รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนามาตรการสุขอนามัยพืชและการเฝ้าระวังศัตรูพืชเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

2. โครงการวิจัย : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

กิจกรรมที่ 1 : การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชกักกันเพื่อการนำเข้าสินค้าเกษตร

1. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าโดยเทคนิค Real time PCR

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* from Potato tuber import by Real time PCR

2. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : ณัฎฐิมา โฆษิตเจริญกุล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ทิพวรรณ กันหาญาติ
รุ่งนภา ทองเคร็ง
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ชลธิชา รักใคร่
กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

3. บทคัดย่อ

แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุโรคเน่าวงแหวน (Bacterial Ring Rot disease) ของมันฝรั่งเป็นแบคทีเรียที่ทำความเสียหายให้กับระบบการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในหลายๆประเทศ ประเทศไทยนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อการบริโภคและใช้เพาะปลูกเป็นจำนวนมาก ทำให้มีความเสี่ยงที่จะมีศัตรูพืชกักกันติดเข้ามากับหัวพันธุ์มันฝรั่ง 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 เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศ โดยการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นดีเอ็นเอของเชื้อที่สั่งสังเคราะห์บางส่วนของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เพื่อนำมาเป็น DNA positive control การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับเชื้อแบคทีสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง ที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความไว พบว่าสามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 25 pg/ ปฏิกิริยา ผลการสุ่มตรวจหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศออสเตรเลียด้วยวธี Real time PCR ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ในตัวอย่างที่ตรวจ

Abstract

4. คำนำ

แบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* สาเหตุโรคเน่าวงแหวน (Bacterial Ring Rot disease) ของมันฝรั่งเป็นแบคทีเรียที่ทำความเสียหายให้กับระบบการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในหลายๆประเทศ แบคทีเรียเข้าทำลายส่วนท่อน้ำท่ออาหารของต้นมันฝรั่ง ทำให้เกิดอาการเหี่ยวแห้งและต้นมันฝรั่งตายแบคทีเรียจะเข้าไปอยู่ในหัวพันธุ์ ถ้าปริมาณแบคทีเรียไม่มากจะแฝงอยู่ในหัวพันธุ์ หากมีปริมาณแบคทีเรียมากจะทำให้หัวพันธุ์เน่าได้ มีรายงานความเสียหายที่เกิดจากโรคเน่าวงแหวนในประเทศสหรัฐอเมริกา โรคนี้ทำให้ผลผลิตเสียหายถึง 50% ในประเทศรัสเซียเสียหาย 30% แบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มีความสำคัญทางกักกันพืช โดยในกลุ่มสหภาพยุโรปจัดให้อยู่ในกลุ่ม EPPO A2 พบมีการระบาดในบางประเทศของสหภาพยุโรปแต่หลายประเทศในสหภาพยุโรปที่เป็นแหล่งผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง ไม่พบการระบาดของแบคทีเรียนี้ สำหรับประเทศไทยแบคทีเรียนี้เป็นศัตรูกักกันพืช ยังไม่รายงานการพบแบคทีเรียชนิดในประเทศไทย แต่ประเทศไทยมีการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเข้ามาจากต่างประเทศเพื่อเข้าโรงงานผลิตแผ่นมันฝรั่งและมาเพื่อใช้เพาะปลูก ประเทศที่ไทยนำเข้ามันฝรั่งมีหลายประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดา ที่มีการระบาดของโรคเน่าวงแหวน ทำให้มีความเสี่ยงที่เป็นเส้นทาง (pathway) ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่อาจติดมากับหัวพันธุ์ได้ ทำให้ต้องมีการสุ่มหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้าเพื่อตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากทุกตู้สินค้าที่เข้ามา การตรวจสอบวินิจฉัยแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีประสิทธิภาพเป็นวิธีการหนึ่งที่จำเป็นต้องมีการพัฒนามาใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจหาแบคทีเรีย โดยวิธีการตรวจต้องมีประสิทธิภาพ มีความไวในการตรวจสามารถตรวจหาแบคทีเรียพบในระดับปริมาณน้อย ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีจุดมุ่งหมายในการพัฒนาวิธีการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยวิธี real time PCR ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว และความแม่นยำสูง เป็นที่ยอมรับจากประเทศนำเข้า และสามารถนำไปใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจหาแบคทีเรียสาเหตุโรคเน่าวงแหวนจากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าได้

วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. เครื่องแก้ว และอุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
2. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
3. หม้อนึ่งความดันไอ
4. เครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง
6. ตู้อบ
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง
8. เครื่องชั่ง

9. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Biometra® และ LightCycler480)

10. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สกัดดีเอ็นเอ ทำปฏิกิริยา PCR และ real time PCR

11. หัวมันฝรั่ง

- วิธีการ

1. การเตรียม DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศ ไทย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องสังเคราะห์ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

2. การคัดเลือก specific primer

สืบค้นข้อมูล primer ที่มีรายงานว่า สามารถใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนของมันฝรั่งได้ผลดีและมีความเฉพาะเจาะจงต่อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* คัดเลือก primer จากนั้นนำลำดับเบสของ primer ไปสังเคราะห์เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคเน่าวงแหวนโดยวิธี Real time PCR ต่อไป

3. การสกัด genomic DNA และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

การสกัด genomic DNA

การแยก genomic DNA แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบให้บริสุทธิ์ ใช้วิธีของ Pitcher *et al.* (1989) โดยใช้แบคทีเรียอายุ 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง LB ใช้ลูปฆ่าเชื้อ แตะเชื้อแบคทีเรีย ให้เต็มหนึ่งลูป ละลายใน 1 มิลลิลิตร Resuspension buffer (0.15 M NaCl และ 0.01M EDTA pH 8.0) นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) 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 นาทีเติมด้วย 500 ไมโครลิตร chloroform/iso-amyl-alcohol (24/1) ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง Hettich (Universal 116, Germany) ที่ความเร็วรอบ 14,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสข้างบน ใส่หลอดใหม่ที่บรรจุสาร isopropanol ที่แช่เย็นใน ตู้เย็น -20 °C จำนวน 378 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน genomic DNA ที่ความเร็วรอบ 14,000 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 ด้วยเครื่อง spectrophotometer (U 2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้น DNA ของเชื้อแต่ละไอโซเลทให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เพื่อ นำไปทดสอบปฏิกิริยา Polymerase chain reaction

ทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

โดยการหา Tm ที่เหมาะสมของไพรเมอร์ เพื่อนำมาทำการทดสอบปฏิกิริยา Real time PCR จะได้อุณหภูมิในการจับคู่ไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing temperature) ที่เหมาะสม ตลอดจนทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมในการ ทำปฏิกริยาในแต่ละช่วงเวลา ทดสอบสภาวะที่เหมาะสมของ Real time PCR

4. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR

ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เป็นการทดสอบ primer ที่สังเคราะห์ไว้ โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 มาทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยใช้ DNA เชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* และเชื้อแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่มีรายงานทำให้เกิดโรคในมันฝรั่ง ความเข้มข้นของ DNA ที่ 50 ng และทดสอบความไวในการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (sensitivity) ของ primer โดยใช้สภาพที่เหมาะสมที่ได้ จากข้อ 3 โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม

5. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้า

ทำการสุ่มตัวอย่างหัวพันธุ์ฝรั่งนำเข้าจากด่านตรวจพืช จำนวน 0.1% นำมาผ่าดูลักษณะอาการของโรคเน่าวงแหวน ตัดเอาส่วนท่อน้ำท่ออาหารของตัวอย่างมาใส่หลอด 1.5 ml microcentrifuge ที่เติมด้วย 100 ul ของ phosphate buffer saline pH 7.0 บดตัวอย่างด้วย plastic disposable pestles ให้ละเอียด นำไปตกตะกอนด้วยเครื่อง 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

