

การตรวจติดตามเชื้อไวรัสในส้มที่นำเข้ามาจากสาธารณรัฐประชาชนจีน
และมะนาวจากประเทศกัมพูชา

Interception of Citrus Viroid on Imported Orange from
Republic of China and Lime from Cambodia

ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์^{1/}

มานิตา คงชื่นสิน^{2/}

น็องวรรณ แซ่ลือ^{3/}

สุกัญญา หนูชู^{3/}

หทัยรัตน์ เจื่อนาค^{3/}

Parichate Tangkanchanapas^{1/}

Manita Kongchuensin^{2/}

Nionwan Saelor^{3/}

Sukanya Noochoo^{3/}

Hathairat Juenak^{3/}

ABSTRACT

Citrus viroids are an important group of pathogens that can cause various abnormal symptoms on citrus such as stunting, bark scaling, yellowing and epinasty of leaves stem pitting and gumming. They have never been found in Thailand. Recently, a great number of orange and lime fruits are imported from China and Cambodia respectively, which may lead to risk of viroid disease distribution. Inspection of the samplings of orange and lime fruits from June 2013 to May 2014. *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) and *Citrus viroid III* (CVd III) were determined using RT-PCR technique with specific PCR primer pairs. Only CBLVd and CVd III were detected with the CBLVd primers (c-CBLVd: GTCGACGACGACCAGTCAGCTCC / h-CBLVd: GAAGGCTCGTCAGCTGCGGAGG) and the CVd3 primers (c- CVd3: GTCGACGACGACAGGTAAG TTCCC / h- CVd3: GTCGACGACGACAGGTAAGTTCCC), which clearly generated amplification bands of

^{1/} กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ ฯ

^{1/} Plant Virology Section, Plant Pathology Research Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok

^{2/} สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขา กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ ฯ

^{2/} Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Bangkok

^{3/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ ฯ

^{3/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasertsart University, Bang Kean, Bangkok

around 320 and 300 base pairs, respectively. The presence of CBLVd and CVd III were confirmed by DNA sequencing and RNA secondary structure analysis. About 34.2% and 19.5% of 41 samples of imported lime fruit were infected with CBLVd and CVd III, respectively. In imported orange, CBLVd was detected for 62.3% of total fruit, whilst CVd III was found in 75.3%. This result indicates that CBLVd and CVd III present at a relatively high incidence in the imported citrus fruit. In addition, both viroid diseases are not yet found in Thailand and lack of information which leads to difficulties in determining their impact and for conducting pest risk analysis.

Key-words: *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Citrus viroid III* (CVd III), RT-PCR, Interception, orange, lime

บทคัดย่อ

ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าผลส้มและมะนาวจากสาธารณรัฐประชาชนจีน และประเทศกัมพูชาในปริมาณมาก ทำให้มีความเสี่ยงที่ไวรอยด์สาเหตุโรคพืชอาจปะปนติดเข้ามาได้ จากการตรวจติดตามเชื้อไวรอยด์ที่อาจปนเปื้อนเข้ามาที่ผลส้มและมะนาวที่นำเข้าตั้งแต่เดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2556 ถึงพฤษภาคม ปี

พ.ศ. 2557 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CBLVd (c-CBLVd: GTCGACGAC GACCAGTCAGCTCC / h-CBLVd:GAAGGC TCGTCAGCTGCGGAGG) และ CVd3 (c-CVd3: GTCGACGACGACAGG TAAGTTCCC / h-CVd3:GTCGACGACGACA GGTAAG TTCCC) สามารถตรวจพบเชื้อไวรอยด์ 2 ชนิด คือ *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) และ *Citrus viroid III* (CVd III) ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนขนาดประมาณ 320 และ 300 คู่เบสตามลำดับ แต่ไม่พบเชื้อ *Citrus exocortis viroid* (CEVd) และ *Hop stunt viroid* (HSVd) จากการตรวจสอบด้วยวิธีการดังกล่าวร่วมกับการพิสูจน์ยืนยันผลด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และโครงสร้างทุติยภูมิของลำดับอาร์เอ็นเอที่ได้ ผลการตรวจพบเชื้อ CBLVd 34.2% และ CVd III จำนวน 19.5% จากตัวอย่างผลมะนาวนำเข้าจากกัมพูชาจำนวนทั้งสิ้น 41 ตัวอย่าง และตรวจพบเชื้อ CBLVd จำนวน 62.3% และ CVd III จำนวน 75.3% จากตัวอย่างส้มนำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีนจำนวน 77 ตัวอย่าง เชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีปริมาณการปนเปื้อนที่สูงมาก และไม่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทยมาก่อน ข้อมูลที่ได้จึงมีความสำคัญต่อผลกระทบ และความเสี่ยงที่ประเทศไทยต้องเฝ้าระวังติดตาม

