

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 1* และ 2 (GYS-Vd-1 และ 2) สาเหตุโรค Grapevine Yellow Speckle ด้วยวิธี RT-PCR  
Development of Detection Technique for *Grapevine yellow speckle viroid 1* and 2 (GYSVd-1 and 2) Causing Grapevine Yellow Speckle Disease by RT-PCR method

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์<sup>1/</sup>

หทัยรัตน์ เจื่อนาค<sup>2/</sup>

น็อรวรรณ แซ่ลื้อ<sup>2/</sup>

สุกัญญา หนูชู<sup>2/</sup>

คณิงนิตย์ เจริญวารากร<sup>3/</sup>

Parichate Tangkanchanapas<sup>1/</sup>

Hathairat Juenak<sup>2/</sup>

Nionwan Saelor<sup>2/</sup>

Sukanya Noochoo<sup>2/</sup>

Kanungnit Reanwarakorn<sup>3/</sup>

---

### ABSTRACT

*Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) and *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) are serious grapevine plant pathogens causing “grapevine yellow speckle disease” which are commonly found in several grapevine plantation areas. These viroids can transmit by contaminated plant materials or agricultural tools simply which leads them to easily and rapidly spread. Therefore, development for efficient and accurate diagnostic method is necessary for prevention from an impact of these viroids. In February and March 2014, yellow spot (speckle) symptom on leaves was found in several grapevine plantations in Saraburi and Nakhon Ratchasima provinces. By development of molecular technique, total RNA extracted from the twenty collected samples by CTAB method, they were determined by RT-PCR technique using the GYSVd1 primers (c-GYSVd1: CGAGGCTCACTCCCCCTCTGCC / h-GYSVd1: TCGTCGACGAAGGGGTGCACTCC) and

---

<sup>1/</sup> กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ

<sup>1/</sup> Plant Virology Section, Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok

<sup>2/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

<sup>2/</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bang Kean, Bangkok

<sup>3/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>3/</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen district, Nakorn Pathom, 73140

the GYSVd2 (upper) primers (c-GYSVd2 (upper): GGTCCGCGGAGGCCTTCCGAGG / h-GYSVd2 (upper): TGCAGAGAAAAGAAGAA GGGCCCAG). Then the PCR products were cloned, sequenced and analyzed. The results revealed that six and eleven samples of the collected grapevine leaves were GYSVd-1 and GYSVd-2 and the variants ranged in size from 353-389 as well as 362-365 nucleotides, respectively. The GYSVd1 and GYSVd-2 sequences also shared 93-99% and 98-99% homology with the GYSVd-1 and GYSVd-2 in GenBank database, respectively. To our knowledge, this is the first report of GYSVd-2 natural infection in grapevine plants in Thailand.

**keywords:** detection method, viroid diseases Grapevine plant

### บทคัดย่อ

เชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในองุ่นซึ่งก่อให้เกิดโรค “grapevine yellow speckle disease” พบได้ทั่วไปในพื้นที่ปลูกองุ่น เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวสามารถถ่ายทอดไปกับท่อนพันธุ์หรืออุปกรณ์ที่ใช้ทางการเกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อได้ง่าย ทำให้โรคดังกล่าวสามารถ

แพร่กระจายได้ง่ายและรวดเร็ว ดังนั้นการศึกษาพัฒนาวิธีการในการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพและมีความถูกต้องแม่นยำสูง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการป้องกันความเสียหายที่เกิดจากการแพร่ระบาดของโรคดังกล่าว จากการสำรวจโรคไวรัสและไวรอยด์ในพื้นที่ปลูกองุ่นในพื้นที่จ.สระบุรี และ จ.นครราชสีมา เดือนกุมภาพันธ์และ มีนาคม ปี พ.ศ. 2557 ตรวจพบองุ่นแสดงอาการผิดปกติ ใบมีจุดเหลือง กระจายทั่วไป จากการพัฒนาเทคนิคตรวจสอบด้วยเทคนิคอณูชีวโมเลกุลโดยการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB และปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 (c-GYSVd1: CGAGGCTCACTCCC CCTCTGCC / h-GYSVd1: TCGTCGACGAA GGGGTGCACTCC) และ GYSVd2 (upper) (c-GYSVd2 (upper): GGTCCGCGGAGG CCTTCCGAGG / h-GYSVd2 (upper): TGCAGAGAAAAGAAGAAGGGCCCAG) ผลของ PCR นำมาโคลน ศึกษาลำดับเบสและวิเคราะห์ผล สามารถตรวจพบเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 จำนวน 6 และ 11 ตัวอย่างตามลำดับ จากตัวอย่างใบองุ่นทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง โดยเชื้อ GYSVd-1 และเชื้อ GYSVd-2 มีขนาดตั้งแต่ 353-389 และ 362-365 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ และมีความเหมือนกับเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ในฐานข้อมูลของ GenBank ที่ 93-99% และ 98-99% ตามลำดับซึ่งเป็นการตรวจพบเชื้อ GYSVd-2 ครั้งแรกในสภาพแปลงปลูกองุ่นในประเทศไทย

**คำหลัก:** วิธีการตรวจสอบ, โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสไวรอยด์องุ่น

## คำนำ

ปัจจุบันองุ่นเป็นพืชที่มีการปลูกขยายพันธุ์อย่างแพร่หลายในประเทศไทย โดยมีการนำเข้ากิ่งพันธุ์จากต่างประเทศเพื่อนำมาปลูกปรับปรุงพันธุ์ แต่เนื่องจากท่อนพันธุ์องุ่นมีสถานภาพตามพระราชบัญญัติกักพืช เป็นเพียง “สิ่งไม่ต้องการห้าม” จึงไม่ได้มีข้อกำหนดหรือเงื่อนไขพิเศษใด ๆ ก่อนการนำเข้า มีเพียงใบรับรองสุขอนามัยพืชเท่านั้นซึ่งไม่ได้ระบุข้อความพิเศษหรือเงื่อนไขข้อกำหนดใด ๆ ดังนั้นกิ่งพันธุ์องุ่นที่นำเข้าจะไม่ได้ถูกตรวจสอบรับรองการปลอดเชื้อสาเหตุโรคหรือศัตรูพืชใด ๆ ก่อนการนำเข้าทั้งสิ้น ซึ่งเป็นความเสี่ยงอย่างมากที่เชื้อสาเหตุโรคพืชอาจติดเข้ามาพร้อมกับส่วนขยายพันธุ์ดังกล่าวได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสและไวรอยด์

