

การสำรวจ และรวบรวมเชื้อไวรัสของพืชตระกูลส้ม  
Surveying and identification of Viroid in Citrus group

นางสาวดารุณี ปุณฺณพิทักษ์ นางสาวเยาวภา ตันตวานิช นางสาวบุรณี พัวพงษ์แพทย์  
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

---

### บทคัดย่อ

การสำรวจและรวบรวมเชื้อไวรัสของพืชตระกูลส้ม โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้ม ได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ ส้มเซ้ง ส้มจุก ส้มมือ มะนาว มะนาวสี มะนาวตาฮิติ และ มะกรูด ที่แสดงอาการ ใบบิดเบี้ยว ต้นโทรม ต้นแคระแกรน จากสวนเกษตรกรรมตามจังหวัดต่างๆ ทั่วประเทศ จำนวน 93 ตัวอย่างแล้วนำมาตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการใช้ไพรเมอร์ จำนวน 8 คู่ ผลปรากฏว่าตรวจพบเชื้อไวรัสจำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างพืชตระกูลส้ม จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเชื้อไวรัสมาโคลนนิ่งเพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และหาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสของพืชตระกูลส้มด้วยโปรแกรม Clustalw ผลปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัสของส้มที่มีอยู่ใน Genbank ซึ่งแสดงว่าไม่พบเชื้อไวรัสในพืชตระกูลส้มในประเทศไทย

## คำนำ

ส้มหรือพืชตระกูลส้ม (Citrus spp.) เป็นไม้ผลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการผลิตและการส่งออก รวมทั้งการบริโภคภายในประเทศ คาดการณ์กันว่าพื้นที่ปลูกส้มในปี 2547 มีมากกว่า 500,000 ไร่ และมีมูลค่าการซื้อขายผลิตประมาณ 3 หมื่นล้านบาท (กรมวิชาการเกษตร, 2547) โรคและแมลงเป็นปัญหาสำคัญในการปลูกส้ม แมลงที่สำคัญ ได้แก่ เพลี้ยไก่แจ้ส้ม เพลี้ยอ่อน และ เพลี้ยไฟ โรคที่สำคัญ ได้แก่ โรคกรีนนิ่ง ทริสเทซ่า และแคงเคอร์ และในต่างประเทศยังมีรายงานโรคเกิดจากเชื้อไวรอยด์ซึ่งเป็น low molecular weight RNAs ที่มีขนาดเล็ก ไม่มีโปรตีนห่อหุ้ม เช่น โรค Citrus exocortis โรค Cachexia และโรค Citrus bent leaf viroid ลักษณะอาการของโรค ใบบิดเบี้ยว ต้นแคระแกรน ต้นตอมีอาการเปลือกแตก รอยต่อระหว่างยอดพันธุ์กับต้นตอไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้ (สมบูรณ์, 2545) โรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์แพร่ระบาดไปเกือบทั่วทุกประเทศทั่วโลกที่ปลูกส้มเพื่อการค้า เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล สเปน อิสราเอล ออสเตรเลีย ญี่ปุ่น อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และสามารถเป็นได้กับส้มทุกพันธุ์ (ไมตรี, 2540 ; Diener, 1987; Singh and Dhar, 1998 ; Hull, 2002) การแพร่ระบาดและการถ่ายทอดโรคไวรอยด์ส่วนใหญ่ปนเปื้อนไปกับท่อนพันธุ์ ทำให้การแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว (ดารุณี, 2547) เนื่องจากการขยายพันธุ์ส้มในประเทศไทยใช้การติดตา ตอนกิ่ง ทาบกิ่ง หากมีเชื้อไวรอยด์ติดไปกับท่อนพันธุ์จะเป็นการแพร่ระบาดของเชื้อไวรอยด์ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้มีการนำพันธุ์ส้มจากต่างประเทศเข้ามาปลูกเพื่อการค้าอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการเกิดโรคไวรอยด์ในประเทศไทย (ไมตรี, 2540) การศึกษาไวรอยด์ในพืชตระกูลส้มในประเทศไทยสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันกำจัดโรค และ ใช้เป็นดัชนีการของโรคในประเทศไทยต่อไป

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

1. เครื่อง Thermal cycler
2. Gel Documentation UV-transilluminator
3. Gel electrophoresis
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง
5. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ
6. เอ็นไซม์ต่างๆ ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

### วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลลักษณะอาการผิดปกติของต้นส้มเมื่อถูกเชื้อไวรอยด์ เข้าทำลายและทำการออกแบบโปรแกรมที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรอยด์ที่เข้าทำลายพืชตระกูลส้ม

