การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยเทคนิค Real time PCR

Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from Potato tuber import by Real time PCR

ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล[1/] ทิพวรรณ กันหาญาติ[1/]
รุ่งนภา ทองเครื่ง[1/] ชลธิชา รักใคร่[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุโรคเน่าวงแหวน (Bacterial Ring Rot disease) ของมันฝรั่งเป็นแบคทีเรียที่ทำความเสียหายให้กับระบบการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในหลายๆประเทศ ประเทศไทยนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อการบริโภคและใช้เพาะปลูกเป็นจำนวนมาก ทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีศัตรูพืชกักกันติดเข้ามากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เป็นศัตรูพืชกักกันที่สำคัญชนิดหนึ่ง ที่ทำให้เกิดความเสียหายให้กับการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง จึงจำเป็นต้องระมัดระวังการเข้ามาของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* การหาวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับป้องกันการเข้ามาของศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้าเกษตร การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากยีน16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ยีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือยีน16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer โดยได้ไพรเมอร์

อยู่ในระหว่างการนำเข้าเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* จึงยังไม่สามารถสกัด DNA จากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *nebraskensis* เพื่อนำมาเป็น DNA positive control

รหัสการทดลอง 03-31-60-01-01-00-01-60

คำนำ

แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุโรคเน่าวงแหวน (Bacterial Ring Rot disease) ของมันฝรั่งเป็นแบคทีเรียที่ทำความเสียหายให้กับระบบการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในหลายๆประเทศ แบคทีเรียเข้าทำลายส่วนท่อน้ำท่ออาหารของต้นมันฝรั่ง ทำให้เกิดอาการเหี่ยวแห้ง ทำให้ต้นมันฝรั่งตายแบคทีเรียจะเข้าไปอยู่ในหัวพันธุ์ ถ้าปริมาณแบคทีเรียไม่มากจะแฝงอยู่ในหัวพันธุ์ หากมีปริมาณแบคทีเรียมากจะทำให้หัวพันธุ์เน่าได้ มีรายงานความเสียหายที่เกิดจากโรคเน่าวงแหวนในประเทศสหรัฐอเมริกา โรคนี้ทำให้ผลผลิตเสียหายถึง 50% ในประเทศรัสเซียเสียหาย 30% แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มีความสำคัญทางกักกันพืช โดยในกลุ่มสหภาพยุโรปจัดให้อยู่ในกลุ่ม EPPO A2 พบมีการระบาดในบางประเทศของสหภาพยุโรป แต่หลายประเทศในสหภาพยุโรปที่เป็นแหล่งผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง ไม่พบการระบาดของแบคทีเรียนี้ ในประเทศไทยแบคทีเรียนี้เป็นศัตรูกักกันพืช ยังไม่รายงานการพบแบคทีเรียชนิดในประเทศไทย แต่ประเทศไทยมีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเข้ามาจากต่างประเทศเพื่อเข้าโรงงานผลิตแผ่นมันฝรั่งและมาเพื่อใช้เพาะปลูก ประเทศที่นำเข้ามีหลายประเทศได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดาที่มีการระบาดของโรคเน่าวงแหวน ทำให้มีความเสี่ยงที่เป็นเส้นทาง(pathway) ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่อาจติดมากับหัวพันธุ์ได้ ทำให้ต้องมีการสุ่มหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้า เพื่อตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากทุกตู้สินค้าที่เข้ามา ดังนั้นการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่จำเป็นต้องมีการพัฒนามาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรีย วิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จึงมีความสำคัญ วิธีการตรวจต้องมีประสิทธิภาพ มีความไวในการตรวจ โดยสามารถตรวจหาแบคทีเรียพบในระดับปริมาณน้อย การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง เป็นที่ยอมรับจากประเทศนำเข้า และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าวงแหวนจากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้เขี่ยเชื้อชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย

2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอ เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ตู้อบ (oven) เครื่อง Thermocycler (Biometra ®)

3. เครื่องแก้วและอุปกรณ์อื่นๆที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องชั่ง, pH meter เป็นต้น

4. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการ

การขออนุญาตนำเข้าแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp *sepedonicus* เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศเช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบพก.1) พร้อมเสนอข้อมูลการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เสนอต่อคณะอนุกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

specific primer สืบค้นข้อมูล primer ที่ได้มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่ง ได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* คัดเลือก primer จากนั้นนำลำดับเบสของ primer ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ (Purified genomic DNA) การแยก genomic DNA ให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่ง อายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลาย ใน1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) 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 นาที เติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C จำนวน378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 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 ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องspectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR เพื่อหา crossing point และ วิเคราะห์หา melting curve

ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เป็นการทดสอบ primer ที่สังเคราะห์ไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA และเซลของเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp *sepedonicus* ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และความเข้มข้นของเซลล์ที่ 10^8 cfu/ml การทดสอบความไวในการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (sensitivity) ของ primer โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม และใช้เซลล์ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp *sepedonicus* ที่ความเข้มข้น 10^8, 10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2, 10 หน่วยโคโลนี/มิลลิลิตร

ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้า ทำการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์ฝรั่งนำเข้าจากด่านตรวจพืชจำนวน 0.1% นำมาผ่าดูลักษณะอาการของโรคเน่าวงแหวน ตัดเอาส่วนท่อน้ำท่ออาหารของตัวอย่างมา ใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge ที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียดนำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง 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. *sepedonicus*

เวลาและสถานที่

ต.ค.59 – ก.ย.62 ที่ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การขออนุญาตนำเข้าแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus s* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศเช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดเตรียมทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบพก.1) พร้อมเสนอข้อมูลการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย อยู่ในระหว่างการเสนอต่อคณะอนุกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

การแยกเชื้อจากตัวอย่างหัวมันฝรั่งนำเข้า ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศออสเตรเลียจำนวน 12 ตัวอย่างแยกเชื้อจากตัวอย่างมันฝรั่งที่นำเข้าจากออสเตรเลีย 12 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis subsp. sepedonicus*

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความเฉพาะเจาะจง (specific primer) ดำเนินการสืบค้นข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนที่สำคัญของ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *Sepedonicus* ใน GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) เพื่อนำมา ออกแบบprimer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยพบว่า ยีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือยีน16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer โดยได้ไพรเมอร์ดังนี้

Forward primer (Cms 50-2F), (5′)CGGAGCGCGATAGAAGAGGA;

reverse primer (Cms 133R) (5′)GGCAGAGCATCGCTCAGTACC;

TaqMan probe (5′)AAGGAAGTCGTCGGATGAAGATGCG (Cms 50-53T)

Cms probe FAM-5VTTCCGTCGTCCCTTGAGTGGAT-3VTAMRA

การเตรียม DNA positive control เนื่องจากอยู่ในระหว่างการนำเข้าเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จึงยังไม่สามารถสกัด DNA จากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เพื่อนำมาเป็น DNA positive control ดังนั้นจึงได้ดำเนินการสังเคราะห์ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis subsp. sepedonicus* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศเช่น Belgian Coordinated collection of Microorganism โดยจัดเตรียมทำคำขออนุญาตนำเข้า (แบบพก.1) พร้อมเสนอข้อมูลการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย อยู่ในระหว่างการเสนอต่อคณะอนุกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

Mavrodieva, V., Levy L. and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology 94:61-68.

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

Reischi, U. and Kochanowski B. 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.