คำหลัก: *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Citrus viroid III* (CVd III), RT-PCR, การตรวจติดตาม, ส้ม มะนาว

คำนำ

ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์เรื่อง กำหนดพืช และพาหะจากแหล่งที่กำหนดเป็นสิ่งต้องห้าม ข้อยกเว้น และเงื่อนไข ตามพระราชบัญญัติกักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 5) ปี พ.ศ. 2550 ได้กำหนดให้ส่วนหนึ่งส่วนใดของพืชในสกุลซิตรีส (*Citrus* spp.) พืชสกุลฟอจูนลลา (*Fortunella* spp.) และ พืชสกุลพอนซิรัส (*Poncirus* spp.) ไม่ว่าจะเป็ผลสด กิ่งพันธุ์ หรือเมล็ดพันธุ์ เป็นสิ่งต้องห้าม การนำเข้าจะต้องผ่านการวิเคราะห์ความเสี่ยงศัตรูพืชตามหลักเกณฑ์ วิธีการ และเงื่อนไข ที่อธิบดีกรมวิชาการเกษตรกำหนด และต้องมีใบรับรองสุขอนามัยพืชของหน่วยงานผู้มีอำนาจของประเทศที่ส่งออกกำกับมาด้วยว่าส่วนหนึ่งส่วนใดของพืช นั้นปราศจากศัตรูพืชสำคัญทางกักกันพืชตามเงื่อนไขการอนุญาตนำเข้าสิ่งต้องห้าม โดยการตรวจรับรองปลอดศัตรูพืชอย่างเข้มงวดแต่จาก “พิธีสารส่งออกผักและผลไม้ไทย-จีน” ซึ่งมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 1 พฤษภาคม ปี พ.ศ. 2548 ทำให้มีการนำเข้าผลส้มจากสาธารณรัฐประชาชนจีนเข้ามาในประเทศไทยในปริมาณสูงมาก แต่ระดับความเข้มข้นในการตรวจสอบศัตรูพืชลดลง ส่งผลทำให้เกิดความเสี่ยงที่ศัตรูพืช อาจปะปนมากับผลส้มได้ โดยหนึ่งในศัตรูพืชที่สำคัญทางกักกันพืช คือ เชื้อไวรอยด์

เชื้อไวรอยด์ที่สามารถเข้าทำลายพืชกลุ่มส้มได้มี 6 ชนิด ได้แก่ *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd) หรือ *Citrus viroid*

I (CVdI)], *Citrus viroid* III (CVd III) [หรือ *Citrus dwarfing viroid* (CDVd)], *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd) และ *Citrus viroid* V (CVd IV) (Hadidi et al., 2003) ซึ่งก่อให้เกิดอาการผิดปกติในระดับที่รุนแรงจนถึงไม่แสดงอาการ เช่น ทำให้ต้นส้มแคระแกร็น ใบ และยอดเหลืองซีด เปลือกลำต้นแตกร่อน เรียกว่า exocortis disease (Fawcett and Koltz, 1948) อาการเนื้อไม้บวมมียางไหลและมีอาการเปลือกแตก เรียกว่า cachexia disease (Reanwarakorn and Semancik, 1999) ทำให้ผลมีขนาดเล็กและปริมาณผลผลิตลดลง (Semancik et al., 1997) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของไวรอยด์ และสายพันธุ์ส้มที่ปลูก (คณินนิตย์, 2556) เชื้อไวรอยด์เหล่านี้สามารถถ่ายทอดโรคทางวิธีกลได้ง่าย โดยผ่านทางวัสดุอุปกรณ์เกษตรที่ปนเปื้อนเชื้อ แต่ยังไม่มีการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์และแมลงพาหะ (Hadidi et al., 2003) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าเชื้อ CEVd สามารถทนทานต่อความร้อนและสารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อไวรัสได้สูงมาก (Roistacher et al., 1969) และยังสามารถถ่ายทอดโรคได้แม้เนื้อเยื่อพืชจะถูกทิ้งให้แห้งเป็นระยะเวลานาน (Allen, 1968) ทำให้การป้องกันกำจัดเชื้อทำได้ยาก นอกจากนี้เชื้อไวรอยด์ของส้มหลายชนิดยังมีการศึกษาไม่กว้างขวางนัก ทำให้มีข้อมูลน้อย ซึ่งยากต่อการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงของเชื้อว่าจะมีผลกระทบต่อพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ ในประเทศไทยหรือไม่

