



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การผลิต cDNA probe ในการตรวจสอบ
เชื้อไวรัสอหิวาต์สาเหตุโรคพิษ

โดย ดร. คณินนิตย์ เจริญวรารากร และคณะ

มิถุนายน 2544



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การผลิต cDNA probe ในการตรวจสอบ เชื้อไวรัสอหิวาต์สุกร

โดย ดร. คณินันต์ เทริญวรากร และคณะ

วันที่.....	- 5 ส.ย. 2546
เลขทะเบียน.....	TRF 00037
เลขเรียกหนังสือ.....	TRF 42

มิถุนายน 2544

0024

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ชั้น 14 อาคาร เอส ดีบี ทาวเวอร์
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10400
โทร. 298-0455 โทรสาร 298-0476
Home page : <http://www.trf.or.th>
E-mail : trf-info@trf.or.th

ห้องสมุด

Scanned by

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การผลิต cDNA probe ในการตรวจสอบ
เชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช

คณะผู้วิจัย

สังกัด

1. ดร. คณินนิตย์ เจริญวรสาร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มก.
2. รศ. ดร. สุพัฒน์ อรรถธรรม ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มก.

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. สุวัฒน์ อรรถธรรม ที่ช่วยให้คำแนะนำและตรวจแก้ไข
ขอขอบคุณ น.ส. วราลักษณ์ รัชต์แดง น.ส. สมบูรณ์ พรหมมา และ น.ส. เกติณี มณีภาศ ที่ได้
ช่วยเหลือในส่วนของห้องปฏิบัติการ และเรือนปลูกพืชทดลอง ให้การศึกษการผลิต DNA
probe ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคพืช ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และ ในการศึกษา
ครั้งนี้จะไม่สามารถสำเร็จลงได้ถ้าไม่ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
ดิฉันในนามของผู้วิจัย จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

Abstract

Project Code : PDF-28-2542
Project Title : Production of DNA Probe for Detection of Plant Viroids.
Investigator: Dr. Kanungnit Reanwarakorn
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Kasetsart Univ., Kamphaengsaen, Nakorn Pathom 73140.
E-mail Address : agrknr@nontri.ku.ac.th
Project Period : July 1, 2542 – June 30, 2544

Hop stunt viroid (HSVd) was found from grapevine orchard in both symptomless and symptom leave, yellow speckle and yellow-vein banding. It consists of 298 nucleotides displayed 99 % sequence homology to HSVd reported by Sano and his colleges (1986) and 96 % sequence similarity to Citrus cachexia viroid (CCaVd) causing a serious disease on citrus plants. HSVd from Thai-grapevine differs from HSVd in the nucleotide sequence at 2 positions, one addition(T₉₉) and one exchange (G₂₆₂→A). In lime, Citrus exocortis viroid (CEVd) causing citrus serious disease, this CEVd was found from symptomless lime shown 371 nucleotides. The nucleotide sequence was compared with the previously established sequence of CEVd which reported by Gross and his colleagues (1982). Both viroids share about 98.3 % sequence homology. Moreover, the nucleotide sequence was shown 97.8 % sequence homology to the CEVd presented by Visvader and Symons (1985).

cDNA probe produced from hop stunt viroid from Thai-grapevine was shown very good results in detection of viroids from the symptom and symptomless grapevine leave. For cDNA probe made from lime, the samples from lime and pummelo were detected by these cDNA probe displayed perfect results. Nevertheless, this cDNA probe can be used for detection in other hosts of CEVd such as tomato.

These results indicate that both HSVd from grapevine and CEVd from lime are strain or variant of HSVd as well as CEVd, respectively. Both HSVd and CEVd are plant disease causal organisms having very broad host range such as fruit crops, ornamental crops, and vegetable crops. Thus, the HSVd and CEVd were found in Thailand could be the organisms having the same those alternate hosts. For disease control, we should have a good practice for grapevine and citrus plants because both HSVd and CEVd can contaminate into plant materials and agricultural tools.

