วิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบเชื้อพอสพิไวรอยด์ในพืชวงศ์ Solanaceae และเมล็ดพันธุ์
Diagnostic methods for the detection of *pospiviroids* in Solanaceous plants and seeds

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ [1/] Kai-Shu Ling [2/]
Sukhontip Sombat [1/]

ABSTRACT

In many countries phytosanitary regulations were applied to *pospiviroid*, *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) because it can cause economically important diseases on Solanaceous plants and seeds. Consequently, there is a need for a reliable and cost-effective generic testing method. PSTVd infected tomato seeds from North Carolina, USA were used for evaluation the PSTVd detection method in U.S. vegetable laboratory, South Carolina. Total seed RNA was prepared using Trizol reagent and SDS- potassium acetate methods. PSTVd can be detected by RT-PCR and Real time RT-PCR from single infected seed. Real time RT-PCR was highly sensitive and effective. It can be detected from mixture of a single infected seed and healthy seeds in various ratios of tomato and Solanaceous seeds with two extraction methods. An initial investigation of PSTVd in tomato breeder stock seed srevealed the presence of the viroid at greenhouse in the North Carolina area. PSTVd infection in solanaceous plants that were inoculated with sap from tomato infected seeds displayed severe symptoms in tomato plants, very mild symptoms in pepper plants and symptomless in petunias plants at eight weeks after inoculation.

Key words: detection, *Pospiviroid*s, Solanaceae, *Potato spindle tuber viroid*

[1/] สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ 10900

[1/] Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok, Thailand

[2/] U.S. Department of Agriculture-Agricultural Research Service, U.S. Vegetable Laboratory, SC, USA.

บทคัดย่อ

ปัจจุบันหลายประเทศใช้กฎระเบียบด้านสุขอนามัยพืชสำหรับเชื้อพอสพิไวรอยด์โดยเฉพาะ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) สาเหตุโรคที่สำคัญทางเศรษฐกิจในพืชวงศ์ Solanaceae และเมล็ดพันธุ์ จำเป็นต้องหาวิธีตรวจสอบที่เชื่อถือได้ และเหมาะสมต่อค่าใช้จ่าย ได้นำเมล็ดมะเขือเทศที่ติดเชื้อไวรอยด์ PSTVd มาจากมลรัฐนอร์ทแคโรไลนา มาใช้ศึกษาวิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบเชื้อ PSTVd ในเมล็ดพืชวงศ์ Solanaceae ณ ห้องปฏิบัติการพืชผักของมลรัฐเซาท์แคโรไลนา สหรัฐอเมริกา จากการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Trizol reagent และ SDS-potassium acetate พบว่าหนึ่งเมล็ดมะเขือเทศที่ติดเชื้อ PSTVd สามารถตรวจสอบด้วยสองวิธีวินิจฉัย Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) และ Real time RT-PCR โดยเฉพาะวิธีวินิจฉัย Real time RT-PCR มีความไวและแม่นยำสูง สามารถตรวจสอบเชื้อ PSTVd จากเมล็ดติดเชื้อหนึ่งเมล็ดที่ผสมอยู่ในเมล็ดปกติที่ระดับต่างๆ ของพืชวงศ์ Solanaceae ได้ทั้งสองวิธีการสกัด นอกจากนี้การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวินิจฉัย Real time RT-PCR ในเบื้องต้น สามารถค้นพบเชื้อ PSTVd ติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้เพื่อปรับปรุงพันธุ์ในโรงเรือนมลรัฐนอร์ทแคโรไลนา ผลการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากเมล็ดมะเขือเทศที่ติดเชื้อ PSTVd บนพืชวงศ์ Solanaceae ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าต้นพืชติดเชื้อโดยแสดงอาการรุนแรงในมะเขือเทศ แสดงอาการเล็กน้อยในพริกหวาน แต่ไม่แสดงอาการในพิทูเนีย

คำหลัก: การตรวจสอบ เชื้อพอสพิไวรอยด์ พืชวงศ์ Solanaceae เชื้อไวรอยด์ *Potato spindle tuber viroid*

คำนำ

ประเทศไทยมีการนำเข้าพืชในวงศ์ Solanaceae ปริมาณมาก เช่น มันฝรั่ง พริก และมะเขือเทศ เป็นต้น โดยเฉพาะหัวพันธุ์และเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้การเพาะปลูก หรือปรับปรุงพันธุ์ และผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสมเพื่อส่งออกไปขายยังต่างประเทศทั่วโลก สร้างรายได้ให้เกษตรกรจำนวนมาก แต่ปัญหาที่พบเกิดจากศัตรูพืชร้ายแรงจากต่างประเทศมีโอกาสติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์นำเข้า รวมถึงเมล็ดเพื่อการส่งออกเนื่องจากการปนเปื้อน และถ่ายทอดโรคผ่านเมล็ดสูง และยากต่อการตรวจสอบ ต้องใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล โดยเฉพาะเชื้อพอสพิไวรอยด์ เช่น *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ซึ่งเป็นศัตรูพืชกักกันร้ายแรงที่ไม่มีรายงานในประเทศไทย จากผลการประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชพบว่าสามารถติดมากับเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์ Solanaceae นำเข้าจากต่างประเทศ และมีความเสี่ยงอยู่ในระดับสูง เนื่องจากมีการนำเข้ามาจากแหล่งที่มีการรายงานพบไวรอยด์ดังกล่าว (EFSA Panel on Plant Health, 2011; MPI, 2012; สุคนธ์ทิพย์และคณะ, 2554) ทำให้ปัจจุบันในหลายประเทศ ได้แก่ เครือรัฐออสเตรเลีย

