รายงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. แผนงานวิจัย :

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

กิจกรรม : การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก

3. ชื่อการทดลอง : การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

: Development of *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) Detection Technique in Tomato Seeds

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	: นางสาววาสนา รุ่งสว่าง	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้ร่วมงาน	: นางสาวปรียพรรณ พงศาพิชณ์	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวชลธิชา รักใคร่	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาววันเพ็ญ ศรีชาติ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นายวานิช คำพานิชโสภา มีอำนาจ	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวพรรณิภา เปชัยศรี	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ : *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) เป็นเชื้อไวรอยด์สาเหตุโรคพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งสามารถเข้าทำลายมะเขือเทศและพริกได้ อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดได้อีกด้วย ประเทศคู่ค้าหลายประเทศมีข้อกำหนดให้ไทยตรวจรับรองการส่งออกเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศก่อนการส่งออก และในขณะเดียวกันประเทศไทยก็มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศจากหลาย ๆ ประเทศ ซึ่งบางประเทศก็มีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรอยด์ PCFVd แล้ว ดังนั้น เพื่อเป็นการป้องกันการเข้ามาของเชื้อไวรอยด์ PCFVd ที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศนำเข้า และเพื่อการตรวจรับรองการปลอดจากเชื้อไวรอยด์ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศก่อนการส่งออก จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ โดยมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ โดยการเปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ จำนวน 4 วิธี และ คู่ไพรเมอร์ จำนวน 4 คู่ โดยพิจารณาจากผลของทั้ง 8 กรรมวิธี เปรียบเทียบกัน พบว่า วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่ให้ผลดีที่สุดคือ การสกัดด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการของ Boonham และคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลการ

ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ที่ถูกต้องและคมชัด คือ คู่ไพรเมอร์ NAD, PC2 และ PCFVd และจากการนำขั้นตอนและวิธีการที่ให้ผลการตรวจเชื้อไวรอยด์ที่เหมาะสมข้างต้น ไปใช้ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศบางส่วนที่มีการนำเข้าและส่งออก จำนวน 31 รายการ พบว่า ทั้ง 31 รายการไม่มีเชื้อไวรอยด์ PCFVd ติดมากับเมล็ดเหล่านั้น

Abstract : *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) is the pathogen that the causes of disease. It infected on tomatoes and peppers and the important thing, It transmitted by seed. Many trading partners have required Thailand to inspect the export of tomato seeds before exporting. At the same time, Thailand is importing tomato seeds from many countries, some of which have already reported the detection of PCFVd. Also, prevent the entry of the PCFVd that may be attached to the seed of the tomato imported seeds and certify the tomato seeds that free from the before export. Therefore, this research have the objective for the development of the diagnostic method of *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) in tomato seeds. Comparing between four RNA extraction methods and four primer pairs, considering the results of the eight treatments, it was found that the most effective RNA extraction method was The CTAB extraction, according to Boonham's method, and the primer pair that produced accurate and sharp viroid test results were NAD, PC2 and PCFVd primer pairs. To provide an appropriate viroid test result above. The results were used to detection of the 31 shipments of tomato imported and exported seeds. The results show that whe all of 31 shipments were free from PCFVd attached to the seeds.

6. คำนำ : ประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศส่งออกที่สำคัญ ในปัจจุบันประเทศผู้นำเข้าได้กำหนดมาตรการสุขอนามัยพืช เพื่อเป็นเครื่องมือในการกีดกันทางการค้าโดยอ้างการตรวจพบศัตรูพืชในประเทศผู้ส่งออก และเป็นเหตุผลที่นำไปสู่การกำหนดเงื่อนไขการนำเข้า ทั้งนี้ในปัจจุบันประเทศคู่ค้าหลายประเทศกำหนดเงื่อนไขให้มีการตรวจรับรองเมล็ดมะเขือเทศที่ส่งออกว่าปราศจากเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ซึ่งมีรายงานพบครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2555 หลังจากที่มีรายงานพบในประเทศไทย ประเทศคู่ค้าหลายประเทศได้กำหนดเงื่อนไขให้มีการตรวจรับรองเมล็ดมะเขือเทศที่ส่งออกว่าปราศจากเชื้อ PCFVd เช่นประเทศญี่ปุ่นและประเทศนิวซีแลนด์ ซึ่งการตรวจจะต้องสุ่มตัวอย่างเมล็ดจำนวนมาก (2,000-20,000 เมล็ด) ตามเงื่อนไขของประเทศปลายทาง และวิธีการตรวจต้องใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งมีขั้นตอนยุ่งยาก ใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายสูง จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจที่รวดเร็ว แม่นยำ และมีความไวสูง อีกทั้งสามารถตรวจไวรอยด์ได้หลายชนิด เพื่อให้ทันต่อความต้องการของผู้ส่งออก งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไวรอยด์ PCFVd ในเมล็ดมะเขือเทศด้วยวิธีชีวโมเลกุล เพื่อให้เกิดความรวดเร็ว แม่นยำ และ

ตรวจสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถตรวจพบเชื้อที่ปนเปื้อนในปริมาณน้อยได้ อีกทั้งสามารถตรวจหาไวรอยด์ได้หลายชนิด เพื่อตรวจรับรองการปลอดโรคในเมล็ดพันธุ์ที่ส่งออกและสามารถนำไปปรับใช้กับการตรวจไวรอยด์ที่เป็นศัตรูพืชกักกันในเมล็ดมะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Digital scale, METTLER TOLEDO)
2. เครื่องบดเมล็ดพันธุ์ (Tube Mill Control, IKA®)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (MIKRO 120 centrifuge, Hettich®)
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath, memmert)
5. ตู้แช่แข็ง -30 องศาเซลเซียส (freezer, SANYO)
6. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermocycler, eppendorf)
7. เครื่องแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel Electrophoresis, BIO-RAD)
8. เครื่องถ่ายภาพเจล (Gel documentation, BIO-RAD)
9. เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ สายพันธุ์ Rutgers (สำหรับใช้เป็น negative control และเป็นเมล็ดทดสอบ)
10. ตัวอย่างมะเขือเทศที่มีเชื้อไวรอยด์ *Pepper chat fruit viroid* (สำหรับใช้เป็น positive control)
11. สารเคมีต่าง ๆ ได้แก่

11.1 ชุดสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัดสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอ RNeasy® Plant Mini Kit และ FavorPrep™ Plant RNA Purification Mini Kit

11.2 ชุดเอนไซม์สำหรับเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอแบบ one-step (SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ *Taq* DNA Polymerase)

11.3 สารละลาย General Extraction Buffer (GEB)

11.4 สารละลาย CTAB (2%CTAB, 100Mm Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA, 1.4M NaCl, 1% Na_2SO_3, 2% PVP-40)

11.5 สารละลาย TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0)

11.6 สารละลาย TBE

11.7 Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)

11.8 Isoprapanol

11.9 Lithium chloride

11.10 Ethanol

11.11 สารละลายไพรเมอร์ที่จำเพาะ

11.12 ผงอะกาโรล (agarose gel)

11.13 สารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution)

11.14 สารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน (Thermo Scientific™ GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

วิธีการ

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

2. ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA) จากเมล็ด (seed)

2.1 การเตรียมเมล็ดมะเขือเทศ

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

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

กรรมวิธีที่ 2 คือ seed sap (250 เมล็ด)

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

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

กรรมวิธีที่ 5 คือ seed sap (1,000 เมล็ด)

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

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

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

หมายเหตุ : seed sap คือ สารแขวนลอยเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในสารละลาย GEB

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

หลังจากนั้น นำสารแขวนลอยเมล็ดทั้ง 6 กรรมวิธี ไปดำเนินการสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีการต่าง ๆ

2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการต่าง ๆ จำนวน 4 วิธี ดังต่อไปนี้

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

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

2. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

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

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

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

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

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

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

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

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

2. นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

3. เก็บของเหลวส่วนบน ปริมาตร 600 ไมโครลิตร และเติมสาร 4M LiCl ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ -20 °C นานข้ามคืน

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

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

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

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

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

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

3. ดูดของเหลวส่วนบน (supernatant) ใส่ลงในหลอดไมโครทิวบ์ใหม่ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วเติม 70% ethanol (เย็น) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากัน (vortex mix)

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

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

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

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

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

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

2.2.4 การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1 สารองค์ประกอบในการดำเนินปฏิกิริยาที่ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร ดังนี้

