รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย :
วิจัยและพัฒนามาตรการสุขอนามัยพืชและการเฝ้าระวังศัตรูพืชเพื่อการ
นำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

2. โครงการวิจัย :
วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีว
โมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

กิจกรรมที่ 1 :
การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร

1. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : **การตรวจแบคทีเรีย** *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* **จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยเทคนคิ** Real time PCR

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* from corn seeds import from United States of America by Real time PCR

2. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : **ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล**
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : **ทิพวรรณ กันหาญาติ**
รุ่งนภา ทองเครื่ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ชลธิชา รักใคร่
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. บทคัดย่อ

โรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือ โรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) โรคที่สำคัญของข้าวโพดและเป็นศัตรูกักกันพืชของประเทศไทย เชื้อสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีแหล่งกำาเนิดดั้งเดิมและระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์ (seed

transmission) ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา ทำให้มีความเสี่ยงที่แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ด้วยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศ โดยการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นดีเอ็นเอของเชื้อที่สั่งสังเคราะห์บางส่วนของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เพื่อนำมาเป็น DNA positive control การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cmn probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความไว พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 50 pg/ ปฏิกิริยา ผลการสุ่มตรวจเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาด้วยวธี Real time PCR ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ในตัวอย่างที่ตรวจ

Abstract

4. คำนำ

ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตข้าวโพดที่สำคัญของภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีพื้นที่ปลูกประมาณ 7 ล้านไร่ ประเทศไทยสั่งนำเข้าเมล็ดข้าวโพดเพื่อการบริโภคและใช้เป็นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ เพื่อการผลิตเมล็ดพันธุ์ลูกผสม สำหรับใช้ในประเทศและส่งออกไปยังประเทศต่างๆ โดยในปี 2556 มีปริมาณการนำเข้า ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ จำนวน 182,174,288 กิโลกรัม/ปี มูลค่าการนำเข้า 751,421,853 บาท มีปริมาณการส่งออกข้าวโพด 561,133,133 กิโลกรัมต่อปี มูลค่าการส่งออกประมาณ 4,138,610,061 ล้านบาท (ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร) จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ทำให้มีความเสี่ยงในการเป็นเส้นทาง (pathway) ของศัตรูพืชกักกันที่สำคัญที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ โรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือ โรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) โรคที่สำคัญของข้าวโพดและเป็นศัตรูกักกันพืชของประเทศไทย เชื้อสาเหตุเกิดจากแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีแหล่งกำเนิดดั้งเดิมในประเทศสหรัฐอเมริกา พบระบาดอย่างกว้างขวางในประเทศสหรัฐอเมริกา สามารถถ่ายทอดได้ทางเมล็ดพันธุ์ (seed transmission) ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์จากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีมูลค่าการนำเข้า 85,984,962 บาท ทำให้มีความเสี่ยงที่แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้ ดังนั้นการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพจึงมีความจำเป็นที่ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรียศัตรูกักกันเพื่อป้องกันไม่ให้แบคทีเรียศัตรูกักกันเข้ามาในประเทศไทย การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง สามารถตรวจหาแบคทีเรียพบในปริมาณน้อย เป็นที่ยอมรับจากประเทศนำเข้า และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าจากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าได้ การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskeksis* สาเหตุโรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) ของข้าวโพด ได้มีการพัฒนาโดย Gross and Vidaver (1979) ได้รายงานการใช้อาหารที่เหมาะสม semi-selective medium CNS ในการแยกแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากตัวอย่างพืชและดิน โดยจะได้แบคทีเรียโคโลนีสีเหลืองอมส้ม มีเมือก ขอบเรียบ เป็นประกาย โคโลนีมีผิวคล้ายเนย มีขนาด 4 มม.หลังจาก 6 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส Pastrik and Rainey (1999) ได้ศึกษาการจัดจำแนกและความแตกต่างของแบคทีเรียในกลุ่ม *C. michiganensis* species โดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ทำให้ได้ primer ที่เฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรียในกลุ่ม *C. michiganensis* โดยสามารถแยกความแตกต่างของ 5 ชนิดได้ด้วยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจง *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้ขนาด 502 bp, *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* ขนาด 210 bp, *C. michiganensis* subsp. *insidiosus* ขนาด 393 bp, *C. michiganensis* subsp. *tessellarius* ขนาด 587 bp และ *C.*

