

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid* (GYSVd)  
เชื้อสาเหตุโรคในองุ่นด้วยวิธีอณูชีววิทยา

Development of Detection Technique for *Grapevine yellow speckle viroid* (GYSVd) Causing Grapevine Disease by Molecular Technique

ผู้ดำเนินการ นายปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภรณ์<sup>1</sup> นางสาวคณินนิตย์ เจริญวรการ<sup>2</sup>  
นางสาวกาญจนา วาระวิชนี<sup>1</sup>  
กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช<sup>1</sup>  
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน วิทยาเขตกำแพงแสน  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์<sup>2</sup>

บทคัดย่อ

เชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid* 1 (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid* 2 (GYSVd-2) เป็นเชื้อสาเหตุโรค “grapevine yellow speckle disease” ในองุ่น พบได้ทั่วไปในหลายพื้นที่ที่มีการปลูกองุ่น สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางท่อนพันธุ์และวัสดุอุปกรณ์เกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อได้ง่าย ทำให้เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวสามารถแพร่กระจายโรคได้ง่ายและรวดเร็ว ประกอบกับในปัจจุบันมีผู้ศึกษาเชื่อดังกล่าวน้อยมาก ทำให้มีข้อมูลผลกระทบของโรคชนิดนี้น้อยตามไปด้วย ดังนั้น การศึกษาพัฒนาวิธีการในการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำสูง จึงมีความจำเป็นต่อการศึกษาเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด จากการสำรวจโรคไวรัสและไวรอยด์ในพื้นที่ปลูกองุ่นในพื้นที่จังหวัดสระบุรีและนครราชสีมา เดือนกุมภาพันธ์และมีนาคม ปี 2557 ตรวจพบองุ่นแสดงอาการผิดปกติ ใบมีจุดเหลือง (chlorosis) กระจายทั่วไป เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุลโดยการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB method และปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 (c-GYSVd1: CGAGGCTCACTCCCCCTCTGCC / h-GYSVd1: TCGTCGACGAAGGGGTGCACTCC) และ GYSVd2 (upper) (c-GYSVd2 (upper): GGTCGCGGAGGCCTTCCGAGG / h-GYSVd2 (upper): TGCAGAGAAAAGAAGAAGGGCCAG) สามารถตรวจพบเชื้อ GYSVd-1 จำนวน 6 ตัวอย่าง และ GYSVd-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง จากตัวอย่างใบองุ่นทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง โดยเชื้อ GYSVd-1 ที่ตรวจพบมีขนาดตั้งแต่ 353-389 นิวคลีโอไทด์ และเชื้อ GYSVd-2 มีขนาดตั้งแต่ 362-365 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งการสำรวจในครั้งนี้เป็นการตรวจพบเชื้อ GYSVd-2 ครั้งแรกในประเทศไทย

คำนำ

ปัจจุบันองุ่นเป็นพืชที่มีการปลูกขยายพันธุ์อย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยมีการนำเข้ากิ่งพันธุ์จากต่างประเทศเพื่อนำมาปลูกปรับปรุงพันธุ์ แต่เนื่องจากท่อนพันธุ์องุ่นมีสถานภาพตามพระราชบัญญัติกักพืช เป็นเพียง “สิ่งไม่ต้องห้าม” จึงไม่ได้มีข้อกำหนดหรือเงื่อนไขพิเศษใด ๆ ก่อนการนำเข้า มีเพียงใบรับรองสุขอนามัยพืชที่ไม่ได้ระบุข้อความพิเศษหรือเงื่อนไขข้อกำหนดใด ๆ เท่านั้น ดังนั้นท่อนพันธุ์องุ่นที่นำเข้าจะไม่ได้ถูกตรวจสอบรับรองการปลอดเชื้อสาเหตุโรคหรือศัตรูพืชใด ๆ ก่อนการนำเข้าทั้งสิ้น ซึ่งเป็นความเสี่ยงอย่างมากที่เชื้อสาเหตุโรคพืชอาจติดเข้ามาเป็นส่วนขยายพันธุ์ดังกล่าวได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวรัสและไวรอยด์

เชื้อไวรอยด์ที่มีรายงานว่าสามารถเข้าทำลายองุ่นได้มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Australian grapevine viroid* (AGVd) (Hadidi *et al.*, 2003), *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) (Li *et al.*, 2007) ซึ่งในจำนวนนี้มี 2 ชนิดที่มีรายงานการเข้าทำลายองุ่นในประเทศไทย คือ HSVd (วรลักษ์ณ์, 2545) และ GYSVd-1 (Hannok, 2004) สำหรับเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ก่อให้เกิดโรค “grapevine yellow speckle disease” พบครั้งแรกในปี 1972 ที่ประเทศออสเตรเลีย (Taylor and Woodham, 1972) ลักษณะอาการโดยทั่วไปคือ ใบจะมีอาการจุดเหลือง หรืออาจจะเป็นลักษณะจุดหรือกระสีเหลือง กระจายทั่วไปตามเส้นใบ ซึ่งลักษณะอาการจะขึ้นกับสภาพอากาศ หากอาการโรครุนแรงจะส่งผลให้ใบพืชที่แสดงอาการมีระดับการสังเคราะห์แสงลดลงซึ่งส่งผลโดยตรงกับอัตราการเจริญของพืช รวมถึงปริมาณและคุณภาพของผลผลิตด้วย นอกจากนี้ยังอาจเกิดอาการ vein banding คือเนื้อเยื่อบริเวณรอบเส้นใบมีสีเข้มหรือซีดกว่าเนื้อใบได้ด้วย (Hadidi *et al.*, 2003) โดยอาจพบอาการผิดปกติได้ตั้งแต่ช่วงต้นเดือนตุลาคมจนถึงมกราคม และอาจพบได้จนถึงเดือนมีนาคมหากต้นองุ่นยังสามารถเจริญเติบโตได้ (คณิงนิตย์, 2556) สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ GYSVd-1 ในไร่องุ่นที่จังหวัดนครราชสีมา (Hannok, 2004) โดยพบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ GYSVd-1 ที่มีรายงานในออสเตรเลีย 96% และเมื่อนำมาปลูกเชื้อให้กับมะเขือเทศ สามารถทำให้มะเขือเทศเกิดอาการต้นเตี้ยแคระและใบผิดปกติ (Hannok, 2004; Hannok and Reanwarakorn, 2005) เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวสามารถถ่ายทอดโรคด้วยวิธีกล เช่น วัสดุอุปกรณ์การเกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อ และติดไปกับท่อนพันธุ์ได้ง่าย จึงง่ายต่อการกระจายตัวเนื่องจากโรคติดไปกับท่อนพันธุ์จากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่งได้ ประกอบกับเชื่อดังกล่าวมีผู้ศึกษาน้อยมาก จึงทำให้ในปัจจุบันยังมีข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อชนิดนี้น้อยตามไปด้วย ดังนั้นการศึกษาพัฒนาวิธีการในการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพ ความถูกต้องแม่นยำสูง จึงมีความจำเป็นต่อการศึกษาเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการแพร่ระบาดของโรคดังกล่าว