2. สํารวจและเก็บตัวอย่างส้มโขกุน ส้มโอ มะนาว ส้มเขียวหวาน ส้มโขกุน ส้มโอ ส้มเซ้ง ส้มจุก ส้มมือ มะนาว มะนาวสี มะนาวตาฮิติ และ มะกรูด จากสวนเกษตรกรในจังหวัด เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ตาก แพร่ ชัยนาท กาญจนบุรี เพชรบุรี สมุทรสงคราม ปราจีนบุรี ตราด จันทบุรี เลย สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และ กระบี่ จำนวน 93 ตัวอย่าง
3. ทดสอบวิธีการสกัด อาร์เอ็นเอ ของเชื้อไวรอยด์ จากใบส้ม ซึ่งการสกัดอาร์เอ็นเอจากใบส้ม ใช้ High Pure RNA Tissue Kit (Roche Applied Science)
4. ตรวจสอบหาเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 8 คู่ พร้อมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ และเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอ
5. ผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ถูกนำมาวิเคราะห์ โดยใช้ 2% agarose gel ใน 0.5X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที นำมาย้อมด้วย 0.1% ethidium bromide 5 นาที แล้วตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator
6. นำ PCR product ที่ได้ไป clone ด้วย pGEM-T easy vector
7. วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ หาความสัมพันธ์ของเชื้อโรครีหนึ่งในพืชตระกูลส้ม

#### เวลาและสถานที่

ระยะเวลา	ตุลาคม 2550 – กันยายน 2553
สถานที่	กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช สวนส้มของเกษตรกร ใน ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันตก และภาคใต้

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสืบค้นข้อมูลของเชื้อไวรอยด์ที่เข้าทำลายพืชตระกูลส้มพบว่าเมื่อส้มถูกเชื้อไวรอยด์เข้าทำลายจะมีลักษณะใบบิดเบี้ยว ต้นแคระแกรน ต้นโทรม ต้นตอมีอาการเปลือกแตก รอยต่อระหว่างยอดพันธุ์กับต้นตอไม่สามารถเชื่อมต่อกันได้ จากนั้นทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มจากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ ได้แก่ เชียงราย เชียงใหม่ ลำปาง ตาก แพร่ ชัยนาท กาญจนบุรี เพชรบุรี สมุทรสงคราม ปราจีนบุรี ตราด จันทบุรี เลย สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช และ กระบี่ จำนวน 93 ตัวอย่าง แล้วนำมาตรวจสอบหาเชื้อไวรอยด์ด้วยเทคนิค RT-PCR จำนวนตัวอย่าง 8 คู่ ผลปรากฏว่าตรวจพบเชื้อไวรอยด์ จำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่ตรวจพบเชื้อไวรอยด์ มาโคลนนิ่งด้วย pGEM-T easy vector จำนวน 3 ตัวอย่าง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ และหาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ของพืชตระกูลส้มด้วยโปรแกรม Clustalw

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการสำรวจ และรวบรวมเชื้อไวรัสของพืชตระกูลส้ม โดยการสำรวจและเก็บตัวอย่าง พืชตระกูลส้มที่แสดงอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส จากจังหวัดต่างๆ ในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และ ภาคใต้ สามารถเก็บตัวอย่างได้ จำนวน 93 ตัวอย่าง และเมื่อนำมาตรวจสอบหาเชื้อไวรัสด้วยไพรเมอร์จำนวน 8 คู่ ผลปรากฏว่ายังตรวจพบเชื้อไวรัส จำนวน 20 ตัวอย่าง จากนั้นคัดเลือกตัวอย่างพืชตระกูลส้ม จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเชื้อไวรัส มาโคลนนิ่งด้วย pGEM-T easy vector เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และหาความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสของพืชตระกูลส้มด้วยโปรแกรม Clustalw ผลปรากฏว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไม่มีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัสของส้มที่มีอยู่ใน Genbank ซึ่งแสดงว่าไม่พบเชื้อไวรัสในพืชตระกูลส้มในประเทศไทย

### เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2547. รายงานสรุปผลการสัมมนาอนาคตส้มไทย. การสัมมนาอนาคตพืชสวนไทยสดใสแน่หรือ โดยกรมวิชาการเกษตร และสมาคมพืชสวนแห่งประเทศไทย 25-26 พฤศจิกายน 2547. ณ ห้องประชุมมนตรีรัฐมาคม อาคารเฉลิมพระเกียรติ 6 รอบพระชนมพรรษา กรมวิชาการเกษตร 50 หน้า
- ดารุณี ปุญญพิทักษ์. 2547. การแยกเชื้อและตรวจสอบเชื้อไวรัสในมะเขือเทศ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 82 หน้า
- สมบูรณ์ พรหมมา. 2545. การตรวจสอบเชื้อไวรัสในมะนาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 94 หน้า
- ไมตรี พรหมมินทร์ 2540. ไวรัสและโรคคล้ายไวรัสและต้นพันธุ์ส้มปลอดโรค น.1 – 25 ในการฝึกอบรมหลักสูตรวิทยาการส้ม : ทางเลือกปัจจุบันสู่อนาคต รุ่นที่ 2 วันที่ 7 – 11 ก.ค. 2540
- Diener, T.O. 1987. The viroids and viroid disease. John Wiley&Son, Inc., New York. 252 p.
- Hull. R. 2002. Matthew ' s Plant Virology. 4 th ed. Academic Press.
- Singh, R.P. and A.K. Dhar. 1998. Detection and management of plant viroid. pp. 428-447 in A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa, eds. Plant virus disease control. APS. Press. Paul. Minisota