สำหรับประเทศไทยมีรายงานการตรวจ

พบไวรอยต์เพียงชนิดเดียวคือ CEVd ที่ตรวจพบในมะนาว (สมบุรณ์, 2545) ในขณะที่เชื้อ HSVd มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย เฉพาะในอุ้งน้เท่านั้น (วรลักษณ์, 2545) ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการตรวจพบในพืชกลุ่มส้ม ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเป็นเชื้อ HSVd คนละสายพันธุ์กัน สำหรับที่สาธารณรัฐประชาชนจีนมีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรอยต์ 4 ชนิด คือ CEVd Cvd I HSVd และ Cvd III (Crop Protection Compendium, 2007, Rizza and Catara, 2007, Wang *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังมีการนำเข้าผลมะนาวจากประเทศกัมพูชา ในปริมาณมากอีกด้วย จึงมีความเป็นไปได้ที่เชื้อไวรอยต์ดังกล่าวอาจติดเข้ามากับผลส้มที่นำเข้าจากสาธารณรัฐประชาชนจีน และผลมะนาวจากกัมพูชา ดังนั้นการตรวจติดตามเชื้อไวรอยต์นอกจากจะเป็นการยืนยันถึงคุณภาพของพืชผลที่นำเข้าจากประเทศเพื่อนบ้านแล้วยังทำให้ทราบถึงสถานะของศัตรูพืชสำคัญของประเทศเพื่อนบ้านสามารถนำมาดำเนินการวิเคราะห์และประเมินความเสี่ยงเพื่อกำหนดมาตรการ และออกเงื่อนไขการนำเข้าด้วย ทั้งยังเป็นการเตรียมความพร้อมให้กับประเทศในการเปิดตลาดการค้าเสรีเข้าสู่การเป็นประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน (ASEAN Economic Community: AEC) ใน ปี พ.ศ.2558 ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างผลส้มและมะนาวนำเข้า

สุ่มเก็บตัวอย่างผลส้มที่นำเข้าจาก

สาธารณรัฐประชาชนจีน ณ ด้านเชิงของ ด้านท่าเรือแหลมฉบัง โดยเจ้าหน้าที่ด่าน และสุ่มตัวอย่างที่ตลาดไท และตลาดนัดสหกรณ์กรมวิชาการเกษตร สุ่มเก็บผลมะนาวจากตลาดบริเวณติดกับชายแดนประเทศไทย ใน จ.จันทบุรี สระแก้ว เพชรบูรณ์ ชลบุรี และ อัญประเทศ ตั้งแต่เดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2556 ถึง พฤษภาคม ปี พ.ศ. 2557 ตัวอย่างส้มที่สุ่มเก็บเป็นส้มที่มีการนำเข้าอย่างถูกต้อง มีเอกสารประกอบการนำเข้าครบถ้วน (ใบรับรองสุขอนามัยพืช ใบขนส่งสินค้าขาเข้าพร้อมแสดงรายการภาษีสรรพสามิต และภาษีมูลค่าเพิ่ม ใบตราส่งสินค้าทางเรือ และใบส่งของ) ในขณะที่ตัวอย่างมะนาวจากประเทศกัมพูชาจะสุ่มเก็บจากมะนาวที่นำเข้าโดยพ่อค้านำเข้ามาเองไม่ผ่านด่านจึงไม่มีเอกสารการนำเข้า