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

๑. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
๒. ตู้แช่ 4 องศาเซลเซียส
๓. ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส
๔. เครื่องซั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง
๕. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
๖. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
๗. เครื่อง Thermal cycler (PCR)
๘. Gel electrophoresis
๙. Gel Documentation UV-transilluminator
๑๐. เอ็นไซม์ One-Step RT-PCR (SS III reverse transcriptase /PLATINUM Taq polymerase) (Invitrogen)
๑๑. เอ็นไซม์ Taq DNA polymerase
๑๒. 100 bp DNA Ladder
๑๓. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอน การสกัดอาร์เอ็นเอ การตรวจสอบด้วยปฏิกิริยา RT-PCR และ DNA cloning
๑๔. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

### วิธีการ

#### ๑. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในองุ่น

โดยตรวจสอบเอกสารข้อมูลของเชื้อไวรอยด์ 2 ชนิด คือ *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) ลักษณะอาการที่สำคัญ แหล่งที่มีรายงานการตรวจพบ

#### ๒. ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2

โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) และความรู้ทาง bioinformatics นำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 จากนั้นนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว คือ คู่ไพรเมอร์ cv218 และ hv219 (Hannok, 2004)

#### ๓. สํารวจและเก็บตัวอย่างโรคไวรอยด์องุ่น

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคนูนที่แสดงอาการที่จำเพาะของโรค โดยใบพืชจะมีลักษณะจุดเหลืองกระจายทั่วไป ในพื้นที่ไร่ร่อนอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี อำเภอบางบาล และ วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา และนำตัวอย่างโรคนูนที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าวมาทดสอบต่อในห้องปฏิบัติการ

#### ๔. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบร่อน

โดยอาศัยการตรวจหายีน *nadh* ในพืช และใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) กับคู่ไพรเมอร์ Nad (Nad2.1a: GGACTCCTGACGTATACGAAGG ATC และ Nad2.2b: AGCAATGAGATTCCTCAATATCAT) (Thompson *et al.*, 2003) มาช่วยในการประเมินประสิทธิภาพของวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ โดยมีขั้นตอนดังนี้;

ส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR มีดังนี้; กรดนิวคลีอิกที่ได้จากการสกัดตัวอย่างใบร่อน 1 ไมโครลิตร กับไพรเมอร์ Nad2.1a และ Nad2.2b ความเข้มข้น 2  $\mu\text{M}$  ปริมาตรเส้นละ 2 ไมโครลิตร 2X Reaction Mix buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ SuperScript™ III RT / Platinum® Taq Mix ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร (ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร) จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้; อุณหภูมิ 48<sup>o</sup>ซ นาน 50 นาที จำนวน 1 รอบ, 94<sup>o</sup>ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ, denaturation temperature 94<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 56<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72<sup>o</sup>ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดด้วยวิธีการ Gel electrophoresis ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 2.0 % ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และย้อม gel ด้วย ethidium bromide และนำไปตรวจแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ Nad จะมีขนาด 188 base pair ซึ่งหากตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวแสดงว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอวิธีนี้มีประสิทธิภาพดีเหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบร่อน

#### ๕. การทดสอบตรวจเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ด้วยวิธีการ RT-PCR

##### ๕.๑ การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพืช

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบร่อนด้วยวิธี CTAB method (ปรีเชษฐ, 2548) โดยบดตัวอย่างพืช 100 มิลลิกรัม เติม CTAB Extraction buffer (2 % CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1.0 % Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> และ 2.0 % PVP-40 โดยเติม Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> และ PVP-40 ก่อนใช้) ปริมาตร 1 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65<sup>o</sup>ซ 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม

chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติม 5 M NaCl ปริมาตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร และ isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -20°C ซ้ำมคืน นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE buffer ที่มี 1 % SDS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol ที่แช่เย็น 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปตรวจสอบหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ในขั้นต่อไป

๕.๒ ตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่และไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อน ประกอบไปด้วย

1. คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-1

c-GYSVd-1: (CGAGGCTCACTCCCCCTCTGCC)

h-GYSVd-1: (TCGTCGACGAAGGGGTGACTCC)

2. คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (upper) ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-2 โดยออกแบบจาก

บริเวณ upper conserve domain ของเชื้อ GYSVd-2

c-GYSVd-2 (upper): (GGTCCGCGGAGGCCTTCCGAGG)

h-GYSVd-2 (upper): (TGCAGAGAAAAGAAGAAGGGCCAG)

3. คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (lower) ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-2 โดยออกแบบจาก

บริเวณ lower conserve domain ของเชื้อ GYSVd-2

c-GYSVd-2 (lower): (AGGAGACAGGCCCGCGTTTCGCC)

h-GYSVd-2 (lower): (AAGATGCCTCCGCTAGTCGAGCGG)

4. คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 (Hannok, 2004) สำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-1 และ

GYSVd-2 ใช้เป็นไพรเมอร์เปรียบเทียบในการทดลอง

cV218: (GGACGCGAACGTGAATAGG)

hV219: (TTGAGGCCTGGCGTAACGC)

๕.๓ การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR

ตรวจสอบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอพืชที่สกัดได้ ด้วยปฏิกิริยา One-Step RT-PCR (Invitrogen) โดยการผสมกรดนิวคลีอิกที่สกัดจากพืชทดสอบ 1 ไมโครลิตร กับไพรเมอร์ ความเข้มข้น 2  $\mu\text{M}$  ปริมาตรเส้นละ 2 ไมโครลิตร 2X Reaction Mix buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่น หนึ่งห้าเชื้อ ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร และเอ็นไซม์ SuperScript™ III RT / Platinum® Taq Mix ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