นิวซีแลนด์ ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐเกาหลี ได้มีข้อกำหนดสำหรับการนำเข้าอย่างเข้มงวด เพื่อป้องกันการเข้ามาของไวรอยด์ดังกล่าว (MPI, 2012; DAFF, 2013; MAFF, 2013) ซึ่งมาตรการจัดการความเสี่ยง ได้แก่ เมล็ดต้องมาจากพื้นที่หรือแหล่งผลิตที่ปลอดจากเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธีการจัดการอย่างเป็นระบบ (system approach) หรือต้องตรวจสอบเมล็ดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ทำให้เสียทั้งเวลาและค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ส่งผลกระทบการค้าเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ

สำหรับมาตรการทางกักกันพืชของประเทศไทยได้จัดให้พืชในวงศ์ Solanaceae นี้เป็นพืชสิ่งต้องห้ามตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องกำหนดพืชและพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) พ.ศ. 2550 ซึ่งการนำเข้ามีเพียงใบรับรองสุขอนามัยพืช แต่มิได้ระบุชนิดศัตรูพืชกักกันและมาตรการจัดการความเสี่ยง ดังนั้นการศึกษาวิธีตรวจสอบไวรอยด์จีนัส *Pospiviroid* จากเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์ Solanaceae จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันการเข้ามาของไวรอยด์เหล่านี้ ซึ่งจะทำความเสียหายต่อพื้นที่ปลูกพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และได้วิธีวินิจฉัยที่รวดเร็ว แม่นยำ และมีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อตรวจสอบไวรอยด์จากเมล็ดพันธุ์นำเข้าที่เหมาะสม และเป็นที่ยอมรับของสากล นำไปใช้ในการจัดการความเสี่ยงสำหรับไวรอยด์ เพื่อกำหนดมาตรการสุขอนามัยพืชสำหรับการนำเข้าเมล็ดพันธุ์พืชในวงศ์ Solanaceae จากต่างประเทศได้อย่างรัดกุม และสอดคล้องตามมาตรฐานระหว่างประเทศว่าด้วยมาตรการสุขอนามัยพืช (ISPM)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แหล่งพืช และเมล็ดที่ติดเชื้อไวรอยด์

ตัวอย่างใบพืช และเมล็ดมะเขือเทศที่ติดเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) ซึ่งรวบรวมมาจากโรงเรือน มลรัฐนอร์ทแคโรไลนา สหรัฐอเมริกา ที่มีรายงานแพร่ระบาดครั้งแรกในช่วงฤดูใบไม้ผลิ ปี พ.ศ. 2555 นำมาใช้ศึกษาวิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบเชื้อ PSTVd ในเมล็ดพืชวงศ์ Solanaceae ณ ห้องปฏิบัติการไวรัสของ USDA-ARS มลรัฐเซาท์แคโรไลนา สหรัฐอเมริกา

2. เตรียมตัวอย่างอาร์เอ็นเอ เพื่อใช้ทดสอบ 3 วิธีดังนี้

2.1 การใช้สารละลาย Trizol reagent (Invitrogen,Carlsbad, CA) ตามวิธีการของห้องปฏิบัติการ USDA-ARS รัฐเซาท์แคโรไลนา สหรัฐอเมริกา ซึ่งปรับให้เหมาะสมกับจำนวนเมล็ด โดยบดตัวอย่างที่ทดสอบด้วยสารสะลาย Trizol reagent ในถุงสกัด จากนั้นดูดของเหลวใส่หลอด micro centrifuge ปริมาตร 1.5-2.0 มล. บ่มไว้บนน้ำแข็งนาน 30 นาที และเขย่าด้วย vortex บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 ˚ซ. ดูดของเหลวส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ 1 มล. เติม

Chloroform 260 ไมโครลิตร เขย่าแรงๆ 15 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ดูดของเหลวใสส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติม isopropanol แช่เย็น 700 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้น-ลงบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ. ค่อย ๆ เทสารละลายส่วนบนออก แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง ละลายตะกอนนิวคลีอิกด้วย Nuclease free water ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

2.2 การใช้ SDS- potassium acetated ตามวิธีการ Hoshino *et al.* (2006) ที่ปรับให้เหมาะสมกับจำนวนเมล็ดซึ่งประกอบด้วยบัฟเฟอร์ 1 (0.2 M Tris HCL pH 8.0, 1.0 M NaCl และ 2% 2- mercaptoethanol ซึ่งใส่ตอนบดตัวอย่าง) บัฟเฟอร์ 2 (0.1 M EDTA pH 8.0, 2.5% sodium laurethsulphate, 6.6% PVP M.W. 40000) และบัฟเฟอร์สกัด (ผสมบัฟเฟอร์ 1 และ 2 ในอัตราส่วนที่เท่ากัน) สำหรับใช้บดตัวอย่างที่ทดสอบในถุงสกัด จากนั้นดูดของเหลวใส่หลอด micro centrifuge ปริมาตร 1 มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 65 °ซ. นาน 10 นาที เติม 5M potassium acetate ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าด้วย vortex และแช่บนน้ำแข็ง นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอด micro centrifuge ใหม่ ปริมาตร 900 ไมโครลิตร เติม isopropyl alcohol ปริมาตร 540 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดขึ้น-ลง จากนั้นแช่บนน้ำแข็ง นาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ค่อย ๆ เทสารละลายส่วนบนออก แล้วล้างด้วย 70% ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที แล้วค่อย ๆ ดูดเอา ethanol ออก และทิ้งตะกอนไว้ให้แห้งบน heat block ที่อุณหภูมิ 70 °ซ. นาน 10 นาที ละลายตะกอนนิวคลีอิกด้วย Nuclease free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเขย่าด้วย votex