2. การตรวจสอบเชื้อไวรอยต์โดยวิธีการ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

2.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างพืช

สกัดอาร์เอ็นเอจากเนื้อเยื่อพืชบริเวณหัวผลของตัวอย่างส้ม และมะนาวด้วยวิธี CTAB method (ปริเชษฐ์, 2548) 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% Na₂SO₃ และ 2.0% PVP-40 โดย Na₂SO₃ และ PVP-40 เติวก่อนใช้) ปริมาตร 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 65 °C 30 นาที ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที

เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 750 μ l ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 750 μ l ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 600 μ l ใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamylalcohol (24:1) ปริมาตร 600 μ l. ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกัน ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บของเหลวส่วนบนปริมาตร 400 μ l เติม 5 μ mol/L NaCl ปริมาตร 200 μ l และ isopropanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 600 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20°C ซ้ำมคืน เพื่อตกตะกอนกรดนิวคลีอิก นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนกรดนิวคลีอิก จากนั้นละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE buffer ที่มี 1% SDS ปริมาตร 200 μ l เติม 5 μ mol/L NaCl ปริมาตร 100 μ l และ isopropanol ที่แช่เย็น 300 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดทดลองและบ่มที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนกรดนิวคลีอิกด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 μ l ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease ปริมาตร 50-100 μ l เก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปตรวจสอบหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ในขั้นต่อไป

2.2 การตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการควบคุมภายใน (internal control)

นำสารสกัดอาร์เอ็นเอมาตรวจสอบคุณภาพด้วยวิธีการควบคุมภายใน โดยตรวจติดตามยีน NdhB ซึ่งเป็น housekeeping gene ในพืช เพื่อป้องกันการเกิดปัญหาผลลบเทียม (false negative) ในขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสด้วยวิธีอิมมูโนโพรบ NAD (Nad2.1a: GGACTCCTGACGTATACGAAGGATC และ Nad2.2b: AGCAATGAGATTCCCAATATCAT) (Thompson *et al.*, 2003) จากนั้นตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR โดยมีส่วนผสมของสารต่อ 1 ปฏิกริยาดังนี้: กรดนิวคลีอิกที่ได้จากการสกัดพืชทดสอบ 1 μ l กับไพรเมอร์ Nad2.1a และ Nad2.2b ความเข้มข้น 2 μ mol/L ปริมาตรเส้นละ 2 μ l 2X Reaction Mix buffer ปริมาตร 10 μ l น้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease ปริมาตร 4.5 μ l และเอ็นไซม์ SuperScriptTM III RT / Platinum[®] Taq Mix ปริมาตร 0.5 μ l จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้: อุณหภูมิ 48°C นาน 50 นาที จำนวน 1 รอบ, 94°C นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ, denaturation temperature 94°C นาน 30 วินาที, annealing temperature 56°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 นำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 7 μ 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 และนำไปตรวจแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี ด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้จากไพรเมอร์ NAD จะมีขนาด 188 คู่เบส

2.3 ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส

ตรวจสอบเชื้อไวรัสที่มีความเสี่ยงที่อาจติดเข้ามากับผลส้ม และมะนาวจากสาธารณสุขประชาชนจีนและประเทศกัมพูชา โดยไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจ (ปริเชษฐ, 2553) ประกอบไปด้วย

1. ไพรเมอร์สำหรับตรวจเชื้อ *Citrus exocortis viroid* (CEVd)

c-CEVd:
(CCGGGGATCCCTGAAGGACTT)

h-CEVd:
(GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG)

2. ไพรเมอร์สำหรับตรวจเชื้อ *Hop stunt viroid* (HSVd)

c-HSVd:
(TCGGAAGAGCCAGAAGG)
h-HSVd:
(TGAGACGCGACCGGTGGCATCACCT)

3. ไพรเมอร์สำหรับตรวจเชื้อ *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd)

c-CBLVd:
(GTCGACGACGACCAGTCAGCTCC)

h-CBLVd:

(GAAGGCTCGTCAGCTGCGGAGG)