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

3.2 เมื่อเตรียมสารองค์ประกอบเรียบร้อยแล้ว นำไปเพิ่มปริมาณชิ้นยีนเป้าหมายโดยกำหนดโปรแกรมการทำงานดังนี้

3.2.1 โปรแกรมสำหรับคู่ไพรเมอร์ NAD ดังนี้

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

3.2.2 โปรแกรมสำหรับคู่ไพรเมอร์ Pospi1 ดังนี้

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

ขั้นตอนที่ 9 post-extension ที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 7 นาที

3.2.3 โปรแกรมสำหรับคู่ไพรเมอร์ PC2 ดังนี้

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

3.2.4 โปรแกรมสำหรับคู่ไพรเมอร์ PCFVd ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 cDNA synthesis ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 45 นาที
ขั้นตอนที่ 2 pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 3 นาที
ขั้นตอนที่ 3 denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที
ขั้นตอนที่ 4 annealing ที่อุณหภูมิ 58 °C เป็นเวลา 45 วินาที
ขั้นตอนที่ 5 extension ที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 60 วินาที
ทำซ้ำขั้นตอนที่ 3 ถึงขั้นตอนที่ 5 เป็นจำนวน 35 รอบ
ขั้นตอนที่ 6 post-extension ที่อุณหภูมิ 68 °C เป็นเวลา 5 นาที

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

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

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

3.3.3 ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation บันทึกภาพแล้วนำไปวิเคราะห์ผล และส่งตัวอย่างวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

3.3.4 นำผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับในฐานข้อมูลของ GenBank

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

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกภาพถ่ายเจลของผลการตรวจหาเชื้อไวรอยด์ PCFVd โดยการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค RT-PCR แล้วนำมาตรวจสอบผลด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis และดูผลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Documention

2. บันทึกผลการตรวจพบเชื้อไวรอยด์ PCFVd จากการวิเคราะห์ภาพถ่ายเจล

เวลาและสถานที่

เริ่มต้น ตุลาคม 2560 สิ้นสุด กันยายน 2562 (2 ปี)

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. จากการสืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับไวรอยด์ที่เข้าทำลายมะเขือเทศ พบว่าไวรอยด์ที่สามารถก่อโรคในมะเขือเทศได้มีด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), *Tomato apical stunt viroid* (TASVd), *Columnea latent viroid* (CLVd), *Citrus exocotis viroid* (CEVd), *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd), *Mexican papita viroid* (MPVd), *Tomato planta macho viroid* (TPMVd), *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd), *Tomato bunchy top viroid* (TBTVd) และ *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบไวรอยด์ PCFVd เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2554 โดยการสำรวจตัวอย่างมะเขือเทศในพื้นที่ปลูกของเกษตรกรในจังหวัดลำปาง พบมะเขือเทศแสดงอาการต้นแคระแกรน (stunted) อาการไหม้ (necrosis) ใบบิดเบี้ยว (distortion) และสีใบผิดปกติ (discoloration) นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank (Reanwarakorn *et al.*, 2011) โดยไวรอยด์ PCFVd จัดอยู่ในวงศ์ *Pospiviroidae* จีนัส *Pospiviroid* มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) ซึ่งมีขนาดจีโนมประมาณ 348 นิวคลีโอไทด์ พบครั้งแรกในประเทศเนเธอร์แลนด์ ในโรงเรือนที่ปลูกพริกหวาน ซึ่งทำให้ผลผลิตและการเจริญเติบโตลดลง และสามารถถ่ายทอดด้วยวิธีกลและถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ (Verhoeven *et al.*, 2009) การตรวจสอบไวรอยด์ PCFVd ต้องอาศัยเทคนิคด้านชีวโมเลกุล ในปัจจุบันวิธีการที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์สาเหตุโรคพืช มีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ เทคนิค RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) เทคนิค RT-qPCR (Reverse Transcription-