2.3 การใช้น้ำคั้น (Crude sap assay) ตามวิธีการของห้องปฏิบัติการ USDA-ARS รัฐเซาท์แคโรไลนา สหรัฐอเมริกา ที่ปรับให้เหมาะสมกับเมล็ด โดยใช้น้ำคั้นพืชอัตรา 1:1,000 w/v บดตัวอย่างที่ทดสอบในถุงสกัดด้วยบัฟเฟอร์ Tris HCL ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.0 จากนั้นดูดน้ำคั้นพืชใส่หลอด micro centrifuge ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงใน Nuclease free water ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

3. วิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ จำนวน 2 วิธี ดังนี้

3.1 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ PSTVd (Shamloul *et al.*, 1997) ได้แก่ PSTVd-F:5'

ATCCCCGGGGAAACCTGGAGCGAAC 3' และ PSTVd-R: 5' CCCTGAAGCGC TCCTCCGAG 3' ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อพอสพิไวรอยด์ (Verhoeven *et al*., 2004) ได้แก่ Pospi 1-RE: 5' AGCTTCAGTTGT (T/A) TC CACCGGGT 3'และ pospi 1-FW: 5' GGGATCCCCGGGGAAAC ไพรเมอร์ชุดควบคุม internal control gene ได้แก่ NADH 2.1 a: 5' GGACTCCTGACGTATACGAA GGATC 3' และ NADH 2.2 b: 5' AGCAAT GAGATTCCCCAATATCAT 3' จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ One step Ex Tag qRT-PCR Kit (Takara, Japan) ซึ่งมีขั้นตอนของปฏิกิริยาประกอบไปด้วย Nuclease free water 4.25 ไมโครลิตร 10 uM ไพรเมอร์สาย F 0.25 ไมโครลิตร 10 uM ไพรเมอร์ สาย R 0.25 ไมโครลิตร 2x one step buffer 4.75 ไมโครลิตร one step EX Tag HS Mix 0.25 ไมโครลิตร Enzyme Mix 0.25 ไมโครลิตร อาร์เอ็นเอตัวอย่าง (ไม่ทำการเจือจาง) 0.5 ไมโครลิตร รวม 10.50 ไมโครลิตร และนำเข้าเครื่อง MJ Research PCR (Peltier Thermal Cycle; PTC-200) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 1) 50 °ซ. นาน 30 นาที 1 รอบ 2) 95 °ซ. นาน 2 นาที 1 รอบ 3) denaturation temperature 95 °ซ. นาน 30 วินาที 1 รอบ 4) annealing temperature 50 °ซ. นาน 1 นาที 1 รอบ 5) extension temperature 72 °ซ. นาน 2 นาที 1 รอบโดยขั้นตอนที่ 3 ถึง 5 จำนวน 40 รอบ 6) extension temperature สุดท้าย 72 °ซ. นาน 10 นาที 1 รอบ และ 7) 4 °ซ. นาน 15 นาที 1 รอบ นำผลปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้ 5 ไมโครลิตร ตรวจสอบแถบผลปฏิกิริยาด้วยวิธีการอีเล็กโตรโฟริซิส ความแตกต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 1.5% ในสารละลาย 0.5X TBE buffer ที่ผสมด้วย ethidium bromide และนำไปดูแถบของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ได้จากไพรเมอร์ NAD มีขนาด 188 base pair เชื้อไวรอยด์ PSTVd ขนาดประมาณ 359 base pair ส่วนเชื้อไวรอยด์ MPVd และ TCDVd ขนาดประมาณ 360 base pair

3.2 Real time reverse transcription polymerase chain reaction (Real time RT-PCR)

โดยใช้ไพรเมอร์ และโพรบที่จำเพาะต่อเชื้อ PSTVd (Boonham *et al*., 2004) ได้แก่ PSTVd-F:5'GCCCCCTTTGCGCTG T 3'PSTVd-R:5'AAG CGG TTCTCG GGA GCTT 3' และ PSTVd-p: Cy5- CAGTTGT TTCCACCGGGTAGTAGCCGA-BH02 ไพรเมอร์ชุดควบคุม internal control gene ได้แก่ Actin F: 5' TCA GCA CCT TCC AGC AGA T 3' , Actin-R: 5' CCT TTC ACC AAC ATT GTC 3' และ Actin-p: FAM-GGATT GCAAAGGCAGAGTATGACGAATCT - TAMRA จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้ One step Ex Tag qRT-PCR Kit (Takara, Japan) ซึ่งมีขั้นตอนของปฏิกิริยา

ประกอบไปด้วย Nuclease free water 4.00 ไมโครลิตร 20 uM ไพรเมอร์ สาย F 0.25 ไมโครลิตร 20 uM ไพรเมอร์ สาย R 0.25 ไมโครลิตร 2x one step buffer 4.69 ไมโครลิตร one step EX Tag HS Mix 0.25 ไมโครลิตร Enzyme Mix 0.25 ไมโครลิตร 10 uM โพรบ 0.25 ไมโครลิตร Diluted Reference Dye (ROX) 0.19 ไมโครลิตรอาร์เอ็นเอตัวอย่าง (เจือจางอัตราส่วน 1:10) 0.5 ไมโครลิตร รวม 10.20 ไมโครลิตร และนำเข้าเครื่อง MX3000P Real time PCR (Stratagene, La Jolla, CA) โดยตั้งโปรแกรมการดังนี้ 1) 50 °ซ. นาน 30 นาที 1 รอบ 2) 95 °ซ. นาน 2 นาที 1 รอบ 3) denaturation temperature 95 °ซ. นาน 10 วินาที 1 รอบ 4) annealing temperature 55 °ซ. นาน 30 วินาที 1 รอบ โดยขั้นตอน 3 ถึง 4 จำนวน 40 รอบ ผลการทดสอบจะแปลผลได้เมื่อ positive control มีค่า Ct value (threshold cycle) ต่ำกว่า 32 cycle และไม่มีการปนเปื้อนในตัวอย่าง NTC (No template control) ค่า Ct value ระหว่าง 32-37 cycle ถือว่า weak positive (ต้องตรวจยืนยันซ้ำอีกครั้ง) ค่า Ct มากกว่า 37 cycle หรือ No Ct ถือว่า negative control