4. ไพรเมอร์สำหรับตรวจเชื้อ *Citrus viroid III* (CVd III)

c-CVd3:
(GTCGACGACGACAGGTAAGTTCCC)

h-CVd3:
(GAAGGCAGCTAAGTTGGTGACGCC)

2.4 การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR

ตรวจสอบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอพืชที่สกัดได้ ด้วยปฏิกิริยา One-Step RT-PCR (Invitrogen) โดยส่วนผสมของปฏิกิริยามีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้: ผสมกรดนิวคลีอิกที่สกัดจากพืชทดสอบ 1 μ l กับไพรเมอร์ความเข้มข้น 2 μ mol/L ปริมาตรเส้นละ 2 μ l 2X Reaction Mix buffer ปริมาตร 10 μ l น้ำกลั่นที่ปราศจาก nuclease ปริมาตร 4.5 μ l และเอ็นไซม์ Super Script™ III RT / Platinum® Taq Mix ปริมาตร 0.5 μ l จากนั้นนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler โดยตั้งโปรแกรมดังนี้

เชื้อ CEVd: 48 °ซ นาน 45 นาที จำนวน 1 รอบ 94 °ซ นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ denaturation temperature 94 °ซ นาน 30 วินาที, annealing temperature 56 °ซ นาน 30 วินาที, extension temperature 72 °ซ นาน 30 วินาที จำนวน 35 รอบ และ extension temperature สุดท้าย 72 °ซ นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ สำหรับเชื้อ HSVd CBLVd และ CVd III จะเปลี่ยนใช้ annealing temperature

เป็น 42, 60 และ 61 ไร่ ตามลำดับ

จากนั้นนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ปริมาตร 7 μ l ตรวจสอบขนาดด้วยวิธี Gel electrophoresis ภายใต้อุปกรณ์ต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยใช้ agarose gel เข้มข้น 2.0 % ในสารละลาย 0.5X TBE buffer และย้อม gel ด้วย ethidium bromide ตรวจแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี ด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator โดยดีเอ็นเอเชื้อไวรัสที่ได้จะมีขนาดตั้งแต่ 260 ถึง 470 คู่เบส ขึ้นกับชนิดของเชื้อ

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส

นำผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่ได้เชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy (Promega) ตามวิธีการที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ถ่ายโอนเข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ Library efficiency DH5 α competent cells (Invitrogen) โดยใช้วิธีการ heat shock transformation (Fristch *et al.*, 2001) จากนั้นตรวจสอบโคลนที่ได้และสกัดพลาสมิดด้วยวิธีการ Small-Scale Boiling Lysis method (Sambrook and Russell, 2001) และส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาวิเคราะห์จำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่ตรวจพบด้วยโปรแกรม Blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างผลส้มและมะนาวนำเข้า

ปริมาณผลส้ม และมะนาวที่ได้จากการสุ่มเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้งจะมีจำนวนผลมะนาวอยู่ระหว่าง 30 ถึง 360 ผล (Table 1) และจำนวนผลส้มอยู่ระหว่าง 5 ถึง 100 ผล (Table 2)

2. การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธีการ RT-PCR

2.1 การตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการควบคุมภายใน (internal control)

ผลการตรวจคุณภาพอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากวิธีการ CTAB method โดยใช้ไพรเมอร์ NAD ตรวจติดตาม mRNA ของยีน NdhB สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาด 188 คู่เบส ได้อย่างชัดเจน (Figure 1) แสดงให้เห็นว่าอาร์เอ็นเอที่ได้มีคุณภาพดี สามารถนำมาตรวจสอบหาเชื้อไวรัสทั้ง 4 ชนิดได้

2.2 การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสทั้ง 4 ชนิดในตัวอย่างผลมะนาว และส้มที่นำเข้ามาจำนวน 41 และ 77 ตัวอย่าง ตามลำดับ ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 320 คู่เบสที่ชัดเจน กับไพรเมอร์ CBLVd (Figure 2 and 3) กับตัวอย่างผลมะนาว จำนวน 14 ตัวอย่าง และผลส้ม จำนวน 48 ตัวอย่างและได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 300 คู่เบส กับไพรเมอร์ CVd3 (Figures 4 and 5) กับ

Table 1 Sampling sites, period, number of samples and sampling size of lime imported from Cambodia