Quantitative Polymerase Chain Reaction) และเทคนิค RT-LAMP (Reverse Transcription-Loop-mediated isothermal amplification) เป็นต้น โดยแต่ละเทคนิควิธีการถูกนำมาปรับใช้และพัฒนาเพื่อให้การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์สาเหตุโรคพืชมีความถูกต้อง รวดเร็ว และแม่นยำมากยิ่งขึ้น ในขณะเดียวกันแต่ละเทคนิควิธีการก็จะมีข้อดี ข้อด้อย และข้อจำกัดที่อาจเหมือนหรือแตกต่างกันออกไป ดังนั้น การทดลองวิจัยในครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีการแบบ conventional RT-PCR ในการตรวจสอบไวรอยด์ PCFVd เมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ เนื่องจากเป็นวิธีการที่ยังคงมีการอ้างถึงในมาตรฐานการตรวจสอบ (standard protocol) ของหลาย ๆ แหล่ง ได้แก่ International Seed Federation (ISF), The International Seed Health Initiative (ISHI), International Standards for Phytosanitary Measures (ISPM) และ EPPO Standards เป็นต้น ซึ่งคู่ไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการตรวจสอบไวรอยด์ PCFVd ตามที่มีรายงานในหลาย ๆ แหล่งนั้นมีด้วยกันหลายไพรเมอร์ โดยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้คู่ไพรเมอร์ จำนวน 4 คู่ (**ตารางที่ 1**) ในการตรวจหาเชื้อไวรอยด์ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ

2. ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้วิธีการที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศมีด้วยกันทั้งหมด 4 วิธีการสกัด ประกอบด้วย การสกัดอาร์เอ็นเอของพืชด้วยสารละลาย CTAB จำนวน 2 วิธี และการสกัดอาร์เอ็นเอของพืชโดยการใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปสำหรับสกัดสารพันธุกรรมแบบอาร์เอ็นเอ จำนวน 2 วิธี จากการตรวจสอบยืนเป้าหมายด้วยคู่ไพรเมอร์ NAD (**ภาพที่ 1**) พบว่า ตัวอย่างทั้ง 8 กรรมวิธีที่สกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศด้วยวิธี CTAB ตามวิธีการของ Boonham (Boonham *et al.*, 2002) ให้ผลการตรวจสอบอาร์เอ็นเอของ *Nad5* gene (NADH dehydrogenase subunit 5) ที่สม่ำเสมอ ปรากฏแถบแบนของยีนเป้าหมายอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าวิธีการสกัดดังกล่าวให้ผลของการสกัดอาร์เอ็นเอของพืชได้อย่างดี

3. เมื่อนำสารละลายอาร์เอ็นเอของทั้ง 8 กรรมวิธีที่สกัดได้จากทั้ง 4 วิธีการ รวมทั้งหมด 32 ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ มาดำเนินการตรวจหาเชื้อไวรอยด์ PCFVd ด้วยคู่ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ Pospi1, คู่ไพรเมอร์ PC2 และ คู่ไพรเมอร์ PCFVd พบว่า อาร์เอ็นเอที่จากการสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002) ปรากฏแถบแบนของยีนเป้าหมายในทั้ง 3 คู่ไพรเมอร์ (**ภาพที่ 2, 3 และ 4**) โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องและชัดเจนคือ คู่ไพรเมอร์ PC2 และ PCFVd (**ภาพที่ 3 และ 4**) ในขณะที่สารละลายอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดในอีก 3 วิธีให้ผลการตรวจหาเชื้อไวรอยด์ PCFVd เป็นบวก (positive result) กับคู่ไพรเมอร์ PC2 และ PCFVd เฉพาะในกรรมวิธี 8 PCFVd-tomato leave (positive control) เท่านั้น (**ภาพที่ 3 และ 4**)

4. นำวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอและคู่ไพรเมอร์ที่ให้ผลการตรวจสอบไวรอยด์ PCFVd ที่ดีที่สุด ได้แก่ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002) และคู่ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ 1.คู่ไพรเมอร์ NAD 2.คู่ไพรเมอร์ PC2 และ 3.คู่ไพรเมอร์ PCFVd มาใช้ในการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อตรวจหาว่ามีเชื้อไวรอยด์ PCFVd ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวหรือไม่ และใช้ในการตรวจรับรองเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศว่าการปลอดจากเชื้อไวรอยด์ PCFVd รวมทั้งสิ้น

จำนวน 31 รายการ (**ตารางที่ 2 และ 3**) พบว่า ผลการตรวจสอบเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศทั้ง 31 รายการนั้นไม่พบเชื้อไวรอยด์ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศดังกล่าว (**ตารางที่ 4**)