เชื้อไวรอยด์ที่เป็นเชื้อสาเหตุโรคองุ่นมีอยู่ด้วยกันหลายชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Australian grapevine viroid* (AGVd)(Hadidi et al., 2003), *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) (Li et al., 2007) ซึ่งในจำนวนนี้มี 2 ชนิดที่มีรายงานการเข้าทำลายองุ่นในประเทศไทย คือ HSVd (วรลักษณ์, 2545) และ GYSVd-1 (Hannok, 2004) สำหรับเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ก่อให้เกิดโรค “grapevine yellow speckle

disease” พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1972 ที่ประเทศออสเตรเลีย (Taylor and Woodham, 1972) ลักษณะอาการโดยทั่วไป ใบจะมีอาการจุดเหลืองหรือมีลักษณะจุดหรือกระสีเหลือง กระจายทั่วไปตามแนวเส้นใบ ซึ่งลักษณะอาการจะขึ้นกับสภาพอากาศ หากอาการโรครุนแรงส่งผลให้ใบพืชที่แสดงอาการมีระดับการสังเคราะห์แสงลดลงซึ่งส่งผลโดยตรงกับอัตราการเจริญของพืชรวมถึงปริมาณและคุณภาพของผลผลิตด้วย นอกจากนี้ยังอาจเกิดอาการ vein banding คือเนื้อเยื่อบริเวณรอบเส้นใบมีสีซีดกว่าเนื้อใบได้ด้วย (Hadidi et al., 2003) โดยในประเทศไทยออสเตรเลียอาจพบอาการผิดปกติได้ตั้งแต่ช่วงต้นเดือนตุลาคม จนถึงมกราคม และอาจพบได้จนถึงเดือนมีนาคมหากต้นองุ่นยังสามารถเจริญเติบโตได้ (คณิงนิตย์, 2556) เชื้อชนิดนี้มีรายงานพบในประเทศไทยออสเตรเลีย จีน เยอรมนี และสหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ GYSVd-1 ในไร่องุ่นที่จังหวัดนครราชสีมา โดยพบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ GYSVd-1 ที่มีรายงานในออสเตรเลีย 96% และเมื่อนำมาปลูกเชื้อให้กับมะเขือเทศ สามารถทำให้มะเขือเทศเกิดอาการต้นเตี้ยแคระและใบผิดปกติ (Hannok, 2004; Hannok and Reanwarakorn, 2005) เชื้อไวรอยด์ดังกล่าวสามารถถ่ายทอดโรคได้ง่ายด้วยวิธีกล เช่น วัสดุอุปกรณ์การเกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อ และติดไปกับท่อนพันธุ์ จึงทำให้เกิดการแพร่ระบาดได้ง่ายเนื่องจากเชื้อโรคติดไปกับท่อนพันธุ์จากแหล่งหนึ่งไปยังอีกแหล่งหนึ่ง และเชื่อดังกล่าวมีผู้ศึกษาวินิจฉัยน้อยมาก จึงทำให้

ในปัจจุบันยังมีข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อ GYSVd-1 มีน้อย นอกจากนี้วิธีการตรวจสอบเชื้อ GYSVd-1 ที่มีรายงานแต่เดิมในปี พ.ศ. 2547 คู่ primer ที่ใช้อยู่เดิม ไม่เหมาะสมหรืออาจไม่ครอบคลุมการตรวจสอบเชื้อ GYSVd-1 สายพันธุ์ใหม่ ๆ ที่พบในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ GYSVd-2 ที่ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบในประเทศไทยมาก่อนดังนั้นจึงจำเป็นต้องพัฒนาชุด primer ขึ้นมาใหม่ เพื่อใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยที่มีความถูกต้องแม่นยำเพื่อการป้องกันกำจัดโรคที่มีประสิทธิภาพ

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่าง

สำรวจและเก็บตัวอย่างโรคของงุ่นที่แสดงอาการที่จำเพาะของโรค โดยใบพืชจะมีลักษณะจุดเหลืองกระจายทั่วไป ในพื้นที่จังหวัดที่มีการปลูกงุ่นเป็นหลักและมีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรอยต์ในงุ่นมาก่อน ได้แก่ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี อ.ปากช่อง และอ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา ประมาณ 20 ตัวอย่างจากนั้นนำตัวอย่างใบงุ่นที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าวมาทดสอบต่อในห้องปฏิบัติการ

### 2. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2

โดยอาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) และความรู้ทาง bioinformatics นำมาออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ

GYSVd-2 โดยนำมาเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว คือ คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 (Hannok, 2004)

### 3. การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบงุ่นด้วยวิธี CTAB method โดยบดตัวอย่างพืช 100 มก. เติม CTAB Extraction buffer (2 % CTAB, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 1.0 %  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  และ 2.0% PVP-40 โดยเติม  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  และ PVP-40 ก่อนใช้) ปริมาตร 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C 30 นาที บั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 750  $\mu\text{l}$  ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750  $\mu\text{l}$  ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน บั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 600  $\mu\text{l}$  ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 600  $\mu\text{l}$  ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน บั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 400  $\mu\text{l}$  เติม 5mol/L NaCl ปริมาตร 200  $\mu\text{l}$  และ isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 600  $\mu\text{l}$  ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C ซ้ำมคืน นำไปบั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE buffer ที่มี 1% SDS ปริมาตร

200  $\mu\text{M}$  จากนั้นเติม 5mol/L NaCl ปริมาตร 100  $\mu\text{L}$  และ isopropanol ที่แช่เย็น 300  $\mu\text{L}$  ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วย 70 % ethanol ปริมาตร 500  $\mu\text{L}$  ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease ปริมาตร 30 - 50  $\mu\text{L}$  เก็บที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อนำไปตรวจสอบหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ในขั้นต่อไป

#### 4. การทดสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

โดยอาศัยการตรวจหายีน *nadh* ในพืช (internal control) และใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) กับคู่ไพรเมอร์ nad (Nad2.1a: GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC และ Nad2.2b: AGCAATGAGATTCCCAATATCAT) (Thompson *et al.*, 2003) มาช่วยในการตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ โดยมีขั้นตอนดังนี้

ส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-PCR มีดังนี้ กรดนิวคลีอิกที่ได้จากการสกัดตัวอย่างใบองุ่น 1  $\mu\text{L}$  กับไพรเมอร์ Nad2.1a และ Nad2.2b ความเข้มข้น 2mmol/L ปริมาตรไพรเมอร์ละ 212X Reaction Mix buffer ปริมาตร 10  $\mu\text{L}$  น้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease ปริมาตร 4.5  $\mu\text{L}$  และเอ็นไซม์ SuperScript™ III RT / Platinum® Taq Mix ปริมาตร 0.5  $\mu\text{L}$  (ปริมาตรรวม 10  $\mu\text{L}$ )

จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้อุณหภูมิ  $48^{\circ}\text{C}$  นาน 50 นาที จำนวน 1 รอบ  $94^{\circ}\text{C}$  นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ, denaturation temperature  $94^{\circ}\text{C}$  นาน 30 วินาที annealing temperature  $56^{\circ}\text{C}$  นาน 30 วินาที extension temperature  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย  $72^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 7  $\mu\text{L}$  ตรวจสอบขนาดด้วยวิธีการ Gel electrophoresis ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 2.0 % ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และย้อม gel ด้วย ethidium bromide และนำไปตรวจแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ Nad มีขนาด 188 คู่เบส ซึ่งหากตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวแสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้นั้นมีคุณภาพดีเหมาะสมกับการนำมาตรวจสอบไวรัสในขั้นต่อไป

#### 5. การตรวจสอบเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ด้วยวิธีการ RT-PCR

5.1 ตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดด้วยคู่ไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่และไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อน ประกอบไปด้วย

1. คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-1

c-GYSVd1:

(CGAGGCTCACTCCCCCTCTGCC)

h-GYSVd1:

(TCGTCGACGAAGGGGTGCACTCC)

## 2. คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (upper)

ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-2 โดยออกแบบจากบริเวณ upper conserve domain ของเชื้อ GYSVd-2

c-GYSVd2 (upper):

(GGTCCGCGGAGGCCTTCCGAGG)

h-GYSVd2 (upper):

(TGCAGAGAAAAGAAGAAGGGCCCAG)

## 3. คู่ไพรเมอร์ GYSVd2 (lower)

ออกแบบสำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-2 โดยออกแบบจากบริเวณ lower conserve domain ของเชื้อ GYSVd-2

c-GYSVd2 (lower):

(AGGAGACAGGCCCGCGTTTCGCC)

h-GYSVd2 (lower):

(AAGATGCCTCCGCTAGTCGAGCGG)

## 4. คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219

(Hannok, 2004) สำหรับตรวจเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ใช้เป็นไพรเมอร์เปรียบเทียบในการทดลอง

cV218: (GGACGCGAACGTGAATAGG)

hV219: (TTGAGGCCTGGCGTAACGC)

## 5.2 การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ด้วย

เทคนิค RT-PCR

ตรวจสอบเชื้อไวรอยด์จากตัวอย่างอาร์เอ็นเอพืชที่สกัดได้ ด้วยปฏิกิริยา One-Step

RT-PCR (Invitrogen) โดยการผสมกรดนิวคลีอิกที่สกัดจากพืชทดสอบ 1  $\mu$ l กับคู่ไพรเมอร์ ความเข้มข้น 2 mol/L ปริมาตรเส้นละ 212X Reaction Mix buffer ปริมาตร 10  $\mu$ l น้ำกลั่น หนึ่งฝาเชื้อ ปริมาตร 4.5  $\mu$ l และเอ็นไซม์ SuperScript™ III RT / Platinum® Taq Mix ปริมาตร 0.5  $\mu$ l จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

คู่ไพรเมอร์ GYSVd1, GYSVd2 (upper)

และ GYSVd2 (lower): 48 °C นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94 °C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94 °C นาน 30 วินาที annealing temperature 62 °C นาน 30 วินาที extension temperature 72 °C นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72 °C นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ สำหรับคู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 จะเปลี่ยนใช้ annealing temperature เป็น 58 °C

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 7  $\mu$ l ตรวจสอบขนาดด้วยวิธี เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ภายใต้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 2.0 % ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และย้อม gel ด้วย ethidium bromide ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยดีเอ็นเอเชื้อไวรอยด์ที่ได้จะมีขนาดประมาณ 370 คู่เบส

## 6. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสที่ตรวจพบ

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้เชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy (Promega) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Library efficiency DH5 $\alpha$  competent cells (Invitrogen) โดยใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch *et al.*, 2001) จากนั้นตรวจสอบโคลนที่ได้และสกัดพลาสมิดด้วยชุด Gene JET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ และส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำมาวิเคราะห์จำแนกชนิด และวิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบด้วยโปรแกรมต่าง ๆ ดังนี้

6.1 วิเคราะห์จำแนกชนิดของเชื้อไวรัสด้วยโปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อยืนยันผลการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR

6.2 วิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW) ในการทำ multiple sequence alignment และสร้าง phylogenetic tree ของกลุ่มลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เราศึกษาว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไร และสามารถจัดจำแนกกลุ่มออกมาได้ในลักษณะไหน เพื่อตรวจสอบว่าเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในครั้งนี้มีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัสสายพันธุ์เดียวกัน isolate อื่น ๆ ที่มี

รายงานอย่างไร โดยกำหนดค่า parameter ให้ที่เหมาะสมกับการวิเคราะห์ดังนี้

- การวิเคราะห์ pairwise alignment กำหนดให้ค่า gap opening penalty เท่ากับ 10, gap extension penalty เท่ากับ 0.1

- การวิเคราะห์ multiple sequence alignment กำหนดให้ค่า gap opening penalty เท่ากับ 10, gap extension penalty เท่ากับ 0.2,

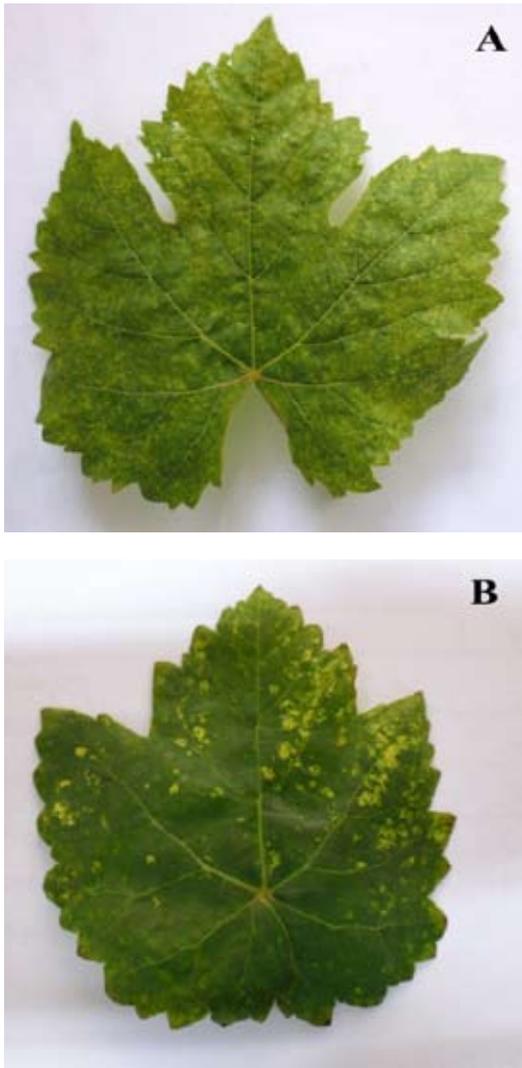
- กำหนดเลือกค่า DNA weight matrix เป็น IUB และ transition weight เท่ากับ 0.8