4. ศึกษาความเป็นไปได้ของเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อไวรอยด์

4.1 ตรวจสอบไวรอยด์ PSTV จากเมล็ดมะเขือเทศ โดยนำเมล็ดที่ติดเชื้อ 1 เมล็ด 5 เมล็ด และ 10 เมล็ด มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Trizol reagent ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 2.1 เปรียบเทียบกับใบพืชที่ติดเชื้อ และใบพืชปกติ และตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธี RT-PCR และ Real time RT-PCR ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 3.1 และ 3.2

4.2 ตรวจสอบไวรอยด์ PSTVd จากหนึ่งเมล็ด โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากหนึ่งเมล็ด จำนวนทั้งสิ้น 10 เมล็ดด้วยวิธี Trizol reagent ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 2.1 และคัดเลือกจำนวน 2 ตัวอย่าง ที่ให้ผลชัดเจนที่สุดมาเจือจางอาร์เอ็นเอ ที่อัตราส่วนระดับต่างๆ ได้แก่ 1:10 1:100 1:1,000 และ 1:10,000 ตามลำดับ แล้วนำมาตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธี Real time RT-PCR ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 3.2

5. ศึกษาวิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรอยด์จากพืช และเมล็ดวงศ์ Solanaceae

5.1 ประสิทธิภาพของสองวิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบเชื้อ PSTVd โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากการผสมกันของหนึ่งเมล็ดติดเชื้อ และเมล็ดปกติของมะเขือเทศที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 1:100 เมล็ด 1:200 เมล็ด 1:400 เมล็ด และ 1:800 เมล็ด สกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Trizol reagent ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 2.1 โดยเปรียบเทียบเมล็ดที่ติดเชื้อ 1 เมล็ด และเมล็ดปกติ 800 เมล็ด แล้วตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธีวินิจฉัย 2 วิธีดังแสดงรายละเอียดในข้อ 3.1 และ 3.2

5.2 ประสิทธิภาพของสองวิธีการสกัดเพื่อตรวจสอบเชื้อ PSTVd โดยนำเมล็ดมะเขือเทศ

ติดเชื้อ จำนวน 1 เมล็ด 5 เมล็ด และ 10 เมล็ด ผสมกับเมล็ดปกติ 400 เมล็ด มาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี SDS potassium acetate ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 2.2 แล้วตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยสองวิธีวินิจฉัย ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 3.1 และ 3.2 เปรียบเทียบกับชุดควบคุม internal control gene

5.3 ประสิทธิภาพของสองวิธีการสกัดเพื่อตรวจสอบเชื้อ PSTVd จากเมล็ดพืชวงศ์ Solanaceae โดยนำเมล็ดติดเชื้อหนึ่งเมล็ดผสมกับเมล็ดปกติ 400 เมล็ด ของพืชวงศ์ Solanaceae ได้แก่ มะเขือเทศ พริกหวาน มะเขือม่วง มาทำการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยสองวิธีการ ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 2.1 และ 2.2 และตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยวิธี Real time RT-PCR ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 3.1

5.4 ตรวจสอบเชื้อพอสพิไวรอยด์จากเมล็ดมะเขือเทศด้วยสองวิธีการสกัด จำนวน 2 ตัวอย่าง ซึ่งได้มาจากบริษัทเมล็ดพันธุ์ โดยนำเมล็ด 400 เมล็ด มาสกัดด้วยสองวิธีการสกัด ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 2.1 และ 2.2 แล้วนำตัวอย่างอาร์เอ็นเอมาตรวจสอบไวรอยด์ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ชุดควบคุม internal control gene และไพรเมอร์จำเพาะสำหรับพอสพิไวรอยด์ เปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิงของเชื้อ PSTVd, *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) และ *Maxicanpapita viroid* (MPVd)

6. ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบไวรอยด์จากเมล็ดมะเขือเทศ

นำเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่ใช้ปรับปรุงพันธุ์ (tomato breeder stock seeds) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533-2555 จำนวน 22 ตัวอย่างในโรงเรือน มลรัฐนอร์ทแคโรไลนา มาตรวจสอบหาเชื้อไวรอยด์ PSTVd เนื่องจากมีรายงานพบครั้งแรกใน ปี พ.ศ. 2555 จำนวนตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมีจำนวนเมล็ดตั้งแต่ 50-450 เมล็ด จากนั้นทำการแบ่งครึ่งจากจำนวนเมล็ดทั้งหมดในแต่ละตัวอย่าง แล้วนำมาสกัดอาร์เอ็นด้วยวิธี Trizol reagent ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 2.1 ซึ่งใช้สารละลาย Trizol 4 และ 5 มล./เมล็ด 25-75 และ 100-255 ตามลำดับ แล้วตรวจสอบเชื้อ PSTVd เปรียบเทียบกับเมล็ดที่ติดเชื้อ และเมล็ดปกติ ด้วยวิธี Real time RT-PCR ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 3.2