คู่ไพรเมอร์ GYSVd1: 48<sup>o</sup>ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94<sup>o</sup>ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 62<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72<sup>o</sup>ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (upper): 48<sup>o</sup>ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94<sup>o</sup>ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 62<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72<sup>o</sup>ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (lower): 48<sup>o</sup>ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94<sup>o</sup>ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 62<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72<sup>o</sup>ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219: 48<sup>o</sup>ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94<sup>o</sup>ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 58<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72<sup>o</sup>ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72<sup>o</sup>ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดด้วยวิธี Gel electrophoresis ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 2.0 % ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และย้อม gel ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยดีเอ็นเอเชื้อไวรัสที่ได้จะมีขนาดประมาณ 370 เบส โดยหากตัวอย่างใดตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสดังกล่าวจะนำมาปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ gynura และมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ด้วยวิธีกล โดยบดใบพืชที่เป็นโรคกับ Phosphate buffer (pH 9.0) ความเข้มข้น 0.1 M ผสมรวมกับผง carborundum หรือ celite นำมาทาบนพืชทดสอบ (ปริเชษฐ, 2548) จากนั้นจึงนำพืชทดสอบดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพื่อเร่งให้พืชทดสอบแสดงอาการผิดปกติที่เป็นจุดสังเกตให้ปรากฏออกมา (Harris and Browning, 1980)

## ๖. หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้เชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy (Promega) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Library efficiency DH5 $\alpha$  competent cells (Invitrogen) โดยใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch *et. al.*, 2001) จากนั้นตรวจสอบโคลนที่ได้และสกัดพลาสมิดด้วยชุด Gene JET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาวิเคราะห์จำแนกชนิด ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ และวิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ที่ตรวจพบด้วยโปรแกรมต่าง ๆ ดังนี้

๖.๑ วิเคราะห์จำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อยืนยันผลการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR

๖.๒ วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ ด้วยโปรแกรม mfold RNA-Folding-Form (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>) เพื่อยืนยันผลการตรวจสอบในขั้นสุดท้าย

๖.๓ วิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW) ในการทำ multiple sequence alignment และสร้าง phylogenetic tree ของกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เราศึกษาว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไร และสามารถจัดจำแนกกลุ่มออกมาได้ในลักษณะไหน เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อไวรอยด์ที่ตรวจสอบได้มีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรอยด์สายพันธุ์เดียวกัน isolate อื่น ๆ ที่มีรายงานอย่างไร โดยกำหนดค่า parameter ให้ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ดังนี้

- การวิเคราะห์ pairwise alignment กำหนดให้ค่า gap opening penalty เท่ากับ 10, gap extension penalty เท่ากับ 0.1

- การวิเคราะห์ multiple sequence alignment กำหนดให้ค่า gap opening penalty เท่ากับ 10, gap extension penalty เท่ากับ 0.2

- กำหนดเลือกค่า DNA weight matrix เป็น IUB และ transition weight เท่ากับ 0.8

- ในการสร้าง phylogenetic tree เลือกใช้วิธีการ Neighbor joining method เนื่องจากเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับการศึกษาความสัมพันธ์ในกลุ่มประชากรระดับชนิดพันธุ์เดียวกันและไม่ต้องการทราบสายการวิวัฒนาการ บรรพบุรุษร่วม และ molecular clock

### เวลาและสถานที่

ระยะเวลา: ตั้งแต่ ตุลาคม ๒๕๕๖ ถึงกันยายน ๒๕๕๘ รวม ๒ ปี

สถานที่วิจัย : ๑. กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

## ๒. โรื่องุ่นจังหวัดสระบุรีและนครราชสีมา

### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### ๑. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรอยด์ที่ก่อให้เกิดโรคในอู่งุ่น

ได้ข้อมูลทางชีววิทยา การเข้าทำลาย การแพร่กระจายโรค ลักษณะอาการ รวมถึงความเสียหายที่เกิดกับพืช ของเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2

๑.๑ ปัจจุบันมีรายงานว่าเชื้อไวรอยด์ชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการโรคเฉพาะในอู่งุ่นเท่านั้น ลักษณะอาการโดยทั่วไปคือ ใบจะมีอาการจุดเหลือง หรืออาจจะเป็นลักษณะจุดหรือกระสีเหลือง กระจายทั่วไปตามเส้นใบ ซึ่งลักษณะอาการจะขึ้นกับสภาพอากาศ หากอาการโรครุนแรงจะส่งผลให้ใบพืชที่แสดงอาการมีระดับการสังเคราะห์แสงลดลงซึ่งส่งผลโดยตรงกับอัตราการเจริญของพืช รวมถึงปริมาณและคุณภาพของผลผลิตด้วย

๑.๒ เชื้อสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางบาดแผลจากอุปกรณ์การเกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อ รวมถึงส่วนของกิ่งหรือท่อนพันธุ์ ในขณะที่ปัจจุบันยังไม่ทราบเชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์และละอองเกสรได้หรือไม่

๑.๓ ประเทศที่มีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ได้แก่ ประเทศออสเตรเลีย จีน เยอรมนี และสหรัฐอเมริกา รวมถึงประเทศไทยด้วย

#### ๒. ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2

โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) และความรู้ทาง bioinformatics โดยวิธีการ multiple sequences alignment ร่วมกับ โปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และโปรแกรม FastPCR version 3.7.53 (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 โดยนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว คือ คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 โดยในขั้นนี้ได้ไพรเมอร์ออกแบบใหม่มาจำนวนทั้งสิ้น 3 คู่ ได้แก่ GYSVd1 GYSVd2 (upper) และ GYSVd2 (lower) โดยมีรายละเอียดตามวิธีการทดลอง หัวข้อ ๕.๒

#### ๓. สํารวจและเก็บตัวอย่างโรคไวรอยด์อู่งุ่น

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคในโรื่องุ่นพบ ใบพืชที่แสดงอาการใบมีจุดเหลืองกระจายทั่วไป (ภาพที่ 1) และพบลักษณะอาการใบมีจุดประกลม (mottling) (ภาพที่ 2) ในโรื่องุ่นในพื้นที่ อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี อำเภopakช่อง และ วังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ได้เก็บตัวอย่างอู่งุ่นที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าวจำนวน 20 ตัวอย่าง มาทดสอบต่อในห้องปฏิบัติการ





ภาพที่ 1 ลักษณะอาการใบองุ่นมีจุดเหลืองกระจายทั่วไปเนื่องจากเชื้อ GYSVd



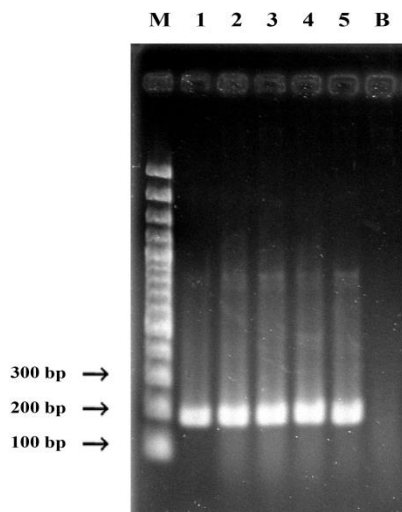
ภาพที่ 2 ลักษณะอาการใบองุ่นมีจุดประกลม (mottling)