- ในการสร้าง phylogenetic tree เลือกใช้วิธีการ Neighbor joining method เนื่องจากเป็นวิธีการที่เหมาะสมกับการศึกษาความสัมพันธ์ในกลุ่มประชากรระดับชนิดพันธุ์เดียวกันและไม่ต้องการทราบสายการวิวัฒนาการบรรพบุรุษร่วม และ molecular clock

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. การเก็บตัวอย่าง

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างโรคในไร่องุ่นพบใบพืชแสดงอาการผิดปกติสองลักษณะคือ ใบมีจุดเหลืองกระจายทั่วไป (necrosis spot) (Figure 1A) และลักษณะอาการใบมีจุดประกลม (mottling) (Figure 1B) ซึ่งพบว่ากระจายทั่วไปในไร่องุ่นพื้นที่ อ.มวกเหล็ก จ.สระบุรี อ.ปากช่อง และ อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา



**Figure 1** Yellow necrosis spots (A) and yellow mottling (B) symptoms on grapevine leaves caused by GYSVd

## 2. การออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2

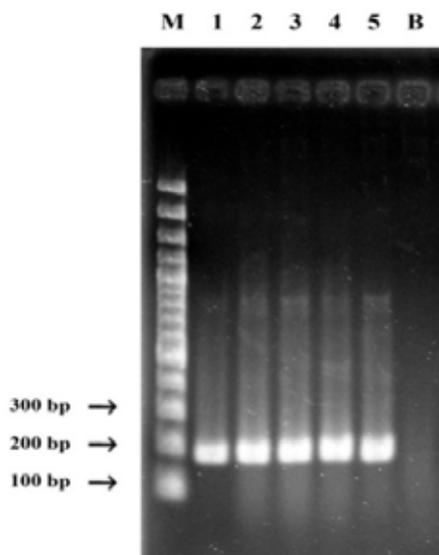
อาศัยฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) และความรู้ทาง bioinformatics โดยวิธีการ multiple sequences alignment ร่วมกับ

โปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) และโปรแกรม FastPCR version 3.7.53 (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland) เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 โดยนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับไพรเมอร์ที่เคยมีรายงานมาก่อนแล้ว คือ คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hv219 ในการศึกษาครั้งนี้ได้ไพรเมอร์ออกแบบใหม่มาจำนวนทั้งสิ้น 3 คู่ ได้แก่ GYSVd1 GYSVd2 (upper) และ GYSVd2 (lower) โดยมีรายละเอียดตามวิธีการทดลองหัวข้อ 5.1

## 3. การสกัดอาร์เอ็นเอและทดสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

ตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างใบองุ่น โดยอาศัยการตรวจหายีน *nadh* ในพืช (internal control) ซึ่งยีน *nadh* เป็น “Housekeeping gene” สามารถตรวจพบได้ในทุกช่วงอายุและทุกส่วนของพืช ดังนั้นจึงสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดในการตรวจคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้

การใช้เทคนิค RT-PCR กับคู่ไพรเมอร์ Nad พบว่า วิธี CTAB method เป็นวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่มีประสิทธิภาพดี ได้อาร์เอ็นเอรวมที่มีคุณภาพดี ไม่มีโปรตีนและสารเคมีที่จะไปยับยั้งปฏิกิริยา RT-PCR (inhibitor) ตกค้าง ทำให้ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 188 คู่เบสตามที่ต้องการ (Figure 2)



**Figure 2** Gel electrophoresis of RT-PCR products of NdhB gene using specific Nad primer pair designed to amplify 188 bp fragment in plant samples (lanes 1-5, grapevine leaf samples) compared with buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M)

#### 4. การตรวจสอบเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 ด้วยวิธีการ RT-PCR

จากผลการตรวจสอบเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 กับตัวอย่างใบองุ่นทั้ง 20 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับเชื้อไวรอยด์ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ ได้แก่ cV218 และ hV219, GYSVd1, GYSVd2 (upper) และ GYSVd2 (lower) ผลพบว่ามีเพียง 2 คู่ไพรเมอร์เท่านั้นที่สามารถให้แถบดีเอ็นเอขนาดใกล้เคียงกับเชื้อไวรอยด์ โดยมีขนาดประมาณ 370 นิวคลีโอไทด์ คือ คู่ไพรเมอร์ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) (Figure 3

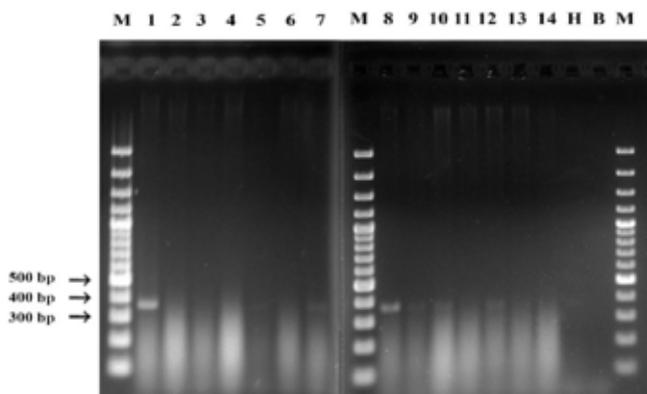
และ 4) ในขณะที่ไพรเมอร์ GYSVd2 (lower) และ คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 ไม่พบแถบดีเอ็นเอใด ๆ ปรากฏ (Figure 5 และ 6)