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ในหัวข้อเรื่อง การพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ พบว่า วิธีการที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอจากเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002) และการตรวจหาเชื้อไวรอยด์ PCFVd ด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ ได้แก่ คู่ไพรเมอร์ NAD, คู่ไพรเมอร์ PC2 และคู่ไพรเมอร์ PCFVd ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนและคมชัด สามารถนำไปใช้กับงานในห้องปฏิบัติการที่เป็นงานประจำได้อย่างดีและเหมาะสม

10. การนำไปใช้ประโยชน์

สามารถนำขั้นตอนและวิธีการที่ได้จากการงานวิจัยในครั้งนี้ ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อไวรอยด์ PCFVd ที่อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีการนำเข้ามาจากต่างประเทศ และสามารถใช้ในการตรวจรับรองการปลอดจากเชื้อไวรอยด์ PCFVd ในเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศตามเงื่อนไขของประเทศปลายทางได้อีกด้วย

11. คำขอบคุณ

ขอขอบพระคุณ คุณปรียพรรณ พงศาพิชณ์ คุณวันเพ็ญ ศรีชาติ คุณวานิช คำพานิช คุณโสภามี อำนาจ คุณพัชริดา สีหาบุตร คุณเสาวณีย์ เซ๊ะวิเศษ และพี่ ๆ น้อง ๆ กลุ่มงานวินิจฉัยศัตรูพืชกักกัน กลุ่มวิจัยการกักกันพืช ที่มีส่วนร่วมในการทำให้งานวิจัยนี้ดำเนินการได้อย่างดีและสำเร็จลุล่วงในที่สุด และขอขอบคุณคุณณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล กลุ่มวิจัยโรคพืช ที่ให้คำแนะนำและชี้แนะแนวทางในการทำงานวิจัยนี้เป็นอย่างดี

12. เอกสารอ้างอิง

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. **การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย**. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภาควิชา โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ วันเพ็ญ ศรีทองชัย กาญจนา วาระวิชะนี และวันเพ็ญ ศรีชาติ. 2555. **การตรวจติดตามเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ที่ติดเข้ามากับเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่นำเข้าจากต่างประเทศ**. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2555 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. กรมวิชาการเกษตร. หน้า 1859-1889.

ศศิประภา มาราช คนึงนิตย์ เหรียญวรากร สุพัฒน์ อรรถธรรม และรัชนี ฮงประยูร. 2550. ผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้าที่เกิดจากเชื้อ *Columnea latent viroid*. **วารสารโรคพืช**. ปีที่ 21 เล่มที่ 1-2. หน้า 47-60.

Boonham, N., P. Smith, K. Walsh, J. Tame, J. Morris, N. Spence, J. Bennison and I. Barker. 2002. The detection of Tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips using real time fluorescent RT-PCR (TaqMan). **J. Virol. Methods**. 101: 37-48.

Freeman W. M., S. J. Walker and K. E. Vrana. 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. **BioTechniques**. 26(1): 112-22, 124-5.

Jeffries, C. and J. Tina. 2 n.d. 2004. **Protocol for the Diagnosis of Quarantine Organism: *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd)**. Scottish Agricultural Science Agency, East Craigs, Edinburgh, EH 12 8NJ, United Kingdom.

Santos C. F., E. B. Oliveira, M. C. O. Salgado and A. S. Greene. 2002. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for rat mesenteric arterial bed elastas-2, an angiotensin II-forming enzyme. **J Cardiovasc Pharmacol**. 39(5): 628-35.

_____, V. T. Sakai, M. A. Machado, D. N. Schippers, A. S. Greene. 2004. Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. **J Appl Oral Sci**. 12(1): 1-11.

Reanwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnurn. 2011. First report of natural in fection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. **New Disease Reports.** 24, 6.

Menzel, W., Jelkmann, W., and Maiss, E. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. **J. Virol. Methods.** 99: 81-92.

Verhoeven J., Th J., Jansen C. C. C., Roenhorst J.W, Flores R., Peña M. D. 2009. Pepper chat fruit viroid: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus Pospiviroid. **Virus Res.** 144: 209–214.