#### ๔. ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบองุ่น

ทดสอบหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบองุ่น โดยอาศัยการตรวจหายีน *nadh* ในพืช ซึ่งยีน *nadh* เป็น “Housekeeping gene” สามารถตรวจพบได้ในทุกช่วงอายุและทุกส่วนอวัยวะของพืช ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดในการตรวจคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

โดยการใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) กับคู่ไพรเมอร์ *Nad* พบว่าวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ วิธี CTAB method เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพดีเยี่ยม ได้อาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ที่มีคุณภาพดี ไม่มีโปรตีนและสารเคมีที่จะไปยับยั้งปฏิกิริยา RT-PCR

(inhibitor) ตกค้าง ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 188 คู่เบส (ภาพที่ 3) ดังนั้นวิธีการ CTAB method จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมต่อการสกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อใบองุ่น



ภาพที่ 3 ผลการตรวจติดตามยีน *nadh* โดยคู่ไพรเมอร์ Nad ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 188 คู่เบส

M = 100 bps DNA Ladder

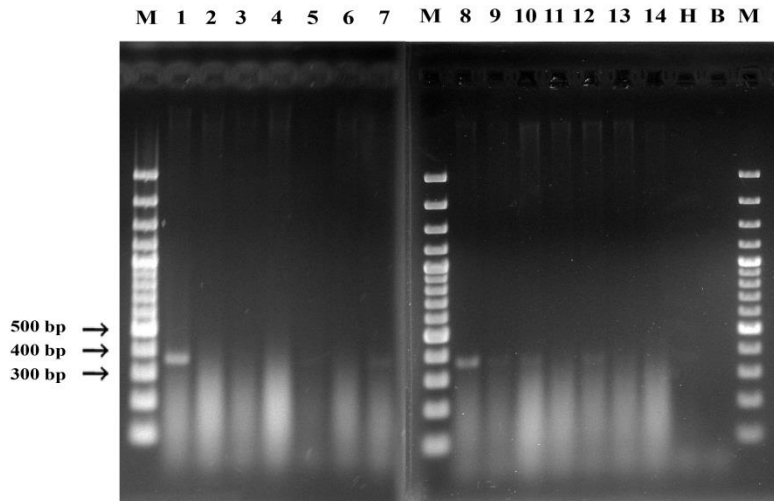
1-5 = อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบองุ่น 5 ตัวอย่าง

B = buffer

#### ๕. การทดสอบตรวจเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ด้วยวิธีการ RT-PCR

จากผลการทดสอบตรวจหาเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 กับตัวอย่างใบองุ่นทั้ง 20 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อไวรอยด์ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ cv218 และ hv219, GYSVd1, GYSVd2 (upper) และ GYSVd2 (lower) ผลพบว่ามีเพียง 2 คู่ไพรเมอร์เท่านั้นที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์ โดยมีขนาดประมาณ 370 นิวคลีโอไทด์ คือ คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) (ภาพที่ 4 และ 5) ในขณะที่ไพรเมอร์ GYSVd2 (lower) และ คู่ไพรเมอร์ cv218 และ hv219 ไม่พบแถบดีเอ็นเอใด ๆ ปรากฏ (ภาพที่ 6 และ 7)

จากผลการตรวจตัวอย่างใบองุ่นจำนวน 20 ตัวอย่าง พบเชื้อ GYSVd-1 จำนวน 6 ตัวอย่าง และ GYSVd-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง



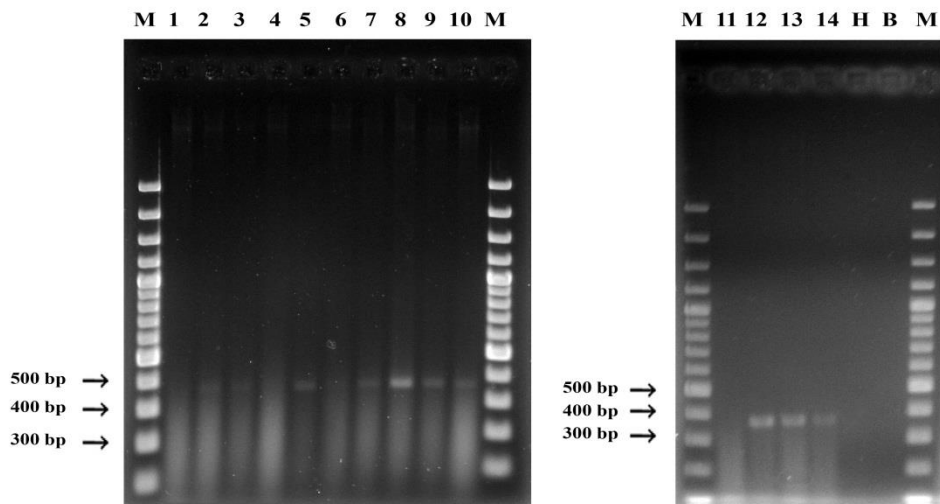
ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบเชื้อ GYSVd-1 โดยคู่ไพรเมอร์ GYSVd1 ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 คู่เบส

M = 100 bps DNA Ladder

1-14 = อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบองุ่น 14 ตัวอย่าง

H = พืชปกติ

B = buffer



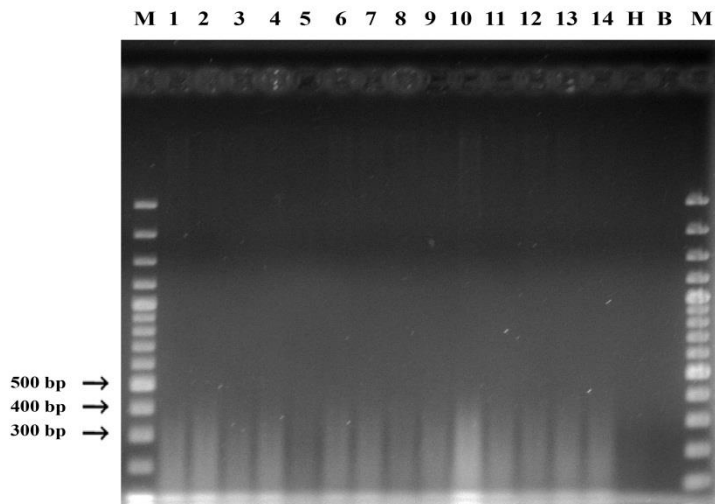
ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบเชื้อ GYSVd-2 โดยคู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (upper) ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 คู่เบส