7. ศึกษาลักษณะอาการและการถ่ายทอดโรคของไวรอยด์บนพืชอาศัย

นำเมล็ดที่ติดเชื้อ PSTVd จากมลรัฐนอร์ทแคโรไลนา จำนวน 10 เมล็ด บดด้วยบัฟเฟอร์แช่เย็น (137 mMNacl, 8 mM Na_2HP0_4, 5 mM KH_2PO_4, 2.7 mM KCl, 7.9 mM Na_2SO_3, pH 7.0) ปริมาตร 2 มล. ปลูกเชื้อลงบนต้นกล้ามะเขือเทศ (CV. Rutgers และ Moneymaker) พริกหวาน (พันธุ์ลูกผสม) และพิทูเนีย (*Petunia hybrida*) ระยะเริ่มปรากฏ

ใบจริง โดยโรยผงคาร์บอรันดัมเพียงเล็กน้อยตรงบริเวณด้านบนของใบให้ทั่ว แล้วทาน้ำคั้นจากเมล็ดที่ติดเชื้อจำนวน 3-5 ต้น/พืช เปรียบเทียบการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากใบมะเขือเทศติดเชื้อ PSTVd และบัฟเฟอร์ (Mock) และบ่มเชื้อไว้ในโรงเรือนของหน่วยงาน USDA-ARS มลรัฐเซาท์แคโรไลนา สหรัฐอเมริกา ซึ่งควบคุมอุณหภูมิ 25 °ซ. และอยู่ภายใต้การควบคุมด้านกักกันพืชของสหรัฐอเมริกา จากนั้นตรวจสอบไวรอยด์จากใบพืชที่อายุ 4 และ 8 สัปดาห์ หลังการปลูกเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับการตรวจสอบไวรอยด์จากเมล็ดซึ่งเก็บรวบรวมจากต้นพืชที่ติดเชื้อ โดยการนำผลสุกมาทำให้แตก แยกเมล็ดออกแล้วนำมาล้างด้วยน้ำ และผึ่งไว้ให้แห้ง จากการสกัดด้วยวิธีน้ำคั้น ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 2.3 และวิธีวินิจฉัย Real time RT-PCR ดังแสดงรายละเอียดในข้อ 3.2

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาความเป็นไปได้ของเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อไวรอยด์

1.1 การตรวจสอบเชื้อ PSTVd จากเมล็ดมะเขือเทศที่ติดเชื้อ PSTVd ที่ระดับต่างๆ ได้แก่ 1 เมล็ด 5 เมล็ด และ 10 เมล็ด เปรียบเทียบกับใบพืชที่ติดเชื้อ และใบพืชปกติด้วยวิธีการสกัด Trizol reagent ผลปรากฏว่าวิธีการสกัดนี้สามารถตรวจสอบไวรอยด์ได้ทั้งจากเมล็ดและใบพืช และทั้งสองวิธีวินิจฉัยสามารถตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ได้ทุกตัวอย่างที่ทดสอบ (Table 1)

1.2 การตรวจสอบเชื้อ PSTVd ด้วยวิธี Real time RT-PCR จากเมล็ดติดเชื้อ 1 เมล็ด จำนวน 10 เมล็ด ซึ่งสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Trizol reagent ผลปรากฏว่าพบเมล็ดติดเชื้อเพียง 7 เมล็ด เมื่อเจือจางอาร์เอ็นเอจากหนึ่งเมล็ดที่ระดับต่างๆ สามารถตรวจพบไวรอยด์ที่ระดับ 1:10 1:100 และ 1:1,000 แสดงให้เห็นว่าระดับต่ำสุดเพียงหนึ่งเมล็ดที่ปนเปื้อนเชื้อไวรอยด์ วิธีการ Real Home RT-PCR ก็สามารถตรวจสอบได้ (Figure 1) จึงนำไปใช้ในการศึกษาต่อในข้อ 2 อย่างไรก็ตามการติดเชื้อไวรอยด์ในเมล็ดมีความแตกต่างกันและปริมาณของเชื้อน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับ Singh *et al.* (2003) รายงานว่าเมล็ดติดเชื้อที่เวลาต่างกัน ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และแสง

2. ศึกษาวิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรอยด์จากพืช และเมล็ดวงศ์ Solanaceae

2.1 ประสิทธิภาพของสองวิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบเชื้อ PSTVd จากการผสมกันของหนึ่งเมล็ดติดเชื้อ และเมล็ดปกติของมะเขือเทศระดับต่างๆ แล้วสกัดอาร์เอ็นเอวิธี Trizol reagent ผลปรากฏว่าวิธีวินิจฉัย RT-PCR สามารถตรวจพบเชื้อไวรอยด์ที่ระดับ 1:100 1:200 และ 1:800 แต่ที่ระดับ 1:400 ไม่สามารถตรวจพบได้ ขณะที่วิธีวินิจฉัย Real time RT PCR สามารถตรวจพบไวรอยด์ได้ทุกระดับ (Table 1 and Figure 2) เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดปกติ 800 และเมล็ดติดเชื้อ 1 เมล็ด ซึ่งสอดคล้องกับ

Table 1. PSTVd detection from infected tomato seed in various ratios

Diagnostic Method/ RNA extraction method		Infected tomato seed (No.)			Ratio of PSTVd infected seed to healthy seeds			
		1	5	10	1:100	1:200	1:400	1:800
RT-PCR	M1*	+[a]	+	+	+	+	-	+
	M2	-	+	+	nt[b]	nt	nt	nt
Real time	M1	+	+	+	+	+	+	+
RT-PCR	M2	+	+	+	nt	nt	nt	nt