michiganensis subsp. *nebraskensis* ขนาด 393 bp .Ye et.al. (2014) ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จากเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้า โดยได้พัฒนาวิธี nested PCR ใช้ primer CM1/CM4 และ PSM1/CM3 พบว่าสามารถตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ระดับดีเอ็นเอในปริมาณต่ำสุดที่ตรวจได้ที่ 8 fg และในระดับเซลล์แบคทีเรียได้ 6.8 CFU และมีความไวในการตรวจมากกว่าเทคนิค PCR ด้วย primer PSM1/CM3 ผลจากการสุ่มตรวจเมล็ดพันธุ์ 100 เมล็ดที่นำเข้ามาจากสหรัฐอเมริกา วิธี nested PCR สามารถตรวจพบ 24% ส่วนเทคนิค PCR ตรวจได้เพียง 8% เท่านั้น ซึ่งวิธีการตรวจสอบสามารถใช้เป็นวิธีการประจำในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp *nebraskensis* จากตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดนำเข้า เทคนิค Real time PCR เป็นเทคนิคที่พัฒนาขึ้นมาจากข้อจำกัดของเทคนิค PCR (Polymerase chain reaction) ทำให้สามารถตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ (Quantitative) เห็น ผลได้แบบทันที (real time & on line) บนหน้าจอคอมพิวเตอร์ (Higuchi *et al*., 1992) ในขณะที่ เทคนิค PCR ไม่สามารถวิเคราะห์เชิงปริมาณได้ และการวิเคราะห์ผลต้องทำในแผ่นวุ้นใช้เวลานานและ ย้อมด้วยสาร ethidium bromide ที่อันตราย (Reischl and Kochanowski, 1999) เทคนิค Real time PCR เป็นการพัฒนานำเทคโนโลยี 2 ส่วน ได้แก่ การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจหาดีเอ็นเอในสารละลายโดยใช้สารเรืองแสง (Fluorescence reporters) ต่างๆ และการใช้เครื่อง thermocycler ซึ่งเป็นเครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนดมารวมกันเป็นเครื่อง Real time themocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของชิ้นดีเอ็นเอ และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดขึ้น ณ เวลานั้นๆ (Higuchi *et al*., 1992) Gudmestad *et al*. (2004) ได้มีการออกแบบไพรเมอร์จากยีน cellulaseA (CelA) gene sequence เพื่อใช้กับเทคนิค Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อรับรองหัวพันธุ์ในอุตสาหกรรมการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในประเทศสหรัฐอเมริกา ไพรเมอร์ CelA มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มีความไวในการตรวจมากกว่าไพรเมอร์อื่น ได้แก่ CMS50/72a โดยสามารถตรวจได้ในระดับ 10 เซลล์/ml การตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยเทคนิค Real time PCR ด้วยไพรเมอร์ CelA เป็นวิธีการที่ให้ผลการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ แม่นยำ และรวดเร็ว

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอ

4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ

5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง

6. ตู้อบ

7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

8. เครื่องชั่ง

9. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra® และ LightCycler480)

10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR และ real time PCR

11. เมล็ดข้าวโพด

-

วิธีการ

1. การขออนุญาตนำเข้าแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศ ไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบ พก. 1) พร้อมเสนอข้อมูลการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัยเสนอต่อคณะอนุกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้วจึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

2. การคัดเลือก specific primer

สืบค้นข้อมูล primer ที่มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจโรคเหี่ยว (Goss's Bacterial Wilt of corn) หรือโรคใบไหม้ (Leaf Blight of corn) ได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* คัดเลือก primer จากนั้นนำลำดับเบสของ primer ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