M = 100 bps DNA Ladder

1-14 = อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบองุ่น 14 ตัวอย่าง

H = พืชปกติ

B = buffer



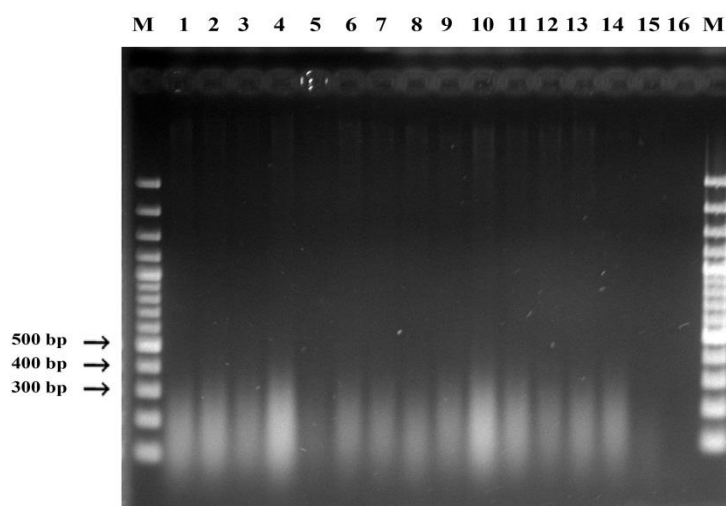
ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบเชื้อ GYSVd-2 โดยคู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (lower) ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาด 370 คู่เบส

M = 100 bps DNA Ladder

1-14 = อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบงู่น 14 ตัวอย่าง

H = ฟิชปกติ

B = buffer



ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบเชื้อ GYSVd ทั้ง 2 ชนิด โดยคู่ไพรเมอร์ cv218 และ hv219 ไม่พบแถบ ดีเอ็นเอขนาด 370 คู่เบส

M = 100 bps DNA Ladder

1-14 = อาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบองุ่น 14 ตัวอย่าง

H = พีชปกติ

B = buffer

## ๖. หาและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย bioinformatics เมื่อมีการตรวจพบเชื้อ

### ๖.๑ วิเคราะห์จำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม Blastn

เมื่อนำผลผลิต RT-PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ GYSVd1 มีขนาดตั้งแต่ 353-389 นิวคลีโอไทด์ และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ GYSVd2 (upper) มีขนาดตั้งแต่ 362-365 นิวคลีโอไทด์ โดยเมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยโปรแกรม Blastn ใน GenBank แล้วพบว่า แถบดีเอ็นเอทั้ง 2 มีความเหมือนกันกับเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) ตามลำดับ โดยเชื้อ GYSVd-1 มีค่า Identities อยู่ระหว่าง 93-99% มีค่า Score อยู่ระหว่าง 555-671 bits และมีค่า Expect value อยู่ระหว่าง  $2e-154$  ถึง 0.0 (ภาพที่ 8) ส่วนเชื้อ GYSVd-2 มีค่า Identities อยู่ระหว่าง 98-99% มีค่า Score อยู่ระหว่าง 632-656 bits และมีค่า Expect value อยู่ระหว่าง  $9e-178$  ถึง 0.0 (ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นพิสูจน์ว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว

(หมายเหตุ: % identity เป็นค่าบอกระดับความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ สำหรับเชื้อไวรอยด์ จะอยู่ที่ระดับตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไปจึงจะถือว่าเป็นเชื้อไวรอยด์ชนิดเดียวกัน, ค่า score เป็นค่าที่เกิดจากการคำนวณเมทริกของโปรแกรมซึ่งจะเปลี่ยนแปลงไปตามความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเปรียบเทียบ โดยปกติแล้วจะต้องมีค่ามากกว่า 200 bits จึงจะถือว่ามีความน่าเชื่อถือ, และค่า expect value เป็นค่าที่ได้จากการค้นและเปรียบเทียบข้อมูลของ GenBank โดยที่ค่า expect value จะเป็นค่าที่บอกว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับสิ่งที่เปรียบเทียบมาน้อยแค่ไหน โดยทั่วไปแล้วจะมีค่าเข้าใกล้ศูนย์ และหากมีค่าเป็นศูนย์หมายความว่า เป็นลำดับนิวคลีโอไทด์เดียวกัน)

```
> Grapevine yellow speckle viroid 1 clone Boonmang-1,
complete genome
CGGAUCACUUUCCUGUGGGUUCCUGUGGGUACACCUCGGAAGGCCGCCGCGGAC
CUGCAAAGAAGAAGAUAGGGGCAGAGGGGGAGUGAGCCUCGUCGUCGACGAAG
GGGUGCACUCCAAAGCUCCGAACUGGCGUCGUCGCGCUCUCCUCGGAGCCUCG
CUGCUCUGGGCGGAAGAGUCUUCUGACUUUUCUAGCCUAUUCAGCAUUGCGCU
CUUGAGGCCCGCGCAAACGCGGUUCGUCUGCUGAGGAUGCCUCCGCUAGUCGA
GCGGACUUGGUCUCUUCGCCCCAAAGCCUUBUUCUUBCAACUGAGCUUGUUC
CAACGCGCCCCGCGAGUGGAAUCCCCGGAACCCUGCAAAGAGGUCCU
```

ภาพที่ 8 ลำดับอาร์เอ็นเอของเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 1* ที่ได้จากตัวอย่างพีช

```
> Grapevine yellow speckle viroid 2 clone Poochidpha 16,
complete genome
CGGAUCAUUUUCCUUGUGGUUCCUGUGGUUACACCUCGGAAGGCCUCCGCGGA
CCUGCAGAGAAAAGAAGAAGGGCCAGAGGGGAAUGAGCCUCGUCGUCGACGA
AGGGGUGCAUUCGGAAGAGCUGGCCUGAGCGUCGUCGCGCUUCCCUCGACCGC
ACCGGAGCGCCAGAAAAGGUCCUCGGACUUUCUUCUAUCUCCGAAGUCGGUUU
GAGGCCCGGCGAAACGCGGGCCUGUCUCCUAAGAUGCCUCCGCUAGUCGAGCG
GACUUGGCCUCUUCGCCCCGAGGACCUUUUCUUCUGAUCUUGCUUGUUCCAA
CGAGCCCCGCGAGUGGAAUCCCCGGAACCCCUGCGAAAAAGGGUCCU
```