เวลา	ตุลาคม 2559 – กันยายน 2562
สถานที่	ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานบักเตรีวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

5. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเตรียม DNA positive control ของแบคทีเรีย *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*

สืบค้นยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จาก Gen Bank :ซึ่งเป็นยีนที่ใช้สำหรับออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้รายละเอียดดังนี้

เชื้อแบคทีเรีย	Accession number
C. michiganensis subsp. *sepedonicus* LMG 2889	U09382
C. michiganensis subsp. *sepedonicus* LMG 2901	JN613837
C. michiganensis subsp. *sepedonicus* K0090	HM181750
C. michiganensis subsp. *sepedonicus* Ac-1405	HQ394204

ดำเนินการสั่งสังเคราะห์ของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากบริษัท Thermo Fisher Scientific GENEART GmbH ประเทศเยอรมันนี เพื่อนำมาใช้เป็น DNA positive control เพื่อดำเนินการทดสอบไพรเมอร์ต่อไป

2. คัดเลือก specific primer

ดำเนินการสืบค้นข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนที่สำคัญของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ใน GenBank เพื่อนำมาออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยพบว่ายีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือ ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer โดยได้ไพรเมอร์ดังนี้

FP Cm primer 5′-TGTCGAGGGCATGTTGCACG-3′

RP Cm primer 5′-GGAGACAGAATTGACCAATGAT-3′

Cms probe FAM -5′ TTCCGTCGTCCCTTGAGTGGAT3′ -TAMRA

3. การสกัด genomic DNA และทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR

ทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ด้วย conventional PCR พบว่าดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อ 3 สายพันธุ์ ปรากฎแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 200 bp ได้แก่ สายพันธุ์ LMG

2889, LMG 2901 และ K0090 (ภาพที่ 1) สอดคล้องกับผลทดสอบด้วย real time PCR จึงใช้ดีเอ็นเอสังเคราะห์ของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็น DNA positive control สำหรับทดลองต่อไป

ผลการทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมของปฏิกิริยา Real time PCR สำหรับตรวจเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

นำดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* มาวัดความเข้มข้นของดีเอนเอที่ช่วงคลื่น A260/A280 ด้วยเครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (U2001 UV/Vis, Hitachi Instruments, Inc., USA) และปรับความเข้มข้นดีเอ็นเอเท่ากับ 50 ng/ul ทำปฏิกิริยา real-time PCR ด้วยเครื่อง LightCycler® 480 (Roche Diagnostics, Thailand) ในการทำปฏิกิริยาจำนวน 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Thailand), 0.25 uM primer, 0.25 uM probe, น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ และดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 1 ไมโครลิตร โดยมีรายละเอียดโปรแกรมสำหรับทำปฏิกิริยา real-time PCR ดังนี้

Program	cycles	Target (°C)	Hold time (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)	Acquisition mode
Pre-incubation	1	95	00:10:00	4.40	none
Amplification	40	95	00:00:20	4.40	none
		66	00:01:00	2.20	none
Cooling	1	40	00:00:30	2.20	none

4. ทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR

ผลทดสอบความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของปฏิกิริยา Real time PCR ในการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยใช้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ไว้

การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เท่านั้นไม่เพิ่มกับเชื้อแบคทีสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 2)

การทดสอบความไว โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม ผลการทดสอบพบว่า สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 25 pg/ ปฏิกิริยา (ภาพที่ 3)

6. ทดสอบวิธี Real time PCR ในการตรวจหาแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากหัวพันธุ์มันฝรั่งที่นำเข้า