*M1: Trizol reagent method, M2: SDS-potassium acetate

[a] +: detected, - : not detected, [b]nt: not test

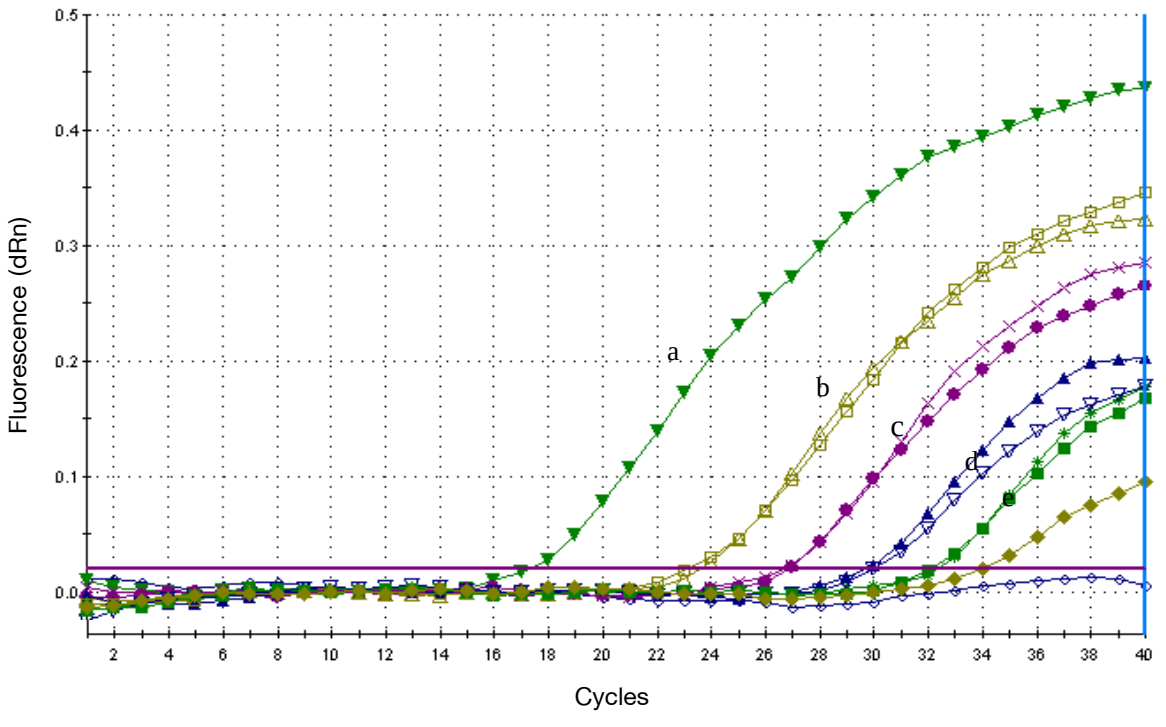

Figure 1 Real time RT-PCR analysis of PSTVd levels from dilution of one infected seed in two samples per ratro. (a) PSTVd from leaf tissue (b) dilution of 1:10 (c) dilution of 1:100 (d) dilution of 1:1,000 (e) dilution of 1:10,000 (f) healthy leaf.

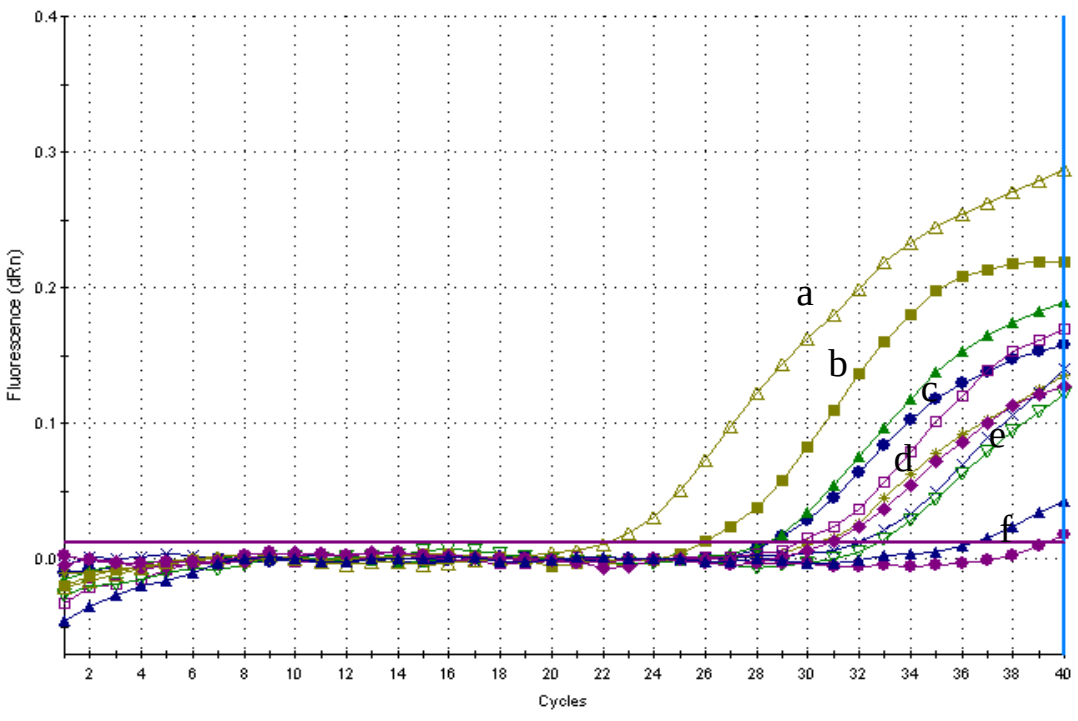

Figure 2 Real time RT-PCR analysis of PSTVd levels from dilution of one infected seed in two samples per ratro. (a) PSTVd from leaf tissue (b) dilution of 1:10 (c) dilution of 1:100 (d) dilution of 1:1,000 (e) dilution of 1:10,000 (f) healthy leaf.

