

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

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

ณัฐริมา โฆษิตเจริญกุล^{1/} ทิพวรรณ กันหาญาติ^{1/}

รุ่งนภา ทองเครื่อง^{1/} ชลธิชา รักใคร่^{2/}

^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

^{2/} กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุโรคเน่าวงแหวน (Bacterial Ring Rot disease) ของมันฝรั่งเป็นแบคทีเรียที่ทำความเสียหายให้กับระบบการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในหลายๆประเทศ ประเทศไทยนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อการบริโภคและใช้เพาะปลูกเป็นจำนวนมาก ทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีศัตรูพืชที่ติดเข้ามาพร้อมกับหัวพันธุ์มันฝรั่ง แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เป็นศัตรูพืชที่กักกันที่สำคัญชนิดหนึ่ง ที่ทำให้เกิดความเสียหายให้กับการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง จึงจำเป็นต้องระมัดระวังการเข้ามาของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* การหาวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้สำหรับป้องกันการเข้ามาของศัตรูพืชที่อาจติดมากับสินค้าเกษตร การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็วและความแม่นยำสูง โดยออกแบบไพรเมอร์เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ยีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือยีน 16S 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 03-31-60-01-00-01-60

คำนำ

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

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์มาตรฐานในห้องปฏิบัติการแบคทีเรีย ได้แก่ ตู้แช่แข็งชนิดปลอดเชื้อ อุปกรณ์การแยกเชื้อแบคทีเรีย
2. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้เย็นสำหรับเก็บตัวอย่าง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เครื่องเขย่งชนิดควบคุมอุณหภูมิ 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 เสนอต่อคณะกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

specific primer สืบค้นข้อมูล primer ที่ไม่มีรายงานว่า 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 และเชื้อแบคทีเรียให้เต็มหนึ่งลูป ละลาย ใน 1 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 ที่ส่วนน้ำใสข้างบน 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 นำไปปั่นตกตะกอนด้วย เครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Gemnany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุ สาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บ ตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 150 ไมโครลิตร ของ 70% ethanol จำนวน 2 ครั้ง ที่ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ไลยตะกอน DNA ด้วย TE buffer pH. 8.0 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร วัดปริมาณความเข้มข้น และคุณภาพของดีเอ็นเอ ที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อนำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR โดยการหา T_m ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาในแต่ละช่วงเวลา 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 และเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย *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 เพมโตกรัม 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 ทำการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากด่านตรวจพืชจำนวน 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 ทั้งส่วนตะกอน นำ 2 ul ของตัวอย่างเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา Real time PCR ตามปฏิกิริยาที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และทุกตัวอย่างเปรียบเทียบกับ การตรวจเชื้อบนอาหาร 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 อยู่ในระหว่างการเสนอต่อคณะกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

การแยกเชื้อจากตัวอย่างหัวมันฝรั่งนำเข้า ดำเนินการสุ่มเก็บตัวอย่างหัวมันฝรั่งนำเข้าจากประเทศออสเตรเลียจำนวน 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 ออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อ แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยพบว่า ยีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือยีน 16S 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-5VTTCGGTCGTCCTTGAGTGGAT-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 อยู่ในระหว่างการเสนอต่อคณะกรรมการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัย เมื่อได้รับอนุญาตแล้ว จึงดำเนินการนำเข้ามาเพื่อทดลองต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Gudmestad, N. C., Mallik, I., Pasche, J. S., Anderson, N. R., and Kinzer, K. 2009. A real-time PCR 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 Molecular Medicine: Quantitative PCR Protocol*. Edited by Kochanowski B. and Reischi, U. Humana Press, Totowa, New Jersey. Pp 3-30.