Type of fruit	sampling sites	period	No. of sampling	sampling size (fruits)	
Lime	Chanthaburi	June, 2013	1	250	
		March, 2014	14	25 - 30	
		April, 2014	3	30	
		May, 2014	8	30	
	Aranyaprathet	June, 2013	2	180 and 250	
		July, 2013	1	140	
	Chon Buri	July, 2013	2	80 and 360	
	Phetchabun	March, 2014	5	30	
		April, 2014	1	30	
		May, 2014	2	30	
	Sa Kaeo	March, 2014	1	30	
		April, 2014	1	30	
	Total			41	

Table 2 Sampling sites, period, number of sample and sampling size of orange imported from Republic of China

Type of fruit	sampling sites	period	No. of sampling	sampling size (fruits)	
Orange	Chiang Khong PQS	October, 2013	12	15 - 100	
		November, 2013	21	7 - 31	
		December, 2013	12	6 - 27	
		January, 2014	5	5 - 10	
	Laemchabang Port PQS	February, 2014	3	30	
		March, 2014	14	30	
	Talaad Thai	December, 2013	3	16 - 27	
		January, 2014	1	5 - 10	
		February, 2014	5	10	
	DOA market fair	December, 2013	1	22	
	Total			77	

Chiang Khong PQS = Chiang Khong Plant Quarantine station, Laem chabang Port PQS = Laemchabang Port Plant Quarantine station



Figure 1 Electrophoretic analysis of DNA bands (188 base pairs), by RT-PCR of NdhB gene with NAD primers (lane 1 to 18 are orange fruit samples, H is healthy plant and M is 100 bp DNA Ladder)

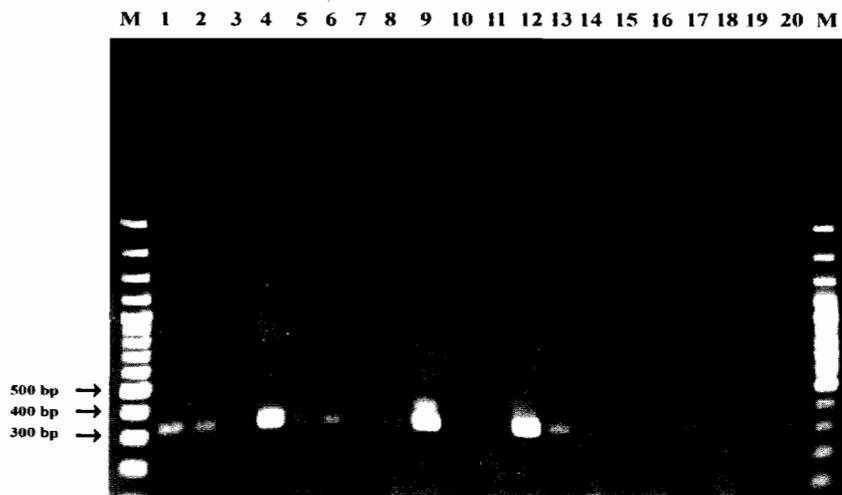


Figure 2 Electrophoretic analysis of DNA bands (around 320 base pairs), by RT-PCR of CBLVd primers (lane 1 to 20 are lime fruit samples and M is 100 bp DNA Ladder)

ตัวอย่างผลมะนาว จำนวน 8 และผลส้ม 58 ตัวอย่างซึ่งแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาดใกล้เคียงกันกับเชื้อไวรัสในชั้นถัดไปจึงนำเอาแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เพื่อยืนยันผลการตรวจ

จากผลการตรวจสอบพบว่าคู่ไพรเมอร์ CVd3 ให้แถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะขนาดประมาณ 250 คู่เบส เกิดขึ้นด้วย (Figure 4 and 5) ซึ่ง