Keywords : HSVd, CEVd, Viroids, Viroid Diseases, sPAGE

รหัสโครงการ : PDF / 28 /2542
ชื่อโครงการ : การผลิต DNA probe ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช
ชื่อนักวิจัย : ดร. คณินนิตย์ เจริญวารการ
ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร ม.เกษตรศาสตร์
กำแพงแสน นครปฐม 73140
agrknr@nontri.ku.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2542 – 30 มิถุนายน 2544

จากการสำรวจเชื้อไวรัสในองุ่นและมะนาว พบเชื้อ Hop stunt viroid (HSVd) ในองุ่น ทั้งจากใบที่แสดงอาการใบจุดเหลืองและอาการแถบเหลืองตามแนวเส้นใบ นอกจากนี้ยังพบใน ใบที่ไม่แสดงอาการดังกล่าว จากการศึกษาลำดับเบสเชื้อ HSVd ที่พบมีขนาด 298 นิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกับเชื้อ HSVd ที่รายงานโดย Sano และคณะ(1986) ถึง 99 เปอร์เซ็นต์และ เหมือนกับเชื้อ Citrus cachexia viroid (CCaVd) ที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงกับพืชตระกูลส้มถึง 96 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ HSVd ที่ได้จากองุ่นในประเทศไทยต่างจาก HSVd ที่รายงานแล้ว 2 ตำแหน่ง คือ มีเบส T เพิ่มขึ้นที่ตำแหน่ง 99 และที่ตำแหน่ง 262 เบส G เปลี่ยนเป็นเบส A ส่วนใน มะนาวพบเชื้อ Citrus exocortis viroid (CEVd) ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรครุนแรงกับพืชตระกูล ส้มทั่วโลก เชื้อ CEVd ที่พบมีขนาด 371 นิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกับเชื้อ CEVd ที่รายงาน โดย Gross และคณะ(1982) ถึง 98.3 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อ CEVd ที่รายงานโดย Visvader และ Symons (1985) ถึง 97.8 เปอร์เซ็นต์

cDNA probe ที่ผลิตจากเชื้อไวรัสขององุ่น สามารถใช้ตรวจเชื้อไวรัสทั้งจากต้นที่ แสดงอาการและไม่แสดงอาการได้เป็นอย่างดี ส่วน cDNA probe ของ CEVd ที่ผลิตจากเชื้อไว รอยด์ของมะนาว สามารถใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสในมะนาวและส้มโอที่ไม่แสดงอาการแม้ว่า จะมีปริมาณเชื้อไวรัสในพืชต่ำ นอกจากนี้ยังใช้ตรวจเชื้อไวรัสในพืชอาศัยอื่นๆได้เป็นอย่างดี เช่น ใน มะเขือเทศ เป็นต้น

การทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าทั้งเชื้อ HSVd จากองุ่นและ เชื้อCEVd จากมะนาว เป็น strain หรือ variant ของเชื้อ HSVd และ เชื้อ CEVd ตามลำดับ เชื้อ HSVd และเชื้อ CEVd เป็นเชื้อไวรัสที่มีพืชอาศัยกว้าง พบทั้งในไม้ผล ไม้ดอกไม้ประดับ และพืชผัก ดังนั้นเชื้อ HSVd ที่พบในองุ่น และเชื้อ CEVd ที่พบในมะนาว ก็น่าที่จะมีพืชอาศัยกว้างเช่นกัน ฉะนั้นใน การดูแลรักษาต้นองุ่นและมะนาวหรือพืชตระกูลส้มควรต้องมีความระมัดระวังเพราะเชื้อไวรัส สามารถติดไปกับท่อนพันธุ์และอุปกรณ์ที่ใช้ในการตัดแต่งกิ่งได้

คำหลัก : HSVd, CEVd, Viroids, Viroid Diseases, sPAGE

บทนำ

ไวรอยด์เป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกับพืชอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งมีรายงานค้นพบเป็นครั้งแรกในปี 1971 ซึ่งแต่เดิมโรคที่เกิดจากไวรอยด์เหล่านี้ถูกเข้าใจว่าเกิดจากเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุ และเป็นโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชเป็นอย่างมาก เช่นในมันฝรั่ง (Diener, 1987), ส้ม (Semancik and Weathers, 1972), มะพร้าว (Randles, 1975), มะเขือเทศ (Galindo *et al.*, 1982), เบญจมาศ (Diener and Lawson, 1973), อโวคาโด (Desjardin *et al.*, 1980) นอกจากนี้เชื้อไวรอยด์ที่พบเป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคกับพืชดังกล่าวพบว่ามีพืชอาศัยกว้าง เช่นเชื้อไวรอยด์ในไม้ผลบางชนิดก่อให้เกิดโรคกับไม้ผลอื่นแล้วยังก่อให้เกิดโรคกับพวกพืชผักและไม้ดอกอื่นๆด้วย (Fagoaga *et al.*, 1994)