3. การสกัด genomic DNA และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

การสกัด genomic DNA

การแยก genomic DNA แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้แบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป 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 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 นาทีเติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วย เครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บ ตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอนเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ลายตะกอนDNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอนเอ ที่ช่วง คลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อ นำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR

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

ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เป็นการทดสอบ primer ที่สังเคราะห์ไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA เชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีรายงานทำให้เกิดโรคในข้าวโพด ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และทดสอบความไวในการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (sensitivity) ของ primer โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้ จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม

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

ทำการสุ่มตัวอย่างเมล็ดพันธุ์ข้าวโพดที่นำเข้าจากด่านตรวจพืชตามวิธีของ ASTA นำมาบดแล้วที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียด นำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 5

นาที เก็บส่วนบนที่เป็นน้ำใสใส่หลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 ml ทิ้งส่วนตะกอน นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับการตรวจเชื้อบนอาหาร semi-selective for *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*

- เวลาและสถานที่

เวลา ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

5. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การขออนุญาตนำเข้าแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*

การขออนุญาตนำเข้าแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏในประเทศไทย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดเตรียมทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบพก.1) พร้อมเสนอข้อมูลต่อคณะอนุกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย แต่เนื่องจากไม่สามารถนำเข้าเชื้อแบคทีเรียเพื่อใช้ในการทดลองได้ การนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นดีเอ็นเอของเชื้อที่สั่งสังเคราะห์บางส่วนของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เพื่อนำมาเป็น DNA positive control รายละเอียดดังนี้

เชื้อแบคทีเรีย	Accession number
C. michiganensis subsp. *nebraskensis* ATCC27794	JX216836
C. michiganensis subsp. *nebraskensis* NCPPB2578	JX216839

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 NCPPB2578เป็น 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* มาวัดความเข้มข้นของดีเอนเอที่ช่วงคลื่น 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, น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ 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)

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

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

จากนั้นดำเนินการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำส่วนบนที่เป็นน้ำใสจากตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่หลอด ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้และเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* (ภาพที่ 4)

1. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศ โดยการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นดีเอ็นเอของเชื้อที่สั่งสังเคราะห์บางส่วนของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จำนวน 1 สายพันธุ์ เพื่อนำมาเป็น DNA positive control

การสืบค้นข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนที่สำคัญของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ใน GenBank เพื่อนำมาออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* พบว่ายีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือ ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic space

การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Clavibacter* spp. และแบคทีเรียอื่นๆ ที่แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าวโพด จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความไว โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม พบว่า สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 50 pg/ ปฏิกิริยา

สุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกาจำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อและตรวจด้วย Real time PCR ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *C.*

michiganensis subsp. *nebraskensis* ผลการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำส่วนบนที่เป็นน้ำใสของเมล็ดข้าวโพดที่นำเข้าจากประเทศสหรัฐอเมริกา 10 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis*

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบชนิดเชื้อแบคทีเรียใบจุดในกล้วยไม้สกุลม็อคคาร่าเพื่อเป็นข้อมูลอ้างอิงแก่นักวิชาการในการทำวิจัยและเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดทำข้อมูลศัตรูพืช

3. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

4. เอกสารอ้างอิง

CAB International. 2007. Crop Protection Compendium 2007 Edition. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

Gross, D.C. and A.K. Vidaver. 1979. A selective medium for isolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts. *Phytopathology* 69: 82-87.

Gudmestad, N.C., I. Mallik, J.S. Pasche, N.R. Anderson and K. Kinzer. 2009. A realtime PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. *Plant Dis*. 93: 649-659.

Higuchi, R., G. Dollinger, P.S. Walsh and R. Griffith.1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* (NY) 10: 413-417.

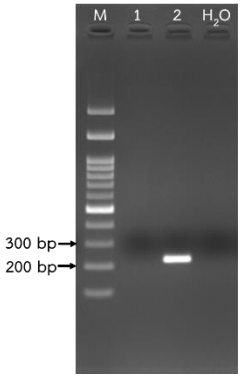
Pastrik, K-H. and F.A. Rainey. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Journal of Phytopathology* 147: 687-693.