รายงานการตรวจสอบเชื้อนี้ในเมล็ดมะเขือเทศจากการผสมกันของเมล็ดติดเชื้อและเมล็ดปกติด้วยวิธี RT-PCR (Hoshino *et al*., 2006)

2.2 ประสิทธิภาพของสองวิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบเชื้อ PSTVd จากเมล็ดมะเขือเทศที่สกัดด้วยวิธี SDS-potassium acetate ผลปรากฏว่าวิธีการสกัดนี้สามารถตรวจสอบไวรอยด์ได้ทั้งจากเมล็ดและใบพืช และทั้งสองวิธีวินิจฉัยสามารถตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม internal control gene โดยเฉพาะหนึ่งเมล็ดที่ติดเชื้อไม่สามารถตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR แต่ตรวจสอบพบด้วยวิธี Real time RT-PCR ซึ่งผลเช่นนี้แสดงให้เห็นว่าวิธี Real time RT-PCR สามารถตรวจสอบเชื้อจากเมล็ดที่ระดับต่ำสุดหนึ่งเมล็ดได้ถูกต้อง แม่นยำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Boonham *et al.* (2004) และ Botermans *et al.* (2013) สามารถตรวจสอบเชื้อนี้ได้จากพืช นอกจากนี้มีความไว และจำเพาะสูง สามารถตรวจสอบเชื้อพอสพิไวรอยด์จากพืชในเบื้องต้นระดับ large-scale ในขณะที่การรายงานของ Hoshino *et al.* (2006) ด้วยวิธี RT-PCR และวิธี RT-LAMP (Tsutsumi *et al*., 2010) สามารถตรวจสอบเชื้อนี้จากหนึ่งเมล็ดมะเขือเทศได้เช่นกัน

2.3 ประสิทธิภาพของสองวิธีการสกัดเพื่อตรวจสอบไวรอยด์ PSTVd จากการผสมกันของเมล็ดระดับ 1 : 400 ของเมล็ดพืชวงศ์ Solanaceae ได้แก่ มะเขือเทศ พริกหวาน และมะเขือม่วง ผลปรากฏว่าการตรวจสอบด้วยวิธี Real time RT-PCR พบว่าทั้งสองวิธีการสกัดสามารถตรวจเชื้อไวรอยด์ได้ทุกชนิดพืชที่ทดสอบ (Table 2) อย่างไรก็ตามการใช้เมล็ดมะเขือเทศที่ติดเชื้อในการทดสอบกับเมล็ดพืชชนิดอื่น ซึ่งขนาดเมล็ดใกล้เคียงกันจึงน่าสามารถปรับใช้เพื่อการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์จากเมล็ดพืชชนิดอื่นได้เช่นกัน

2.4 วิธีวินิจฉัย RT-PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อพอสพิไวรอยด์จากเมล็ดมะเขือเทศด้วยสองวิธีการสกัด ซึ่งใช้ไพรเมอร์จำเพาะสำหรับเชื้อพอสพิไวรอยด์ 6 ชนิด เปรียบเทียบกับชุดควบคุม internal control gene ผลปรากฏว่าทั้งสองตัวอย่างตรวจพบอาร์เอ็นเอด้วยสองวิธีการสกัดแต่ไม่พบไวรอยด์จากเมล็ดมะเขือเทศเมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างอ้างอิงของเชื้อ PSTVd TCDVd และ MPVd

3. ทดสอบประสิทธิภาพของวิธีวินิจฉัยเพื่อตรวจสอบไวรอยด์จากเมล็ดมะเขือเทศ

วิธีวินิจฉัย Real time RT-PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ PSTVd จากเมล็ดมะเขือเทศจากโรงเรือนนอร์ทแคโรไลนา สหรัฐอเมริกา ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2533-2555 จำนวน 22 ตัวอย่าง ด้วยวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ Trizol reagent ผลปรากฏว่าพบเชื้อไวรอยด์ จำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างจาก Greenhouse 2009-2010 จำนวน 1 ตัวอย่าง จาก Greenhouse 2010-2011 จำนวน 2 ตัวอย่าง Accessions 1 ตัวอย่าง จาก Bac speck introgression, viroid exposed จำนวน 1 ตัวอย่าง จาก TMV introgression, viroid exposed จำนวน 1 ตัวอย่าง ซึ่งคาดว่าเมล็ดที่เก็บรวบรวมไว้เพื่อเพาะปลูกอาจเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการแพร่ระบาดของเชื้อนี้ในโรงเรือน นอร์ทแคโรไลนา ปี พ.ศ. 2555 (Ling *et al.*, 2012) จึงต้องทำการสำรวจติดตามในแหล่งที่ระบาดอย่างต่อเนื่องเพื่อการกำจัดโรค

4. ศึกษาลักษณะอาการและการถ่ายทอดโรคของไวรอยด์บนพืชอาศัย

เมื่อปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากเมล็ดมะเขือเทศที่ติดเชื้อ PSTVd ลงบนต้นพืชอาศัยในวงศ์ Solanaceae ได้แก่ มะเขือเทศ พริกหวาน และพิทูเนีย โดยเปรียบเทียบกับการปลูกเชื้อด้วยใบมะเขือเทศที่ติดเชื้อ และสารละลายบัฟเฟอร์ (Mock) แล้วตรวจสอบด้วยวิธีวินิจฉัย Real time RT-PCR จากการสกัดด้วยวิธีน้ำคั้นจากใบและเมล็ดผล ปรากฏว่ามะเขือเทศที่ติดเชื้อสามารถถ่ายทอดโรคสู่ต้นพืชอาศัยทุกชนิดที่ทดสอบโดยต้นมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers แสดงอาการรุนแรง มากกว่าพันธุ์ Moneymaker (Figure 3) พริกหวานแสดงอาการเพียงเล็กน้อยจากการตรวจสอบด้วยน้ำคั้นจากใบที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ หลังการปลูกเชื้อ ผลยังสอดคล้องกับการตรวจพบเชื้อจากเมล็ดมะเขือเทศ และพริกหวานจากต้นที่ติดเชื้อ ในขณะที่ต้นพืชพิทูเนียติดเชื้อแต่ไม่แสดงอาการ