จากรายงานการค้นพบเชื้อไวรอยด์ตั้งแต่ปี 1971 จนถึงปัจจุบัน ยังไม่มีรายงานการค้นพบโรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ในประเทศไทย ทั้งนี้เนื่องจากไม่มีผู้ทำการศึกษาทางด้านนี้ พืชที่มีรายงานพบโรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ในต่างประเทศ ล้วนแล้วแต่เป็นพืชที่มีปลูกในประเทศไทยทั้งสิ้น นอกจากนี้พืชที่ปลูกในบ้านเราหลายชนิดได้มีการนำพันธุ์เข้ามาจากต่างประเทศ จึงมีแนวโน้มว่าในประเทศเราน่าที่จะพบเชื้อไวรอยด์ในพืชหลายชนิดถ้าได้มีการสำรวจ ซึ่งอาจจะรวมถึงโรคบางโรคที่ยังหาสาเหตุของการทำให้เกิดโรคไม่พบ

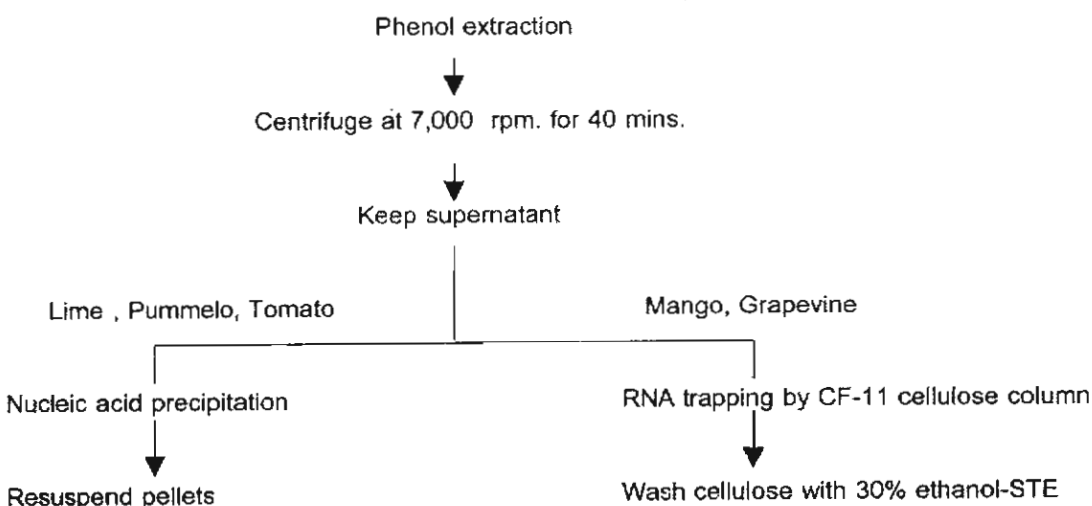
งานวิจัยนี้นอกจากจะเป็นการสำรวจโรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์สาเหตุของโรคพืชในประเทศไทยเพื่อผลิต DNA probe ที่ใช้ในการตรวจสอบแล้ว ยังมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจสอบและวินิจฉัยโรค (diagnosis) ให้ถูกต้อง เพื่อประโยชน์ในการป้องกันกำจัดต่อไป และยังสามารถใช้ในการตรวจสอบพืชเพื่อการควบคุม (Plant disease control) การผลิตพันธุ์พืชปลอดโรค และการกักกันโรค (Plant quarantine) ซึ่งในอดีตไม่เคยมีการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ของพืชที่มีการนำเข้าหรือส่งออกมาก่อน