ภาพที่ 9 ลำดับอาร์เอ็นเอของเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 2* ที่ได้จากตัวอย่างพืช

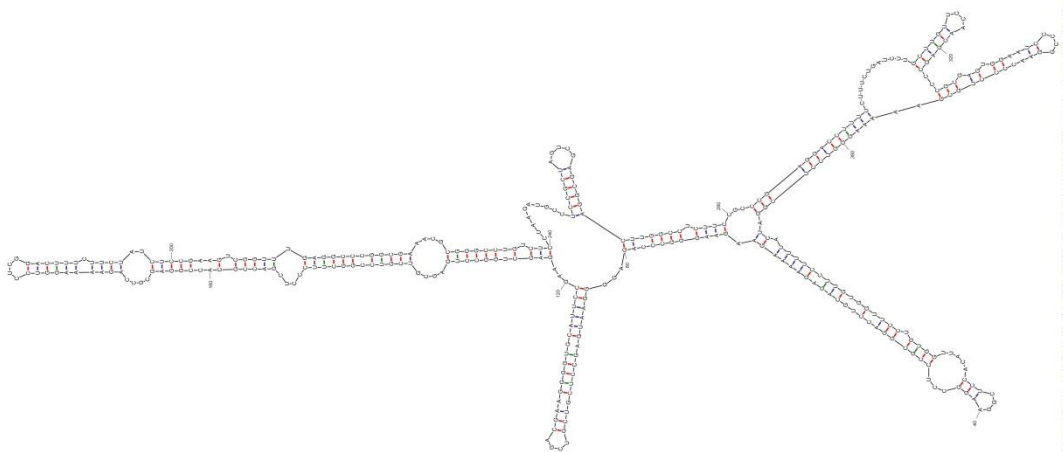
#### ๖.๒ วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิ ด้วยโปรแกรม mfold RNA-Folding-Form

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 มาวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิด้วยโปรแกรม mfold RNA-Folding-Form พบว่า เชื้อ GYSVd-1 ที่พบ สามารถเกิดโครงสร้างทุติยภูมิเป็นแท่ง (rod-like secondary structure) ได้ (ภาพที่ 10) ในขณะที่ เชื้อ GYSVd-2 เกิดโครงสร้างทุติยภูมิที่แตกเป็นกิ่งก้านได้ (branched secondary structure) (ภาพที่ 10) ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่จำเพาะของเชื้อไวรอยด์ที่ปกติจะสามารถเกิดโครงสร้างดังกล่าวได้ จึงเป็นการยืนยันว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้นั้นเป็นเชื้อไวรอยด์จริง



dG = -148.90 [Initially -149.90] GYSVd 1 clone Poochidpha-16, complete genome

ภาพที่ 10 โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 1*



dG = -141.24 [Initially -148.70] GYSVd 2 clone Poochidpha 16, complete genome

ภาพที่ 11 โครงสร้างทุติยภูมิของเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 2*

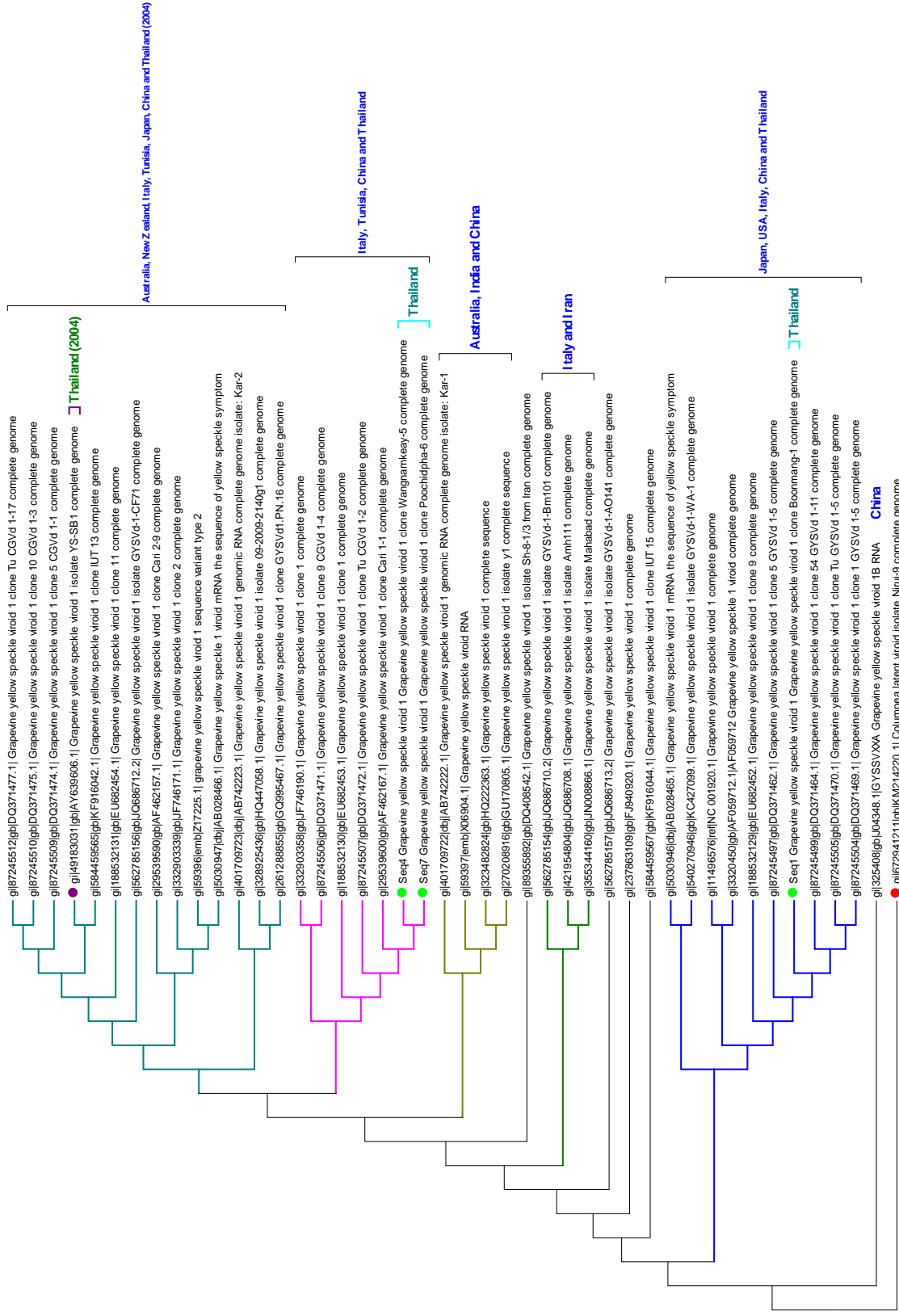
จากผลการทดสอบพบว่าคู่ไพรเมอร์ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ GYSVd 1 และ GYSVd 2 กับตัวอย่างใบองุ่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่คู่ไพรเมอร์เดิมที่เคยมีการรายงานไว้ คือ cV218 และ hV219 (Hannok, 2004) ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้