จากผลการตรวจตัวอย่างใบองุ่นจำนวน 20 ตัวอย่าง พบเชื้อ GYSVd-1 จำนวน 6 ตัวอย่าง และ GYSVd-2 จำนวน 11 ตัวอย่าง (Table 1) ซึ่งจากลักษณะอาการผิดปกติของพืชที่ปรากฏทั้ง 2 ลักษณะคือ ใบมีจุดเหลืองกระจายทั่วไป (necrosis spot) และลักษณะอาการใบมีจุดประกลม (mottling) ไม่แปรผันตามชนิดของเชื้อไวรอยด์ที่พบ แสดงให้เห็นว่าไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ก่อให้เกิดอาการผิดปกติได้ทั้ง 2 ลักษณะโดยทั้งนี้ความแตกต่างของอาการน่าจะขึ้นกับสภาพภูมิอากาศและชนิดพันธุ์องุ่นที่ปลูก

#### 5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรอยด์ที่ตรวจพบ

##### 5.1 วิเคราะห์จำแนกชนิดของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม Blastn

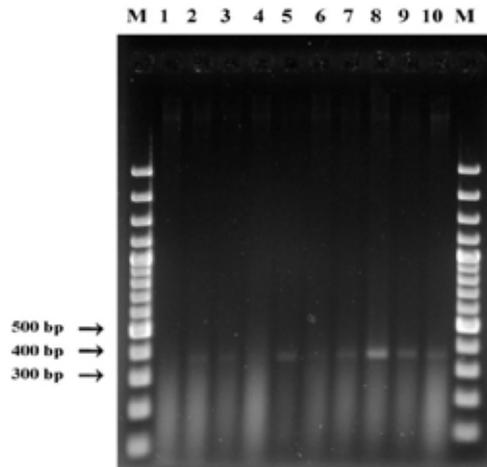
เมื่อนำผลผลิต RT-PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ GYSVd1 มีขนาดตั้งแต่ 353-389 นิวคลีโอไทด์ และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ GYSVd2 (upper) มีขนาดตั้งแต่ 362-365 นิวคลีโอไทด์ โดยเมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยโปรแกรม Blastn ใน GenBank แล้วพบว่า แถบดีเอ็นเอทั้ง 2 มีความเหมือนกันกับเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) ตามลำดับ โดย



**Figure 3** Gel electrophoresis of RT-PCR products (approximately 360 bp) of grapevine leaf samples using specific GYSVd1 primers, grapevine leaf samples (lanes 1 to 14) compared with healthy plant (lane H), buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M)

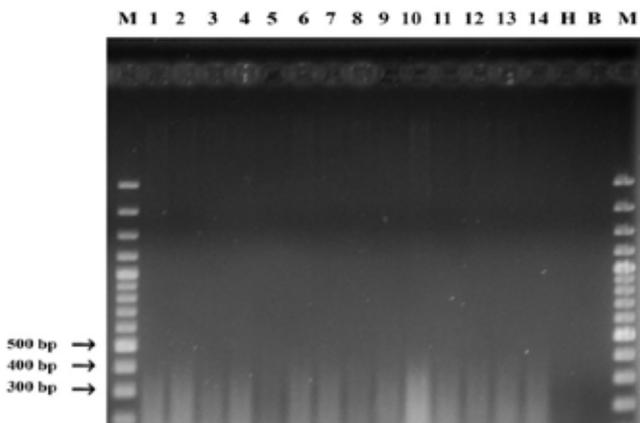
เชื้อ GYSVd-1 มีค่า Identities อยู่ระหว่าง 93-99% มีค่า Score อยู่ระหว่าง 555-671 bits และมีค่า Expect value อยู่ระหว่าง  $2e-154$  ถึง 0.0 (Figure 7) ส่วนเชื้อ GYSVd-2 มีค่า Identities อยู่ระหว่าง 98-99% มีค่า Score อยู่ระหว่าง 632-656 bits และมีค่า Expect value อยู่ระหว่าง  $9e-178$  ถึง 0.0 (Figure 8) ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว

จากผลการทดสอบพบว่าคู่มือไพรเมอร์ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ GYSVd-1 และ GYSVd-2 กับตัวอย่างใบองุ่นได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่คู่มือไพรเมอร์เดิมที่เคยมีการรายงานไว้ คือ cV218 และ hV219 (Hannok, 2004) ไม่

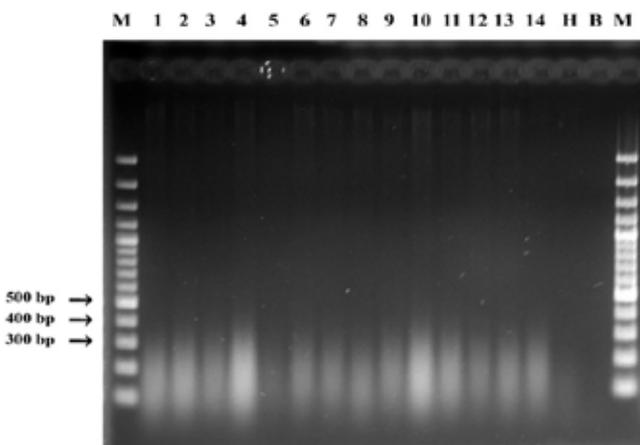


**Figure 4** Gel electrophoresis of RT-PCR products (approximately 360 bp) of grapevine leaf samples using specific GYSVd2 (upper) primers, grapevine leaf samples (lanes 1 to 14) compared with healthy plant (lane H), buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M)

สามารถนำมาใช้ตรวจเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ โดยเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) ของเชื้อ GYSVd-1 isolate ใหม่ กับ isolate YS-SB1 (accession number



**Figure 5** Gel electrophoresis of RT-PCR products of grapevine leaf samples using specific GYSVd2 (lower) primers, grapevine leaf samples (lanes 1to14) compared with healthy plant (lane H), buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M)



**Figure 6** Gel electrophoresis of RT-PCR products of grapevine leaf samples using specific cV218 and hV219 primers, grapevine leaf samples (lanes 1to14) compared with healthy plant (lane H), buffer (lane B) and 100 bp ladder molecular weight marker (lane M)

AY639606) ซึ่งเป็น isolate เดิมที่เคยมีการรายงาน (Hannok, 2004) พบว่าความเหมือนกันอยู่ในช่วง 67.21 ถึง 74.11% แสดงให้เห็นว่าเชื้อ GYSVd-1 ที่ตรวจพบในปี 2004 มีความแตกต่างกันอย่างมากกับเชื้อ GYSVd-1 ที่ตรวจพบในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากเชื้อ GYSVd-2 (*Grapevine yellow speckle viroid 2*) ยังไม่เคยมีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย ดังนั้นการสำรวจและตรวจวินิจฉัยโรคไวรอยด์ในองุ่นในครั้งนี้ จึงเป็นรายงานการตรวจพบเชื้อ GYSVd-2 เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ที่ อ.ปากช่อง และ อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา

## 5.2 วิเคราะห์จัดจำแนกความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์ ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2

จากการจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด คือ *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) ที่มีรายงานทั้งหมดใน NCBI ด้วยโปรแกรม MEGA 5.2 (ClustalW) พบว่าสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-1 ได้เป็น 5 กลุ่ม (Figure 9) และสามารถจัดกลุ่มความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-2 ได้เป็น 2 กลุ่ม (Figure 10)

ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-1 โดยการนำ Phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้เป็น 5 กลุ่มหลักดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อ GYSVd-1 ที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ เครือรัฐออสเตรเลีย

**Table 1** Detection of Grapevine yellow speckle viroid1 (GYSVd-1) and Grapevine yellow speckle viroid2 (GYSVd-2) by using GYSVd1 and GYSVd2 (upper) primers

Location	Sample No.	Symptom	Detected viroids	
			GYSVd-1	GYSVd-2
A. Muak Lek, Saraburi (v. 1)	1	Leaf roll with red color	-	-
	2	Malformation	-	-
	3	Green vein banding	-	-
A. Muak Lek, Saraburi (v.2)	1	Green vein banding	-	-
A. Pak Chong, Nakhon Ratchasima (v. 1)	1	Leaf roll with red color	-	-
A. Pak Chong, Nakhon Ratchasima (v. 2)	1	Mottling	+	-
	2	Necrosis spot	-	+
	3	Necrosis spot	-	+
	4	Necrosis spot	-	-
	5	Necrosis spot	-	+
A. Pak Chong, Nakhon Ratchasima (v. 3)	1	Green vein banding	-	-
	2	Necrosis spot	-	+
A. Wang Nam Khiao, Nakhon Ratchasima	1	Necrosis spot	+	+
	2	mottling	+	+
	3	mottling	+	+
A. Pak Chong, Nakhon Ratchasima (v. 4)	1	Necrosis spot	+	+
	2	Less necrosis spot	-	-
	3	mottling	+	+
	4	Necrosis spot	-	+
A. Pak Chong, Nakhon Ratchasima (v. 5)	1	Necrosis spot	-	+
<b>20 sample</b>			<b>6</b>	<b>11</b>

v. = vineyard

นิวซีแลนด์ สาธารณรัฐอิตาลี สาธารณรัฐตูนิเซีย ญี่ปุ่น สาธารณรัฐประชาชนจีน และประเทศไทย ซึ่งเคยมีรายงานตรวจพบในปี พ.ศ. 2547 (isolate YS-SB1: (accession number AY639606))

กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สาธารณรัฐอิตาลี สาธารณรัฐตูนิเซีย และ สาธารณรัฐประชาชนจีน  
กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ เครือรัฐออสเตรเลีย สาธารณรัฐอินเดีย และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

```
> Grapevine yellow speckle viroid 1 clone Boonmang-1, complete genome
CGGAUCACUUUCCUGUGGUUCCUGUGGUUACACCUCGGAAGGCCGCCGCGGACCUGCA
AAGAAGAAGAUAGGGGCAGAGGGGGAGUGAGCCUCGUCGUCGACGAAGGGGUGCACUC
CAAAGCUCCGAACUGGGCUCGUCGGCUCUCCUCGGAGCCUCGUCGUCUGGGCGGAA
GAGUCUUCUGACUUUUUCUAGCCUAUUCAGCAUUGCGCUCUUGAGGCCCGGGCAAACGC
GGUUCGUCGUCGAGGAUGCCUCCGCUAGUCGAGCGGACUUGGUCUCUUCGCCCAA
GCCCCUUUUUCUUUCAACUGAGCUUGUUCACGCGCCCCGCGAGUGGAAUCCCCGGAA
CCCCUGCAAAGAGGUCCU
```

**Figure 7** RNA sequence of Grapevine yellow speckle viroid 1 from cDNA product of grapevine plant sample (Accession :KP010005.1)

```
> Grapevine yellow speckle viroid 2 clone Poochidpha 16, complete genome
CGGAUCAUUUCCUUGUGGUUCCUGUGGUUACACCUCGGAAGGCCUCCGCGGACCUGC
AGAGAAAAGAAGAAGGGCCCAGAGGGGAAUGAGCCUCGUCGUCGACGAAGGGGUGCAU
UCCGAAGAGCUGGCCUGAGCGUCGUCGGCUCUCCUCGACCGCACCGGAGCGCCAGAA
AAGGUCCUCGGACUUUCUUCUAUCUCCGAAGUCGGUUGAGGCCCGGGCAAACGCGGG
CCUGUCUCCUAAGAUGCCUCCGCUAGUCGAGCGGACUUGGCCUCUUCGCCCGAGGAC
CUUUUCUUUCUGAUCUUGCUUGUUCACGAGCCCCGCGAGUGGAAUCCCCGGAACCC
CUGCGAAAAAGGGUCCU
```

**Figure 8** RNA sequence of Grapevine yellow speckle viroid 2 from cDNA product of grapevine plant sample (Accession:KP010021.1)

กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

และกลุ่มที่ 5 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

พบว่าเชื้อ GYSVd-1 ทั้ง 6 isolate ใหม่ จัดจำแนกอยู่กลุ่มที่ 2 และ 5 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่มีรายงานในประเทศ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐอิตาลี สาธารณรัฐตุนีเซีย และ สาธารณรัฐประชาชนจีน แต่ไม่ได้ถูกจัดจำแนก

ร่วมกลุ่มเดียวกันกับ isolate YS-SB1 ซึ่งมีรายงานการตรวจพบในปี พ.ศ. 2547 (Hannok and Reanwarakorn, 2005) ซึ่งถูกจัดจำแนกในกลุ่มที่ 1 แสดงให้เห็นว่าเชื้อ GYSVd-1 ที่ตรวจพบน่าจะติดเข้ามาพร้อมกับท่อนพันธุ์องุ่นนำเข้าจากคนละแหล่งประเทศกัน และด้วยเหตุผลนี้เองที่อาจเป็นสาเหตุให้คู่ไพรเมอร์ cV218 และ hV219 (Hannok, 2004) ไม่สามารถตรวจสอบพบเชื้อ GYSVd-1 isolate ใหม่ได้

นอกจากนี้จากการที่ผลการจัดจำแนก GYSVd-1 6 isolate ใหม่ มีการกระจายตัวแบ่ง

เป็น 2 กลุ่ม จึงมีความเป็นไปได้ดีกว่าปัจจุบัน พื้นที่ปลูกองุ่นในประเทศมีการปนเปื้อนเชื้อ GYSVd-1 จากการนำเข้าท่อนพันธุ์จากแหล่งระบาดของโรคมามากกว่า 3 แหล่งตามภาพที่ 9 คือกลุ่มประเทศที่ 1, 2 และ 5