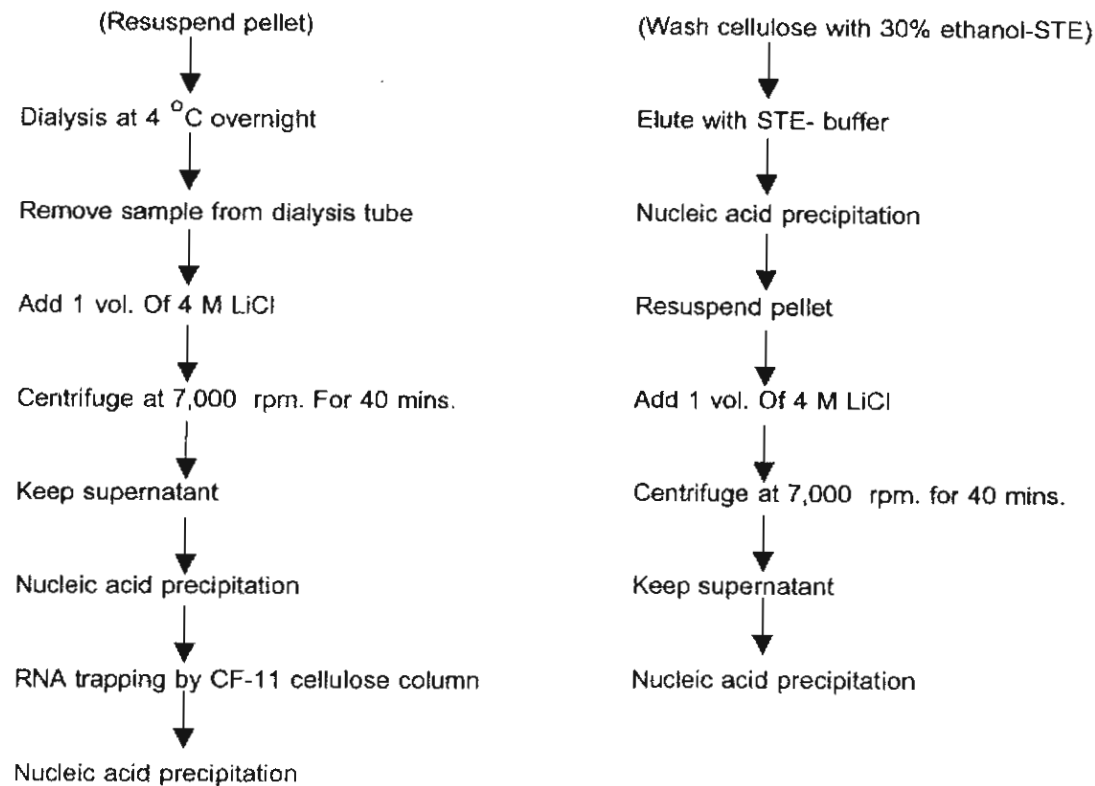
การศึกษาในครั้งนี้เพื่อสำรวจโรคของพืชที่คาดว่าจะเกิดจากเชื้อไวรอยด์เป็นสาเหตุ และผลิต DNA PROBE เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์สาเหตุโรคพืช

วิธีการทดลอง

การสกัดแยก RNA

สำรวจและเก็บตัวอย่าง องุ่น มะนาว ส้มโอ และมะม่วง จากแปลงของเกษตรกรในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี ชัยนาท และสมุทรสาคร นำมาสกัดแยก RNA ตามวิธีของ Semancik and Weathers (1972) และ Szychowski *et al.* (1998) ดังนี้





การตรวจสอบ VIROID-RNA ด้วย sequential polyacrylamide gel electrophoresis [sPAGE]

RNA ที่สกัดได้นำมาตรวจสอบโดยใช้วิธี sPAGE โดยนำตัวอย่างที่สกัดแล้ว 25 ไมโครลิตรผสมกับ 60 เปอร์เซ็นต์กลีเซอริน 8 ไมโครลิตร หยดลงใน 5 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide gel ใช้กระแสไฟฟ้า 54 มิลลิแอมป์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide 10 นาที่ แล้วตัดเจลตรงบริเวณ 7S RNA และที่สูงกว่า 7S RNA เล็กน้อย นำเจลที่ตัดได้ไปวางลงบนเจลที่สอง ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น denaturing gel ใช้กระแสไฟฟ้า 16 มิลลิแอมป์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบไวรอยต์โดยย้อมด้วย silver nitrate

การตรวจสอบ VIROID-RNA ด้วย Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction [RT-PCR]

ตัวอย่างที่ตรวจสอบโดยวิธี sPAGE และพบ RNA-bands ที่น่าจะมีเชื้อไวรอยต์ จะถูกนำมาตรวจสอบโดยเพิ่มปริมาณ DNA ด้วย primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรอยต์ ในกลุ่มต่างๆ (Elena และคณะ, 1991) โดยวิธี reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้อุณหภูมิ 92 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 45-55 องศาเซลเซียส 1 นาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที จำนวน 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 15 นาที จำนวน 1 รอบ (Semancik *et al.* 1993; Szychowski *et al.* 1998).