13. ภาคผนวก

1. องค์ประกอบของสารเคมี

1.1 สารละลาย General Extraction Buffer; 1X GEB

GEB powder (agdia®)	จำนวน	16.5	กรัม
Tween-20	จำนวน	10	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 500 มิลลิลิตร

1.2 สารละลาย 2% CTAB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

10%CTAB	ปริมาตร	8	มิลลิลิตร
1M Tris-HCl pH 8.0	ปริมาตร	4	มิลลิลิตร
0.5M EDTA	ปริมาตร	1.6	มิลลิลิตร
5M NaCl	ปริมาตร	11.2	มิลลิลิตร
1% Na_2SO_3	จำนวน	0.4	กรัม
2% PVP-40	จำนวน	0.8	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 40 มิลลิลิตร

1.3 สารละลาย 5X TBE

Tris base	จำนวน	54	กรัม
Boric acid	จำนวน	27.5	กรัม
0.5M EDTA (pH 8.0)	ปริมาตร	20	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

1.4 สารละลาย TE ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

1M Tris-HCl pH 8.0	ปริมาตร	0.4	มิลลิลิตร
0.5M EDTA (pH 8.0)	ปริมาตร	0.08	มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 40 มิลลิลิตร

ตารางที่ 1 รายละเอียดของแต่ละคู่ไพรเมอร์

Primers	Nucleotides (5’ ---> 3’)	Target	Reference
NAD	Nad5-F: GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT Nad5-R: CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA	*Nad5* gene (NADH dehydrogenase subunit 5)	Menzel *et al.*, 2002
Pospi1	Pospi1-FW: GGG ATC CCC GGG GAA AC	CEVd, CSVd, IrVd-1, MPVd, PCFVd,	Verhoeven *et al.*, 2004

	Pospi1-RE: AGC TTC AGT TGT (T/A)TC CAC CGG GT	PSTVd, TASVd, TCDVd และ TPMVd	ISPM 27 (2015)
PC2	cPC2: TGT TTC WRC DGG GAT TAC TCC TG hPC2: GGG TTT TCA CCC TTC CTT TC	CLVd, MPVd, PSTVd, TASVd, TCDVd, TPMVd	Tangkanchanapas *et al.*, 2005
PCFVd	PCFVd-FW1: GGT CTA GAC CCT TCC TTT CTT CGG GTT TCC PCFVd-RE1: GAA AAC CCT GTT TCA GCG GGG AT	PCFVd	Verhoeven *et al.*, 2009

ตารางที่ 2 รายละเอียดเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ**นำเข้า**ที่ทำการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ PCFVd

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

ตารางที่ 3 รายละเอียดเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศ**ส่งออก**ที่ทำการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ PCFVd

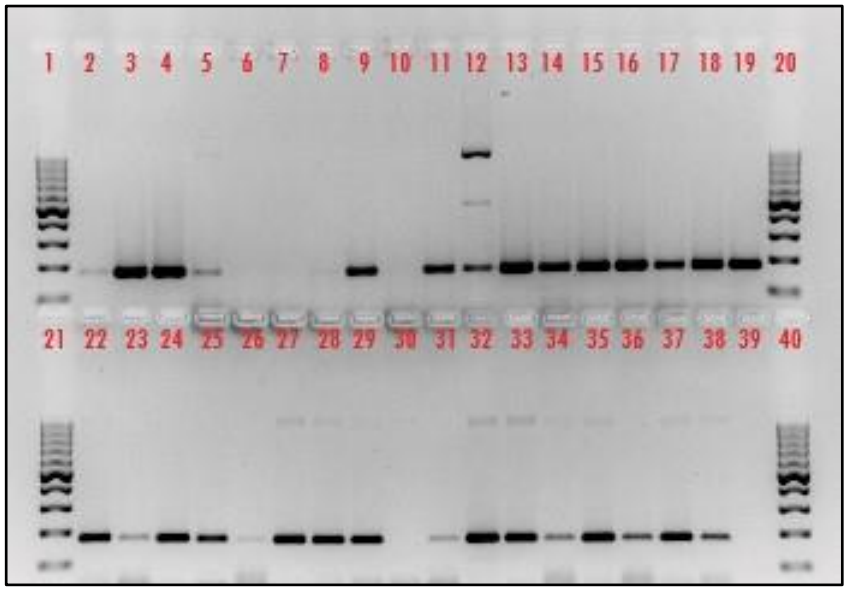
เลขที่รับ	**วันที่**	**บริษัทผู้ส่งออก**	**ประเทศปลายทาง**	**น้ำหนัก**
Ex.906	3 มี.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	South Korea	3.284 กก.
Ex.1104	11 มี.ค. 62	บ.ซีน เมล็ดพันธุ์	South Korea	6.3 กก.
Ex.2579	24 พ.ค. 62	บ.มอนซานโต้ ไทยแลนด์	South Korea	11.90 กก.
Ex.2623	27 พ.ค. 62	บ.สุพรีม โกลด์	South Korea	99.36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