Table 2. Detection of PSTVd in Solanaceous seeds by Real time RT-PCR

Diagnostic method/ RNA extraction method		Single infected tomato seed to 400 healthy seeds in various plants		
		Tomato seeds	Pepper seeds	Eggplant seeds
Real time RT-PCR	M1*	5/5[a]	3/3	5/5
	M2	5/5	3/3	5/5

* M1: Trizol reagent method, M2: SDS-potassium acetate

[a]: No. of samples detected/No. of samples tested

Figure 3 Symptoms appearing on tomato cv. Rutgers after 8 weeks inoculation with PSTVd infected seeds. Left: PSTVd infected leaf inoculation; middle: PSTVd infected seeds inoculation; Right: non-inoculation.

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าทั้งสามวิธีการสกัดและสองวิธีวินิจฉัยสามารถใช้ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ศัตรูพืชกักกัน *Potato spindle tuber viroid* จากพืชวงศ์ Solanaceae และเมล็ดพันธุ์ได้แก่ มะเขือเทศ พริกหวานมะเขือม่วงและพิทูเนีย โดยเฉพาะวิธีวินิจฉัย Real time RT-PCR มีประสิทธิภาพ แม่นยำ สามารถตรวจตัวอย่างปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว ผลงานวิจัยนี้จึงเป็นองค์ความรู้ที่ใหม่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย สามารถใช้ประโยชน์ได้จริงในการจัดการความเสี่ยงสำหรับไวรอยด์จากต่างประเทศมิให้เข้ามาแพร่ระบาด

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสำนักงานวิจัยพัฒนาการการเกษตร (องค์การมหาชน) ที่ให้ทุนสนับสนุนการปฏิบัติงานวิจัย ณ ประเทศสหรัฐอเมริกา และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือต่างๆ และขอขอบคุณบิดา-มารดาผู้เป็นกำลังใจสำคัญให้ลูกเสมอมา

เอกสารอ้างอิง

สุคนธ์ทิพย์ สมบัติ อลงกต โพธิ์ดี วาสนา ฤทธิ์ไธสง และคมศร แสงจินดา. 2554. การศึกษาวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงศัตรูพืชสำหรับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้าจากสหรัฐอเมริกา. *รายงานวิจัยเรื่องเต็ม กรมวิชาการเกษตร*. กรุงเทพฯ. 10 หน้า.

Boonham, N.,L.G. Perez, M.S. Mendez, E.L. Peralta, A. Blockley, K. Walsh, I. Barker and R.A. Mumford. 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid*. *Journal of Virological Methods.* 116: 139-146.

Botermans, M., B.T.L.H. van de Vessenberg, J.Th.J.Verhoeven, J.W. Roenhorst, M. Hooftman, R. Dekter and E.T.M. Meekes. 2013. Development and validation of a real time RT-PCR assay for generic detection of *Pospiviroid*s. *Journal of Virological Method*. 187: 43-50.

Department of Agriculture, Fisheries and Forestry (DAFF). 2013. Import conditions search (ICON Search). [Online]. Available at http://www.aqis.gov.au/icon32/asp/ex__querycontent.asp.Last accessed on 15 May 2013.

EFSA Panel on Plant Health (PLH). 2011. Scientific Opinion on the assessment of the risk of solanaceous *Pospiviroid*s for the EU territory and the identification and evaluation of risk management options. EFSA *Journal 9(8)*: 2330. [133 pp.]

Hoshino, S., T. Okuta, M. Isaka, N. Tutumi, N. Miyai, T. Ikeshiro, N. Saito, T. Oharaand T. Takahashi. 2006. Detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) in tomato (*Lycopersicon esculentum*) and potato (*Solanum tuberosum*) seeds. *Research Bulletin of the Plant Protection Service*. 42: 69-73.

Ling, K. S. and R. Li. 2012. First report of Potato spindle tuber viroid naturally infecting greenhouse tomatoes in North Carolina. *Plant disease.* 97: 148

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF). 2013. Summary of proposed Revisions to the Enforcement Ordinance of the Plant Protection Law and Concerned Public Notices. [Online]. Avialable at http://members.wto.org/crn attachments/2013/sps/JPN/13__2446__00__e.pdf. Last accessed on 28 June 2013.

Ministry for Primery Industries (MPI). 2012. *Risk Management proposal Solanumly copersicum* (tomato) *seed for sowing, from all countries*. Wellington, New Zealand.

Shamloul, A. M., A. Hadidi, S.F. Zhu, R.P.

Singh and B. Sagredo. 1997. Sensitive detection of *Potato spindle tuber viroid* using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 19: 89–96.

Singh, R. P., K. F. M. Ready andX. Nie, 2003. Part II. Biology. *In* 'Viroids'. (Eds A Hadidi, R Flores, JW Randles, JS Semancik) pp. 30–48. (CSIRO Publishing: Australia)

Tsutsumi, N., H. Yanagisawa, Y. Fujiwara and T. Ohara. 2010. Detection of *Potato spindle tuber viroid* by Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification. *Res. Bull. Pl. Prot. Japan*. 46: 61-67

Verhoeven, J. Th. J., C. C. C. Jansen, T. M. Willemen, L. F. F. Kox, R. A. Owens and J. W. Roenhorst. 2004. Natural infection of tomato by *Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. Eur J Plant Pathol.* 110:823-831.