นอกจากนี้ เนื่องจากเชื้อ GYSVd-2 (*Grapevine yellow speckle viroid 2*) ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย ดังนั้นการสำรวจและตรวจวินิจฉัยโรคไวรอยด์ในองุ่นในครั้งนี้ จึงเป็นรายงานการตรวจพบเชื้อ GYSVd-2 เป็นครั้งแรกในประเทศไทย

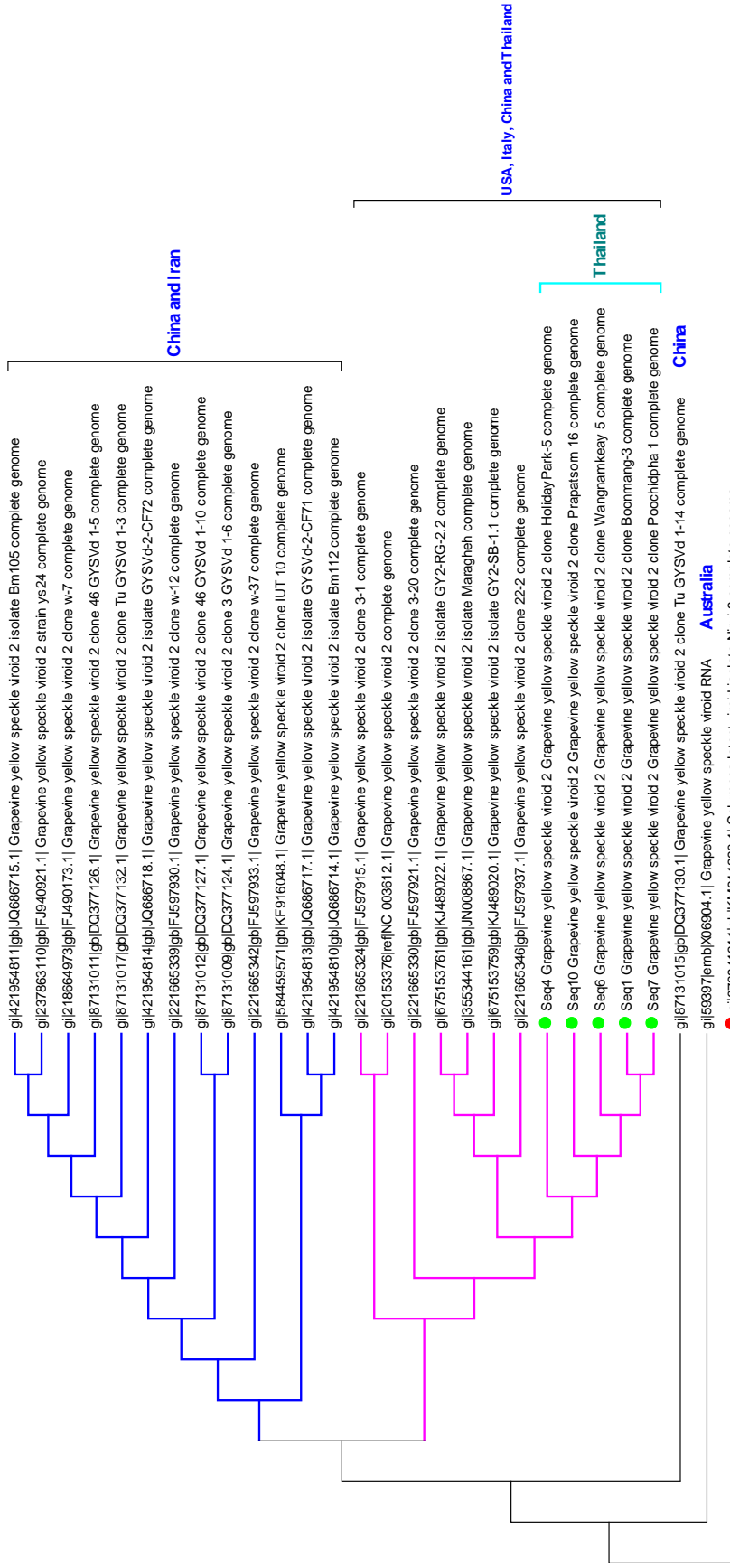
#### ๖.๓ วิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2

จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด คือ *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) ที่มีรายงานทั้งหมดใน NCBI ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW) พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-1 ได้เป็น 5 กลุ่ม (ภาพที่ 12) และสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-2 ได้เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 13)





ภาพที่ 12 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-1 ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW)



ภาพที่ 13 การจัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-2 ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW)

ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-1 โดยการทำให้ Phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้เป็น 5 กลุ่มหลัก (ภาพที่ 12) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อ GYSVd-1 ที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ เครือรัฐออสเตรเลีย, นิวซีแลนด์, สาธารณรัฐอิตาลี, สาธารณรัฐตุนิเซีย, ญี่ปุ่น, สาธารณรัฐประชาชนจีน และประเทศไทยซึ่งเคยมีรายงานตรวจพบในปี พ.ศ. 2547 (isolate YS-SB1: (accession number AY639606))

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สาธารณรัฐอิตาลี, สาธารณรัฐตุนิเซีย และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ เครือรัฐออสเตรเลีย, สาธารณรัฐอินเดีย และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

และกลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ ญี่ปุ่น, สหรัฐอเมริกา, สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

พบว่าเชื้อ GYSVd-1 ทั้ง 6 isolate ใหม่ จัดจำแนกอยู่กลุ่มที่ 2 และ 5 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่มีรายงานในประเทศ ญี่ปุ่น, สหรัฐอเมริกา, สาธารณรัฐอิตาลี, สาธารณรัฐตุนิเซีย และ สาธารณรัฐประชาชนจีน แต่ไม่ได้ถูกจัดจำแนกร่วมกลุ่มเดียวกันกับ isolate YS-SB1 ซึ่งมีรายงานการตรวจพบในปี พ.ศ. 2547 (Hannok and Reanwarakorn, 2005) ซึ่งถูกจัดจำแนกในกลุ่มที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ GYSVd-1 ที่ตรวจพบน่าจะติดเข้ามากับท่อนพันธุ์งุ่นนำเข้าจากคนละแหล่งประเทศกัน และอาจด้วยเหตุผลนี้เองที่เป็นสาเหตุให้คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 (Hannok, 2004) ไม่สามารถตรวจสอบพบเชื้อ GYSVd-1 isolate ใหม่ได้

