิจัยเรื่องนี้ได้รับเงินการจัดสรรงบวิจัยล่าช้า คือได้รับช่วงไตรมาสที่สาม ต้นเดือนเมษายน อีกทั้งยังได้รับการสนับสนุนเงินวิจัยเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ของที่เสนอขอไว้ ส่งผลทำให้การดำเนินการทดลองไม่เป็นไปตามแผนการทดลองที่ได้วางแผนไว้ ซึ่งเป็นอุปสรรคใหญ่ที่ทำให้งานทดลองนี้ไม่สามารถดำเนินการทดลองเสร็จสิ้นตามเป้าหมายได้

คำขอบคุณ

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

เอกสารอ้างอิง

สมบูรณ์ พรหมมา. 2545. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในมะนาว. **วิทยานิพนธ์ปริญญาโท**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Asai M., T. Ohara, T. Takahashi, S. Saito and K. Tanaka. 1998. Detection of viroids in fruit trees by return gel electrophoresis. **Research Bulletin of the Plant Protection Service**. Japan. 34: 99-102.

Fagoaga, C. and N. Duran-Vila. 1996. Naturally occurring variants of *Citrus exocortis viroid* in vegetable crops. **Plant Pathology**. 45(1): 45-53.

Hataya, T. 1997. Characteristics and detection methods of viroids detected from citrus in Japan. **Shokubutsu Buick**. 51, 163-167.

Hataya, T., K. Nakahara, T. Ohara, H. Leki and T. Kano. 1998. Citrus viroid I is a derivative of *Citrus bent leaf viroid* (CVd-Ib) by partial sequence duplications in the right terminal region. **Arch. Virol**. 143, 971-80.

Hoshino, T., T. Hayata and T. Ohara. 2000. Cachexia pathogenicity of *Hop stunt viroid* isolates. Ann. Phytopathol. **Soc. Jpn**. 66, 143. (Abstract in Japanese)

Ito, T., and H. Ieki. 1996. Detection of Citrus exocortis viroid and Citrus viroid I, II, III, IV by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Ann. Phytopathol. **Soc. Jpn**. 62, 614-615. (Abstract in Japanese)

Ito, T. 1999. Pathogenicity and diagnosis of citrus viroid, and their distribution in Japan. **Shokubutsu Buick**. 53, 347-350.

Ito, T. 2000. Viroid disease of fruit trees in Japan. **PSJ Plant Virus Dis**. Rept. 5, 28-39.

Ito, T., H. Ieki and K. Ozaki. 2000 a. A population of variants of a viroid closely related to Citrus viroid-I in citrus plants. **Arch. Virol**. 145, 2105-2114.

Ito, T., T. Ito and M. Isaka. 2000 b. Viroid with reported nucleotide sequence of *Citrus cachexia viroid* or its characteristic nucleotide changes, detected from introduced citrus trees in Japan. Ann. Phytopathol. **Soc. Jpn**. 66, 143. (Abstract in Japanese)

Levy L., A. Hadidi and S.M. Garnsey. 1992. Reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the rapid detection of citrus viroids using multiple primer sets. **Proceedings International Society Citriculture**. Vol. 2, 800-803.

Nakahara, K., T. Hataya, I. Uyeda and H. Ieki. 1998. An improved procedure for extracting nucleic acids from citrus tissues for diagnosis of citrus viroids. Ann. Phytopathol. **Soc. Jpn**. 64, 532-538.

Sano, T., T. Hayata, A. Sasaki and E. Shikata. 1986. Etrog citron is latently infected with Hop stunt viroid-like RNA. **Proc. Japan Acad**. 62, 325-328.

Semancik J.S., L.K. Grill and E.L. Civerolo. 1978. Accumulation of viroid RNA in tumor cells after double infection by *Agrobacterium tumefaciens* and *Citrus exocortis viroid*. **Phytopathology**. 68(12): 1728-1732.

Tanaka, H. and S. Yamada. 1971. Occurrence of citrus exocortis in Japan – Survey from 1963 to 1971. **Bull. Hortic. Res. Sta**. 11, 149-154.

Weathers L.G. 1965. Transmission of exocortis virus of citrus by *Cuscuta sublinclusa*. **Plant Disease Reporter**. 49: 189-190.