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ GYSVd-2 โดยการนำ Phylogenetic tree พบว่าสามารถจำแนกความสัมพันธ์ได้เป็น 2 กลุ่มหลัก (Figure 10) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อ GYSVd-2 ที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สาธารณรัฐประชาชนจีน และ สาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

และกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศ สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐประชาชนจีน

พบว่าเชื้อ GYSVd-2 ทั้ง 11 isolate ใหม่ จัดจำแนกอยู่กลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อที่มีรายงานในประเทศ สหรัฐอเมริกา สาธารณรัฐอิตาลี และ สาธารณรัฐประชาชนจีน โดยเชื้อ isolate ใหม่ทั้งหมดมีระดับความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียงกันมาก แสดงให้เห็นว่า GYSVd-2 น่าจะมีการปนเปื้อนติดเข้ามาทับท่อนพันธุ์องุ่นนำเข้าเพียงครั้งเดียวจากแหล่งระบาดแหล่งเดียวกัน (กลุ่มที่ 2) แต่ไม่ได้ติดปนเปื้อนมาจากแหล่งระบาดในประเทศกลุ่มที่ 1 โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศสาธารณรัฐอิสลามอิหร่าน

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรอยด์องุ่นทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถบ่งชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของปัญหาการปนเปื้อนเชื้อไวรอยด์และไวรัสสาเหตุโรครองุ่นที่อาจติดมากับ

ท่อนพันธุ์องุ่นที่นำเข้าได้ ซึ่งมีความเสี่ยงอย่างมากที่จะทำให้เชื้อสาเหตุโรคพืชดังกล่าวติดเข้ามาตั้งรกราก (establish) และสร้างความเสียหายให้กับประเทศไทยได้ ดังนั้นการแก้ไขกฎหมาย ข้อกำหนด เงื่อนไขการนำเข้า ส่วนขยายพันธุ์องุ่นจึงมีความจำเป็น เพื่อที่จะสามารถดำเนินการควบคุมป้องกันการแพร่ระบาดของโรคพืช ได้อย่างทันทั่วถึง

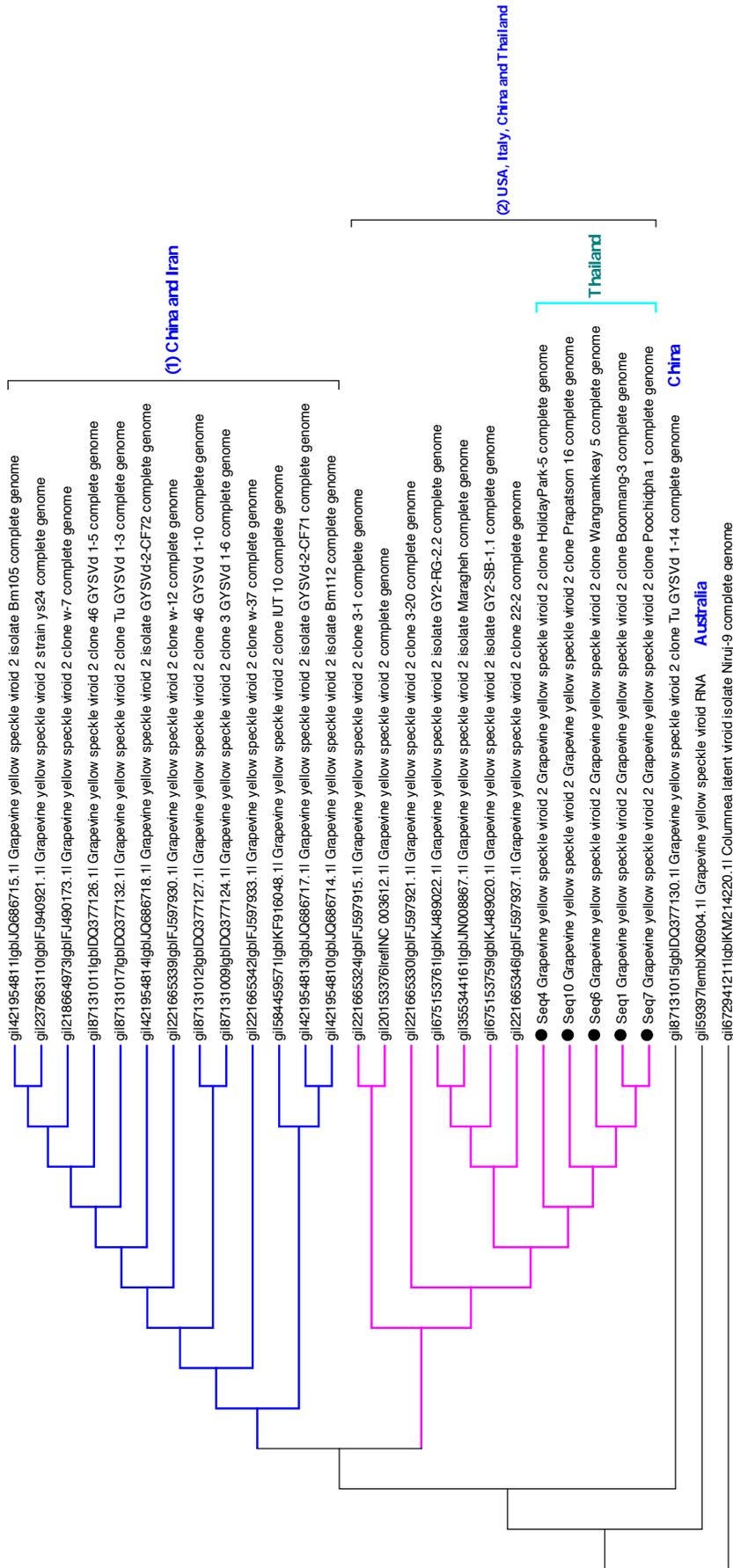
### สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าได้เทคนิคการตรวจสอบเชื้อ *Grapevine yellow speckle viroid 1* (GYSVd-1) และ *Grapevine yellow speckle viroid 2* (GYSVd-2) วิธีการใหม่ที่พัฒนาขึ้นมา มีประสิทธิภาพ โดยได้วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสมกับเนื้อเยื่อใบองุ่นและได้คูไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด คือ GYSVd1 และ GYSVd2 (upper) ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนขนาดประมาณ 350 จนถึง 390 คู่เบส นอกจากนี้ยังเป็นรายงานการตรวจพบเชื้อ GYSVd-2 เป็นครั้งแรกในประเทศไทยอีกด้วย