นอกจากนี้จากการที่ผลการจัดจำแนก GYSVd-1 6 isolate ใหม่ มีการกระจายตัวแบ่งเป็น 2 กลุ่ม จึงมีความเป็นไปได้ยิ่งกว่าปัจจุบันพื้นที่ปลูกองุ่นในประเทศมีการปนเปื้อนเชื้อ GYSVd-1 จากการนำเข้าท่อนพันธุ์จากแหล่งระบาดของโรคมากกว่า 3 แหล่ง

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-2 โดยการทำให้ Phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่มหลัก (ภาพที่ 13) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อ GYSVd-2 ที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สาธารณรัฐประชาชนจีน และ สาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

และกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สหรัฐอเมริกา, สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

พบว่าเชื้อ GYSVd-2 ทั้ง 11 isolate ใหม่ จัดจำแนกอยู่กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่มีรายงานในประเทศ สหรัฐอเมริกา, สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐประชาชนจีน โดยเชื้อ isolate ใหม่ทั้งหมดมีระดับความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกันมาก แสดงให้เห็นว่า GYSVd-2 น่าจะมีการปนเปื้อนติดเข้ามา กับท่อนพันธุ์อุนุ่นนำเข้าเพียงครั้งเดียวจากแหล่งระบาดแหล่งเดียวกัน (กลุ่มที่ 2) แต่ไม่ได้ติดปนเปื้อนจากแหล่งระบาดในประเทศกลุ่มที่ 1 โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ประเทศสาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์อุนุ่นทั้ง 2 ชนิดนี้ อาจสามารถช่วยชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของปัญหาการปนเปื้อนเชื้อไวรอยด์และไวรัสสาเหตุโรคอุนุ่นที่อาจติดมากับท่อนพันธุ์อุนุ่นที่นำเข้าได้ เนื่องจากปัจจุบันท่อนพันธุ์อุนุ่นมีสถานภาพตามพระราชบัญญัติกักพืช เป็นเพียง “สิ่งไม่ต้องห้าม” จึงไม่ได้มีข้อกำหนดหรือเงื่อนไขพิเศษใด ๆ ก่อนการนำเข้า ซึ่งท่อนพันธุ์อุนุ่นนำเข้าที่ไม่ได้ผ่านการตรวจสอบรับรองการปลอดเชื้อสาเหตุโรคก่อนการนำเข้าจะมีความเสี่ยงอย่างมากที่จะทำให้เชื้อสาเหตุโรพืชดังกล่าวติดเข้าตั้งรกราก (establish) และสร้างความเสียหายให้กับประเทศไทยได้ ดังนั้นการแก้ไขกฎหมาย ข้อกำหนด เงื่อนไขการนำเข้า ส่วนขยายพันธุ์อุนุ่นจึงมีความจำเป็น เพื่อที่จะทำให้สามารถดำเนินการควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของโรพืชร้ายแรงต่าง ๆ ได้อย่างทันท่วงที

#### ๗. การปลูกเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 บนพืชทดสอบด้วยวิธีกล

ผลการปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ gynura และมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ด้วยวิธีกลพบว่า ทั้งเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ไม่สามารถก่อให้เกิดโรคบนพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวได้ ซึ่งได้ทำการตรวจสอบยืนยันด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการใช้คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) แล้ว

#### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรค grapevine yellow speckle disease ในพื้นที่ปลูกอุนุ่น จังหวัดสระบุรีและนครราชสีมา ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์และมีนาคม ปี 2557 ตรวจพบเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) โดยใช้วิธีการ CTAB method ในการสกัดอาร์เอ็นเอ ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อของใบอุนุ่น และตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยอาศัยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด จำนวน 2 คู่ไพรเมอร์ คือ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) โดยสามารถตรวจจำแนกตัวอย่างพบเชื้อ GYSVd-1 จำนวน 6 ตัวอย่าง โดยมีขนาดตั้งแต่ 353-389 นิวคลีโอไทด์ และพบเชื้อ GYSVd-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง โดยมีขนาดตั้งแต่ 362-365 นิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างใบอุนุ่นทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง ซึ่งการสำรวจในครั้งนี้เป็นการตรวจพบเชื้อ GYSVd-2 ครั้งแรกในประเทศไทย

#### เอกสารอ้างอิง

- คณิงนิตย์ เจริญวรการ. 2556. **โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส (Viroid Disease of Plants).** ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 164 หน้า.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภานัน. 2548. **การตรวจสอบเชื้อไวรัสในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.
- วรลักษณ์ รักข์แดง. 2545. **การตรวจสอบเชื้อไวรัสในองุ่น.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 95 หน้า.
- Fristch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 186 p.
- Hannok, P. 2004. **Survey of Grapevine yellow speckle viroid in Thailand.** Thesis (M.S. (Agricultural Biotechnology)), Kasetsart University.
- Hannok, P. and K. Reanwarakorn. 2005. **cDNA probe for Grapevine yellow speckle viroid Detection.** *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 39: 46-52.
- Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. **Viroids.** Science Publishers, Inc., USA. P. 370.
- Harris, P.S. and I.A. Browning. 1980. The effects of temperature and light on the symptom expression and viroid concentration in tomato of a severe strain of *Potato spindle tuber viroid*. *Potato Research.* 23(1): 85-93.
- Li, S.F., R. Guo, S. Peng and T. Sano. 2007. **Grapevine yellow speckle viroid 1 and Grapevine yellow speckle viroid 2 Isolates From China.** *Journal of Plant Pathology.* 89: S72 p.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. "Preparation of Plasmid DNA by Small-scale Boiling Lysis." **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Vol. 1. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 1.44-1.46.
- Taylor, R.H. and R.C. Woodham. 1972. Grapevine yellow speckle - a newly recognized graft-transmissible disease of Vitis. **Australian Journal of Agricultural Research.** 23: 447-452.
- Thompson, J.R., S. Wetzal, M.M. Klerks, D. Vaskova, C.D. Schoen, J. Spak and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry

viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. **Journal of Virological Methods.** 111: 85-93.