การโคลนนิ่งและการศึกษาลำดับเบสของไวรอยต์

ตัวอย่างที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA-bands ในช่วงขนาดประมาณ 245-400 นิวคลีโอไทด์ โดยวิธี RT-PCR ด้วย primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรอยต์ DNA-bands ดังกล่าวจะถูกเชื่อมต่อกับพาหะ pGEM-T Easy (Promega Corporation , 1999) และโคลนเข้าสู่ *E. coli* (Glover and Hames, 1995) จากนั้นเพิ่มปริมาณโคลนดังกล่าวเพื่อนำไปหาลำดับเบสของ DNA-bands ที่ถูกเชื่อมต่อเข้ากับพาหะดังกล่าว (Visvader และ Symons, 1985) และเปรียบเทียบลำดับเบสที่ได้กับลำดับเบสที่มีรายงานแล้วหรือจาก gene bank

การผลิตและทดสอบ DNA probe

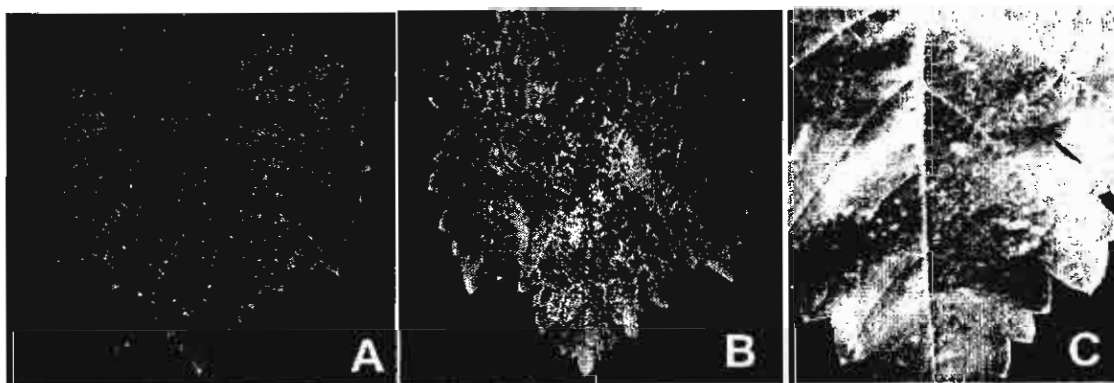
นำ DNA ที่มีลำดับเบสเหมือนกับลำดับเบสของเชื้อไวรอยด์มาติดฉลากด้วย digoxigenin (DIG) (Boehringer Mannheim GmbH. 1999) จากนั้นนำ DNA probe ที่ได้ไปทดสอบกับตัวอย่างองุ่นที่เก็บจากแหล่งต่างๆทั้งที่แสดงอาการ และไม่แสดงอาการ โดยตัวอย่างดังกล่าวจะถูกนำมาสกัด RNA จากนั้น ผสม 1 ไมโครลิตร ของตัวอย่างที่สกัดแล้วกับ 1 ไมโครลิตร ของ denaturing solution หยดตัวอย่างที่ผสมดังกล่าวลงบนแผ่น nitrocellulose ที่ผ่านการแช่ใน 20x SSC นาน 25 นาที การตรวจสอบ RNA ของไวรอยด์ โดยการทำ Prehybridization ในถุงพลาสติกที่เติมสารละลาย blocking และ buffer ในอัตราส่วน 20 มิลลิลิตร / 100 ตารางเซนติเมตร นาน 1 ชั่วโมง ที่ 68 °C หลังจากนั้นทำการ hybridization ที่ 68 °C นานประมาณ 16 ชั่วโมง ด้วย DNA probe ที่เตรียมดังกล่าวแล้วข้างต้นที่มีความเข้มข้น 10 นาโนกรัม / ไมโครลิตร ตรวจสอบผลจากสีที่เกิดขึ้น

การทดสอบพืชอาศัย

RNA ที่สกัดได้จากตัวอย่างที่กล่าวข้างต้นถูกนำไปปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ เช่น มะเขือเทศ แตงกวา และ Gynura เป็นต้น