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-RCR โดยคู่ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่

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

Ex.2623	+	-	-	-
Ex.2854	+	-	-	-
Ex.3130	+	-	-	-

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



ภาพที่ 1 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคู่ไพรเมอร์ NAD ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) ทั้ง 4 วิธี ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 2% อะกาโรสเจลผสมกับสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ซึ่งยืนเป้าหมายมีขนาดประมาณ 150 bp

โดยที่ หมายเลข 1, 20, 21 และ 40 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

หมายเลข 2 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปกติ (negative control)

หมายเลข 3 และ 4 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อไวรอยด์ PCFVd (positive control)

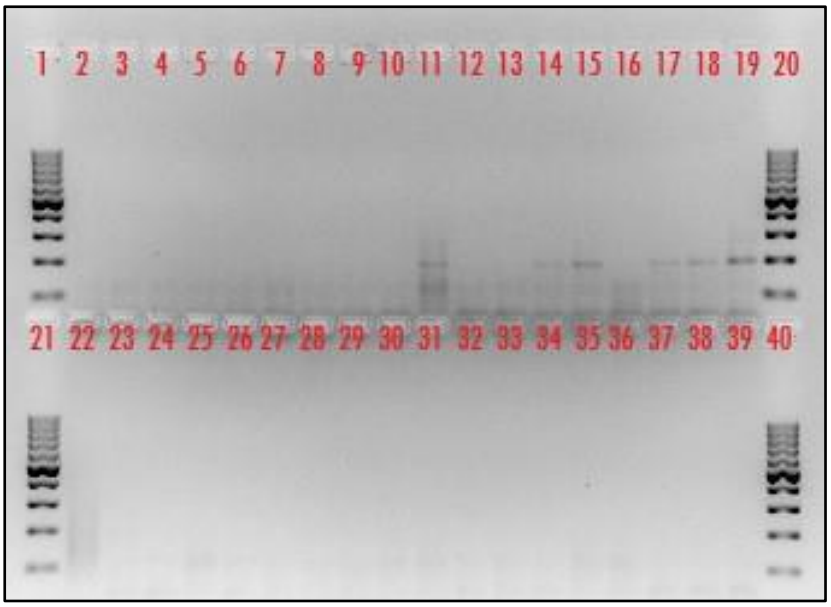
หมายเลข 5-12 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004)

หมายเลข 13-19 และ 22 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002)

หมายเลข 23-30 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN)

หมายเลข 31-38 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)

หมายเลข 39 คือ น้ำ (blank; negative control)



ภาพที่ 2 การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคู่ไพรเมอร์ Pospi1 ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) ทั้ง 4 วิธี ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 2% อะกาโรสเจลผสมกับสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ซึ่งยีนเป้าหมายมีขนาดประมาณ 196-228 bp

โดยที่ หมายเลข 1, 20, 21 และ 40 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

หมายเลข 2 คือ น้ำ (blank; negative control)

หมายเลข 3 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปกติ (negative control)