Reischi, U. and B. Kochanowski. 1999. Quantitative PCR. In Method in Molecur Medicine: Quantitative PCR Protocol. Edited by Kochanowski B.and Reischi, U. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp 3-30.

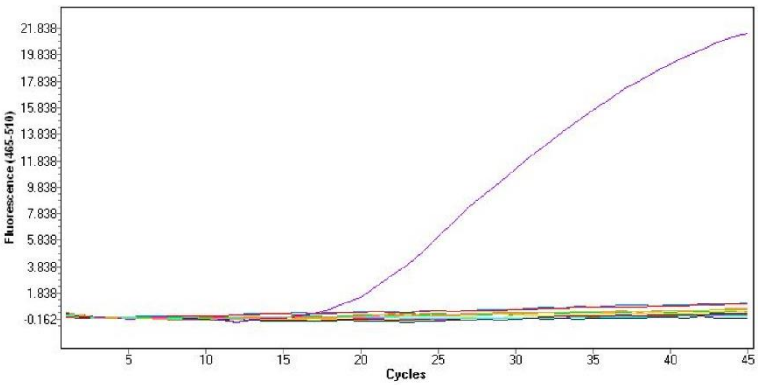
YE Lu-fei, SU Han, ZHOU Guo-liang, YIN Li-ping, LI Xiao-jun, YANG Sai-jun and Y.I. Jian-ping. 2014. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in imported corn by PCR. *ACTA Phytopathological sinica* 44: 121-128.

13. ภาคผนวก

-



ภาพที่ 1 แสดงผลทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ด้วย conventional PCR โดยช่อง M คือ

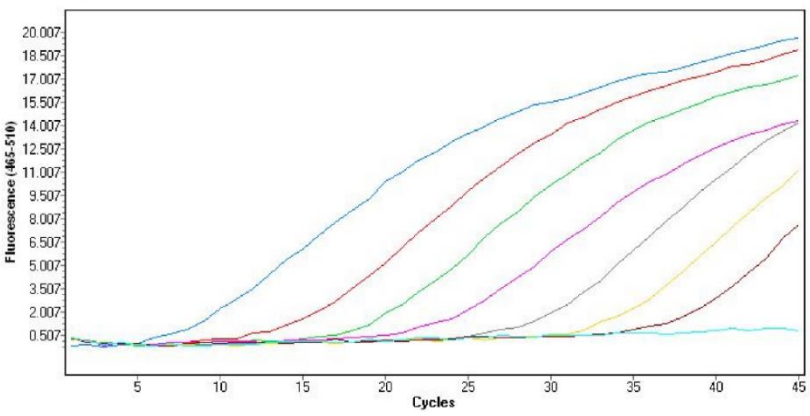


ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน OneMark 100

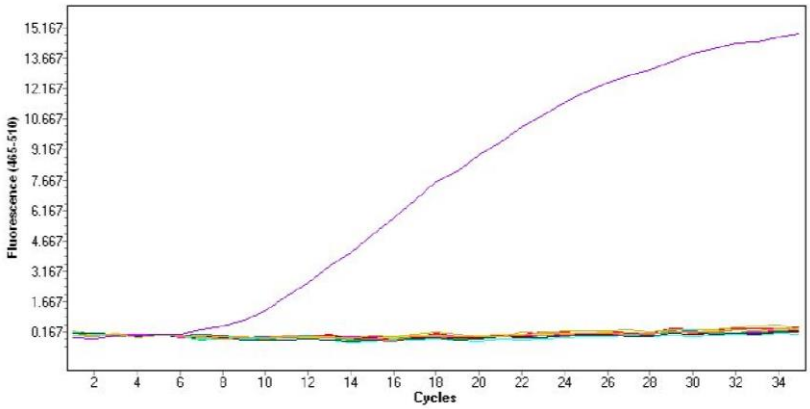
ช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* ATCC27794

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