ผลการทดลอง

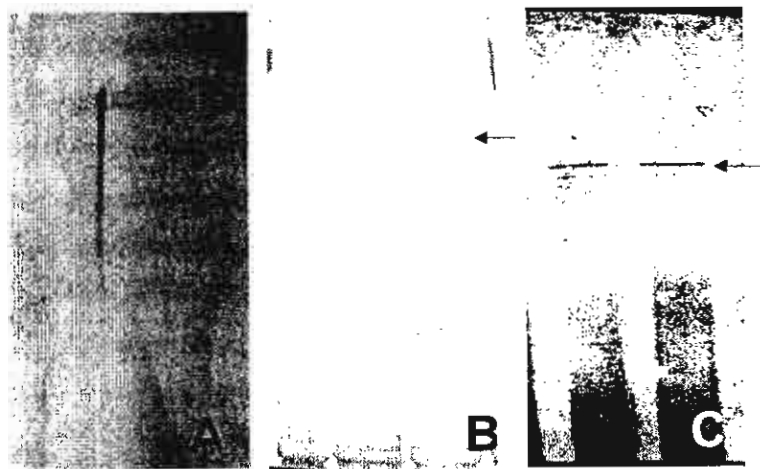
ในการสำรวจพบองุ่นหลายแปลงแสดงอาการจุดเหลืองเล็กๆบนใบ (yellow speckle) (ภาพที่ 1 ,A) และอาการเหลืองตามแนวเส้นใบ (yellow-vein banding) (ภาพที่ 1 , B) ซึ่งอาการดังกล่าวเหมือนกับที่มีรายงานในออสเตรเลีย ยุโรป และ อเมริกา ว่าเป็นโรค grapevine yellow speckle disease และ vein-banding disease เกิดจากเชื้อ grapevine yellow speckle viroid (Rezaian, M.A. 1990; Semancik, J.S. and Szychowski, J.A. 1992 ; Szychowski *et al.* ; 1998) นอกจากอาการดังกล่าวแล้วยังพบอาการวงสีเหลือง(ภาพที่ 1,C) ซึ่งอาการที่กล่าวยังไม่พบมีรายงานในต่างประเทศ



ภาพที่ 1 ใบองุ่นแสดง (A) อาการจุดเหลืองเล็กๆบนใบ (yellow speckle) (B) อาการเหลืองตามแนวเส้นใบ (yellow-vein banding) และ (C) อาการวงสีเหลือง

อาการบนมะนาว โดยทั่วไปยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นโรคเอคโซคอร์ติส (exocortis) ซึ่งเป็นโรคร้ายแรงโรคหนึ่งที่เกิดในพืชตระกูลส้มดังที่มีรายงานในต่างประเทศ (Semancik, 1988) แม้ว่าจะพบ RNA-bands ของเชื้อไวรอยด์ (ภาพที่ 2B) ส่วนในมะม่วงยังไม่สามารถบอกได้ว่าอาการยางไหลกับ RNA ที่พบมีความสัมพันธ์กันหรือไม่ ซึ่งจะได้ทำการศึกษาต่อไป

จาก sequential polyacrylamide gel electrophoresis (sPAGE) พบ ขนาดของ RNA bands ที่น่าจะเป็นไวรอยด์ทั้งใน องุ่น มะนาว และมะม่วง (ภาพที่ 2A,B,C)ในการใช้ primers ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรอยด์กลุ่มต่าง ๆ พบว่า primers ที่มีความจำเพาะกับ hop stunt viroid (5' GTTGCCCCGGGGCTCCT 3' และ 5' TCTTTCTCAGAATCCAGCG 3') สามารถจับและสังเคราะห์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300 นิวคลีโอไทด์ จากตัวอย่างขององุ่นทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ (ภาพที่ 3A) และจาก primers ที่มีความจำเพาะกับเชื้อ citrus exocortis viroid (CEVd) (5'CCGGGGATCCCTGAAGAAC 3' และ 5'GGAAACCTGGAGGAAGTCG 3') สามารถจับและสังเคราะห์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อ CEVd ดังแสดงในภาพที่ 3B จาก DNA bands ที่ได้ทั้งในองุ่นและมะนาวถูกนำไปศึกษาหาลำดับเบส



ภาพที่ 2 แสดง RNA-bands (ลูกศรชี้) โดยการตรวจสอบด้วยวิธี sequential polyacrylamide gel electrophoresis (sPAGE) ใน (A) องุ่น, (B) มะนาว, และ (C) มะม่วง