บทคัดย่อ

T159453

ตัวอย่างมะเขือเทศที่แสดงอาการยอดพุ่มฝอยและเนื้อเยื่อตายบนกิ่ง ก้านใบ และเส้นใบ เก็บรวบรวมและรักษาไว้ ตั้งแต่ ปี 2535-2544 จำนวน 7 ตัวอย่าง (BT1/43, BT2/44, BT3/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 และ BS1/35) นำมาตรวจวินิจฉัยเบื้องต้นด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้แอนติซีรั่มที่จำเพาะกับ tomato bushy stunt *Tombusvirus* (TBSV) , การตรวจด้วย citrus exocortis *Pospiviroid* (CEVd) cDNA probe , การแยกไวรัสบริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนห่อหุ้มด้วยเทคนิค SDS-PAGE และตรวจสอบความสามารถในการเกิดโรคกับมะเขือเทศ , การตรวจอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน , การแยกสกัดส่วน small RNA (450-500 bp) และการพิสูจน์ความสามารถในการเกิดโรค สามารถวินิจฉัยได้ว่าตัวอย่าง BT1/43, BT2/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 และ BS1/35 เกิดจากเชื้อ TBSV ร่วมกับเชื้อไวรอยด์ ส่วนตัวอย่าง BT3/44 เกิดจากไวรอยด์เพียงอย่างเดียว

นำตัวอย่างไวรอยด์ BT3/44 มาแยกสกัด small RNAและแยกเฉพาะส่วน RNA (450-500 bp) ออกจากเจลและปลูกเชื้อบนมะเขือเทศพันธุ์สีดา พบว่าสามารถทำให้เกิดโรคได้ ทำการ cloning และตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ามีความยาวของจีโนมเท่ากับ 371 นิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกับ CEVd variants มากที่สุด 94.2 -99.1 % จึงระบุได้ว่า ไวรอยด์ BT3/44 เป็นเชื้อ CEVd-BT3/44

ได้พัฒนา RT-PCR protocol สำหรับตรวจเชื้อ CEVd ในตัวอย่างใบมะเขือเทศเป็นโรค ซึ่ง RT-PCR protocol ที่ดีที่สุดประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้ (1) แยกสกัด RNA จากเนื้อเยื่อใบพืชเป็นโรคตามวิธีการดัดแปลงของ Hadidi et al. (1997),(2) สังเคราะห์ cDNA โดยมีส่วนผสมปฏิกิริยาคือ small RNA ต้นแบบ 800 นาโนกรัม ใส่ primer CVd (5'-CCCTSAAGSRSYYYYYYS-3') จำนวน 100 pmol, MMLV-reverse transcriptase 50 units, 10 mM each dNTPs บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง , (3) สังเคราะห์ ds cDNA โดย PCR โดยมีเงื่อนไขที่เหมาะสม คือ first strand cDNA reaction จำนวน 5 ไมโครลิตร ใส่ primer CVd และ HVd (5'-ATCCCCGGGGAAACSTSRAG-3') อย่างละ 100 pmol, 200 mM $MgCl_2$, 20 mM each dNTPs และ *Taq* DNA polymerase จำนวน 2.5 units มีโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, 48 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 40 รอบ (4) ตรวจสอบ RT-PCR products ด้วย 2% agarose gel electrophoresis โดยขนาด DNA ของเชื้อ CEVd มีความยาวประมาณ 380 bp ไม่พบ DNA ขนาดดังกล่าวเมื่อตรวจสอบกับตัวอย่างพืชปกติด้วย RT-PCR protocol เดียวกัน

Abstract

TE 159453

Seven sample showing severe necrosis and bunchy top of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (BT1/43, BT2/44, BT3/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 and BS1/35) were collected and stored in laboratory since 1992-2001. Various diagnostic techniques, including ELISA with antiserum against tomato bushy stunt *Tombusvirus* , hybridization with cDNA probe specific for citrus exocortis *Pospiviroid* (CEVd) , purified virus preparation and determining the molecular weight of viral coat protein subunit by SDS-PAGE, and pathogenicity test for purified virus preparations, electron microscope examination, small RNA (450-500 bp) extraction and confirmation the pathogenicity of small RNA molecules by mechanical inoculation onto tomato " Sida" variety plants. The causal agent(s) in BT1/43, BT2/44, BT5/39, BT6/36, BT7/36 and BS1/35 were mixed of TBSV and viroid, whereas the BT3/44 caused by viroid.

The viroid causal agent of BT3/44 sample was isolated by small RNA extraction/separation technique. The small RNA (450-500 base) was recovered from gel and mechanical inoculated on tomato "Sida" plants. These small RNAs were infectious and gave the bunchy top with severe necrosis symptoms. Total 371 nucleotides of viroid BT3/44 genome were sequenced. The genome of BT3/44 showed 94.2 -99.1 % homology with those of CEVd variants. Therefore, the viroid BT3/44 was designated as CEVd-BT3/44.

The RT-PCR protocol for detection of CEVd in tomato leaf tissue was investigated. The best RT-PCR protocol consisted of (1) RNA extraction from infected leaf tissue by modified Hadidi et al. (1997)'s method; (2) first strand cDNA synthesis by reaction of 800 ng RNA template, 100 pmol of CVd primer (5'-CCCTSAAGSRSYYYYYYS-3'), 50 units of MMLV-reverse transcriptase, 10 mM dNTPs each, incubated at 42°C for 2 hr; (3) synthesis of ds cDNA by PCR . The PCR reaction consisted of 5 μl of first strand cDNA reaction, 100 pmol of CVd and HVd (5'ATCCCCGGGGAAACSTSRAG-3') primers, 200 mM $MgCl_2$, 20 mM dNTPs each, 2.5 units of *Taq* DNA polymerase. The PCR protocol was 40 cycles of 95°C for 1 min, 48°C for 1 min and 72°C for 1 min. (4) The RT-PCR product was separated on 2% agarose gel electrophoresis. The target 380 bp DNA fragment was obtained for successfully detection in CEVd infected leaf tissue. Using the same RT-PCR protocol, no target DNA fragments obtained from sample of healthy leaf tissue.