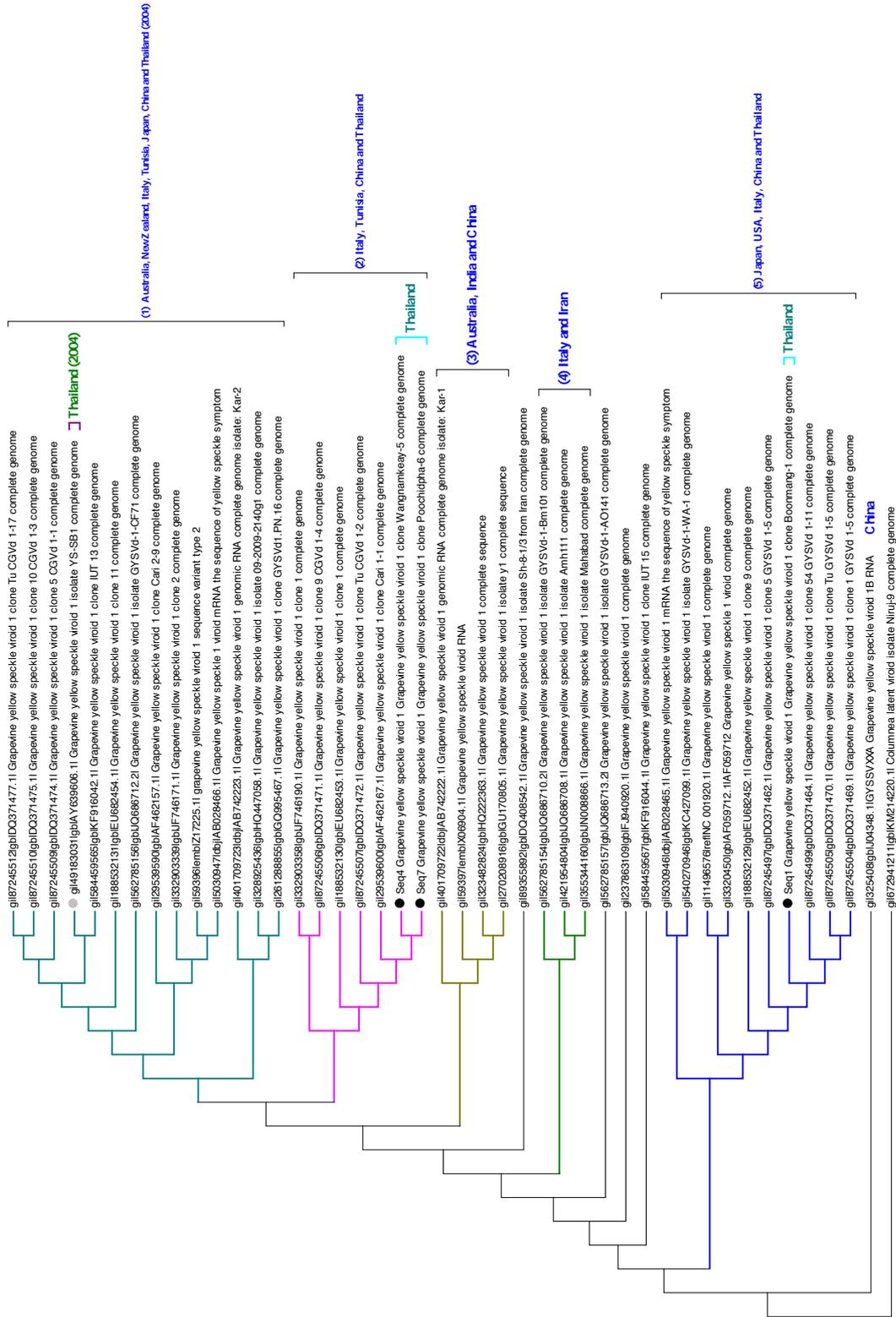
### เอกสารอ้างอิง

คณินนิตย์ เจริญวรารากร. 2556. *โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ (Viroid Disease of Plants)*. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม. 164 หน้า.

ปรีเชษฐ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. *การตรวจสอบ*



**Figure 9** GYSVd-1 Phylogenetic tree analysis by using MEGA version 5.2 of the Wangnamkeay-5, Poochidpha-6, and Boonmang-1 isolates in this work (indicated with dot) with GYSVd-1 isolates in GenBank database and Columnnea latent viroid (acc. No. KM214220) used as out-group



**Figure 10** GYSVd-2 Phylogenetic tree analysis by using MEGA version 5.2 of the Holiday Park-5, Prapatson 16, Wangnamkeay 5, Boonmang-3, and Poochidpha 1 isolates in this work (indicated with dot) with GYSVd-2 isolates in GenBank database and Columnea latent viroid (acc. No. KM214220) used as out-group

- เชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 85 หน้า.
- ปรีเชษฐ ตั้งกาญจนภาสณ์. 2557. *ไวรอยด์ (Viroid): เชื้อสาเหตุโรคพืช*. กลุ่มวิจัยโรคพืชสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืชกรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ. 129 หน้า.
- วรลักษณ์ รักร์แดง. 2545. *การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในองุ่น*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นครปฐม. 95 หน้า.
- Fristch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 186 p.
- Hannok, P. 2004. *Survey of Grapevine yellow speckle viroid in Thailand*. Thesis (M.S. (Agricultural Biotechnology)), Kasetsart University Nakhon Pathom. 52 p.
- Hannok, P. and K. Reanwarakorn. 2005. cDNA probe for Grapevine yellow speckle viroid Detection. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 39: 46-52.
- Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. *Viroids*. Science Publishers, Inc., USA. 370 P.
- Li, S.F., R. Guo, S. Peng and T. Sano. 2007. Grapevine yellow speckle viroid1 and Grapevine yellow speckle viroid2 Isolates From China. *Journal of Plant Pathology*. 89: S72 p.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. *Preparation of Plasmid DNA by Small-scale Boiling Lysis*. Pages 1.44-1.46. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Vol. 1. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Taylor, R.H. and R.C. Woodham. 1972. Grapevine yellow speckle - a newly recognized graft-transmissible disease of Vitis. *Australian Journal of Agricultural Research*. 23: 447-452.
- Thompson, J.R., S. Wetzel, M.M. Klerks, D. Vaskova, C.D. Schoen, J. Spak and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods*. 111: 85-93.