สุ่มเก็บตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย จำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อและตรวจด้วย Real time PCR ผลการแยกเชื้อไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จากนั้นดำเนินการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำส่วนบนที่เป็นน้ำใสจากตัวอย่างที่เตรียมไว้ใส่หลอด ผลการตรวจเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้และตัวอย่างมันฝรั่งที่นำเข้าจากออสเตรเลีย 12 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* (ภาพที่ 4)

1. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เนื่องจากแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ไม่มีรายงานการปรากฏพบในประเทศไทย ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการขออนุญาตนำเข้าจากต่างประเทศ โดยการนำเข้าสิ่งต้องห้ามเพื่อการทดลองหรือวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นดีเอ็นเอของเชื้อที่สั่งสังเคราะห์บางส่วนของยีนส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* จำนวน 4 สายพันธุ์ เพื่อนำมาเป็น DNA positive control

การสืบค้นข้อมูลลำดับ nucleotide ของยีนที่สำคัญของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ใน GenBank เพื่อนำมาออกแบบ primer ที่เฉพาะเจาะจงกับเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* พบว่ายีนที่นำมาออกแบบไพรเมอร์คือ ยีน 16S ribosomal RNA gene ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic space

การทดสอบความจำเพาะ พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* เท่านั้น ไม่เพิ่มกับเชื้อแบคทีสาเหตุโรคพืชและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง จำนวน 10 ไอโซเลท ที่ใช้ทดสอบ การทดสอบความไว โดยใช้ DNA ของแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ที่มีความเข้มข้น 8 ระดับ ตั้งแต่ 50 นาโนกรัม ถึง 100 เฟมโตกรัม พบว่า สามารถตรวจสอบแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ได้ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอคือ 25 pg/ ปฏิกิริยา

สุ่มเก็บตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศออสเตรเลีย จำนวน 12 ตัวอย่าง เพื่อแยกเชื้อและตรวจด้วย Real time PCR ไม่พบเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะคล้ายเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ผลการตรวจเชื้อที่แยกได้และนำส่วนบนที่เป็นน้ำใสของตัวอย่างมันฝรั่งที่นำเข้าจากออสเตรเลีย 12 ตัวอย่าง ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

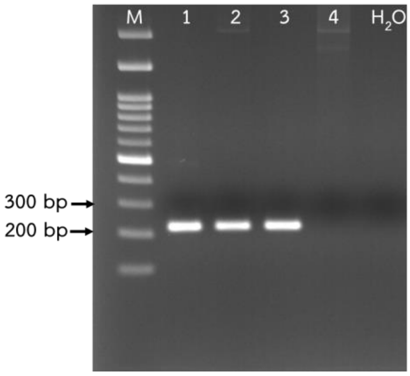
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้วิธีการตรวจแบคทีเรีย *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*

3. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

4. เอกสารอ้างอิง



Gudmestad, N.C., I. Mallik, J.S. Pasche, N.R. Anderson and K. Kinzer. 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., L. Levy and D.W. Gabriel. 2004. Improved sampling methods for realtime polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. Phytopathology 94:61-68.

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

13. ภาคผนวก

-

ภาพที่ 1 แสดงผลทดสอบไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* ด้วย conventional PCR โดย

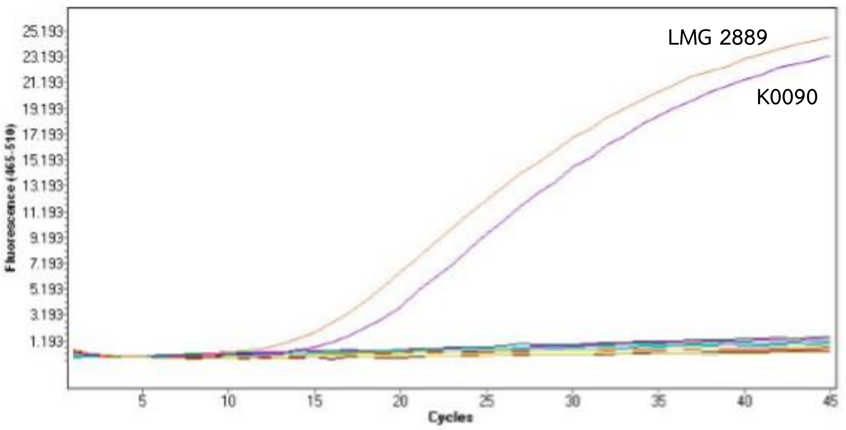
ช่อง M คือ ดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน OneMark 100