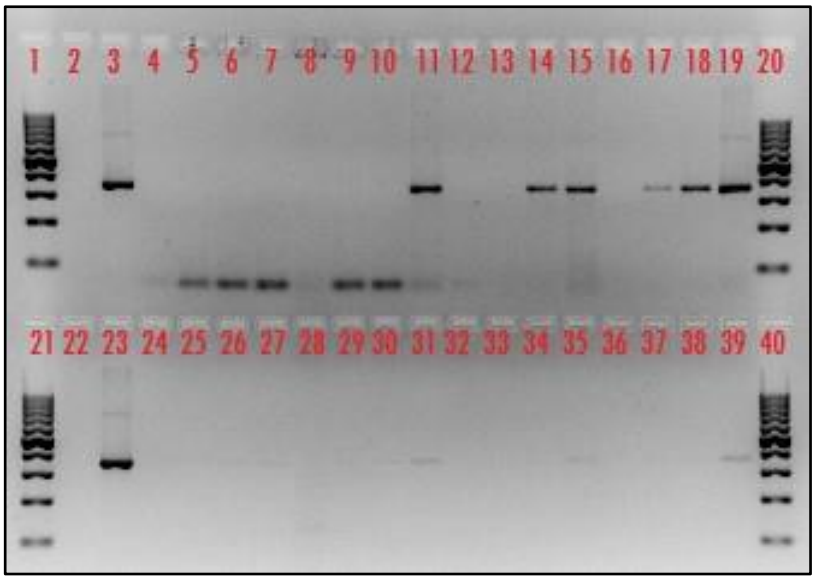
หมายเลข 4-11 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004)

หมายเลข 12-19 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002)

หมายเลข 22 และ 23 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อไวรอยด์ PCFVd (positive control)

หมายเลข 24-31 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN)

หมายเลข 32-39 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)



ภาพที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยคู่ไพรเมอร์ PC2 ในตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่สกัดอาร์เอ็นเอ (total RNA) ทั้ง 4 วิธี ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 2% อะกาโรสเจลผสมกับสารย้อมสีดีเอ็นเอ (RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution) ซึ่งยีนเป้าหมายมีขนาดประมาณ 370 bp

โดยที่ หมายเลข 1, 20, 21 และ 40 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

หมายเลข 2 คือ น้ำ (blank; negative control)

หมายเลข 3 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปกติ (negative control)

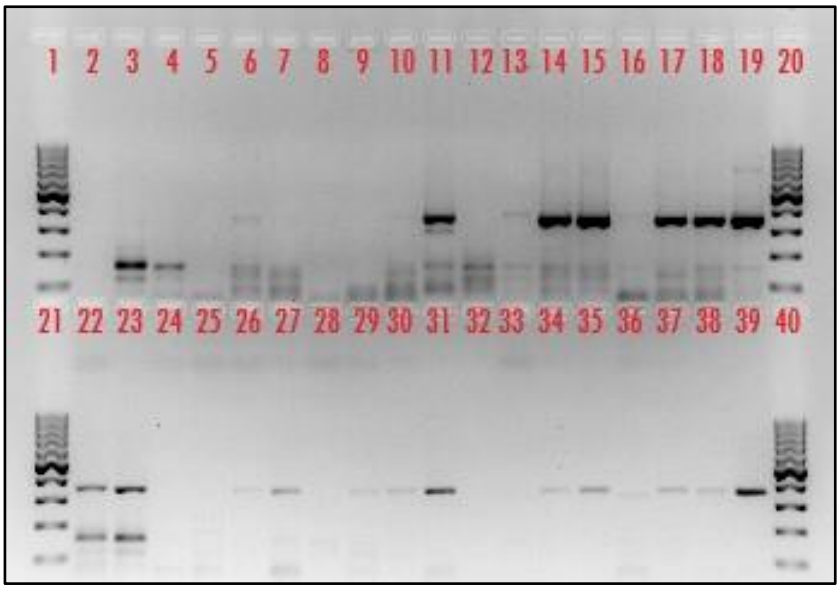
หมายเลข 4-11 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004)

หมายเลข 12-19 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002)

หมายเลข 22 และ 23 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อไวรอยด์ PCFVd (positive control)

หมายเลข 24-31 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN)

หมายเลข 32-39 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)



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

โดยที่ หมายเลข 1, 20, 21 และ 40 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder)

หมายเลข 2 คือ น้ำ (blank; negative control)

หมายเลข 3 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศปกติ (negative control)

หมายเลข 4-11 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Jeffries and Tina, 2004)

หมายเลข 12-19 คือ การสกัดด้วยวิธี CTAB (Boonham *et al.*, 2002)

หมายเลข 22 และ 23 คือ อาร์เอ็นเอของเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศที่มีเชื้อไวรอยด์ PCFVd (positive control)

หมายเลข 24-31 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini Kit (FAVORGEN)

หมายเลข 32-39 คือ การสกัดอาร์เอ็นเอด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)