ช่อง 1 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* LMG 2889

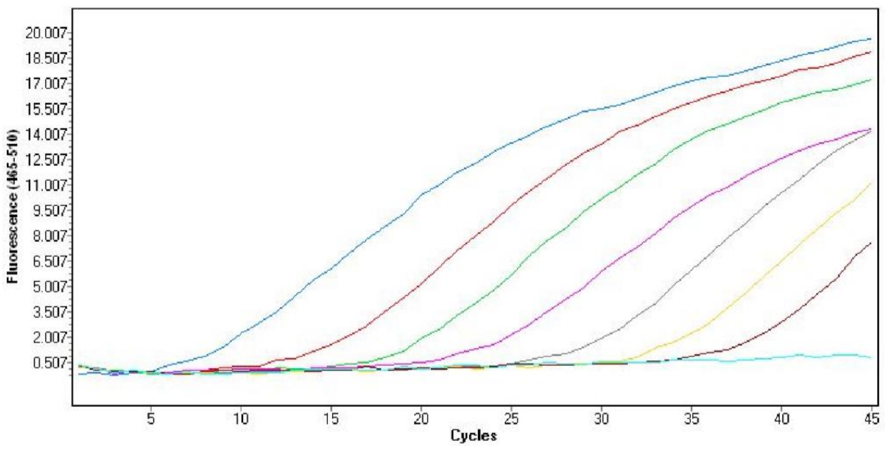
ช่อง 2 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* LMG 2901

ช่อง 3 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* K0090

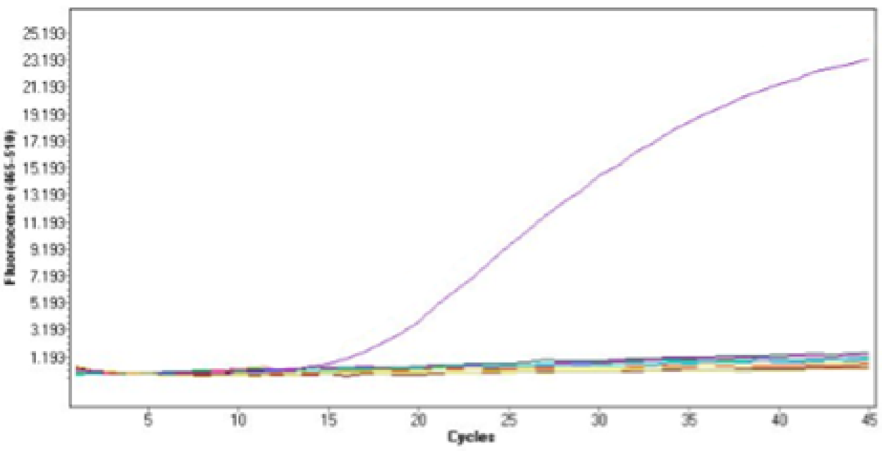
ช่อง 4 คือ ดีเอ็นเอสังเคราะห์เชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus* Ac-1405



ภาพที่ 2 แสดงผลทดสอบความจำเพาะของไพรเมอร์กับแบคทีเรียชนิดอื่นที่แยกได้จากหัวมันฝรั่ง พบว่าไพรเมอร์ Cms probe มีความเฉพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*



ภาพที่ 3 แสดงผลทดสอบความไวของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอสังเคราะห์ส่วน 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer ของเชื้อ *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*



ภาพที่ 4 แสดงผลการตัวอย่างหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าจากประเทศด้วย Real time PCR