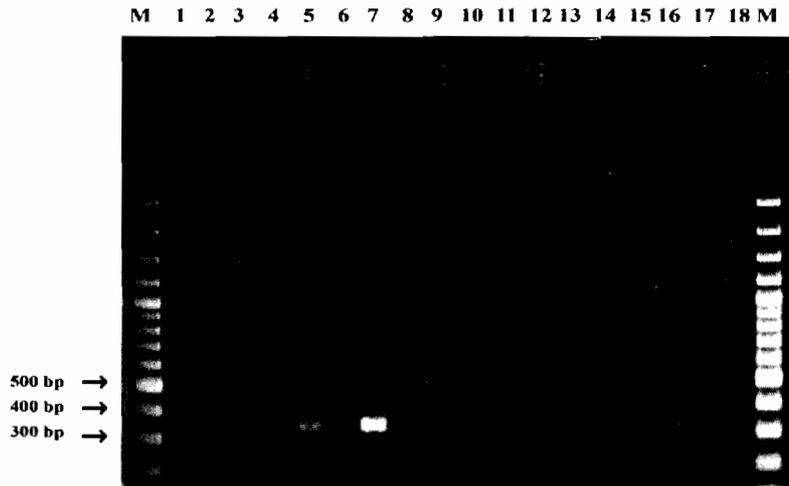


Figure 3 Electrophoretic analysis of DNA bands (around 320 base pairs), by RT-PCR of CBLVd primers (lane 1 to 18 are orange fruit samples and M is 100 bp DNA Ladder)

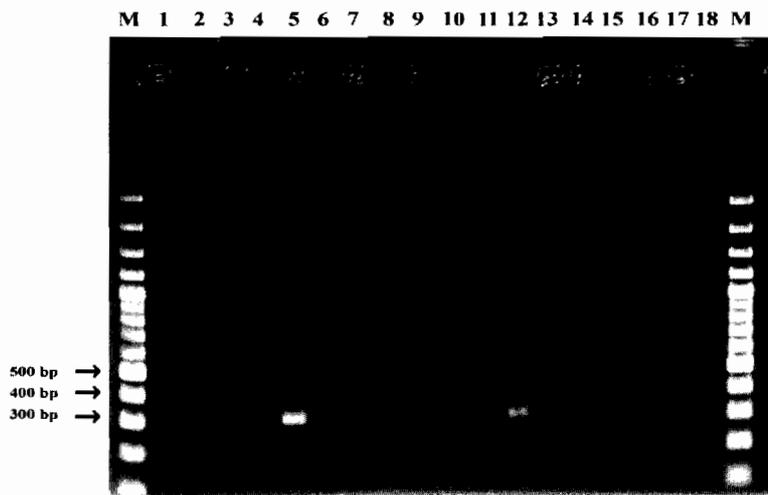


Figure 4 Electrophoretic analysis of DNA bands (around 300 base pairs), by RT-PCR of CVd3 primers (lane 1 to 18 are lime fruit samples and M is 100 bp DNA Ladder)

จากผลการตรวจสอบด้วยวิธีการหาและวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ พบว่าเป็นเอ็ม-อาร์เอ็นเอ (messenger RNA) ของสั้มที่มีชื่อว่า “Citrus Sinensis Frigida-like protein 4A- Like” ซึ่ง

ไพรเมอร์ดังกล่าวไปจับได้ จึงทำให้เกิดแถบดีเอ็นเอซ้อนขึ้นมา ดังนั้นจึงควรแก้ไขการออกแบบไพรเมอร์ CVd3 ใหม่ให้จำเพาะเจาะจง จึงเป็นวิธีการที่ดีในการแก้ปัญหาดังกล่าว



Figure 5 Electrophoretic analysis of DNA bands (around 300 base pairs), by RT-PCR of CVd3 primers(lane 1 to 14 are orange fruit samples and M is 100 bp DNA Ladder)

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส

เมื่อนำผลผลิต RT-PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ CBLVd มีขนาดตั้งแต่ 325-328 นิวคลีโอไทด์ และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ CVd3 มีขนาดตั้งแต่ 293-294 นิวคลีโอไทด์เมื่อนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยอาศัยโปรแกรม Blastn ใน GenBank พบว่า แถบดีเอ็นเอทั้ง 2 มีความเหมือนกันกับ

เชื้อ CBLVd และ CVd III ตามลำดับ โดยเชื้อ CBLVd มีค่า Identities เท่ากับ 99% มีค่า Score อยู่ที่ 584 bits และมีค่า Expect value ที่ $2e-163$ (Figure 6 and 7) ส่วนเชื้อ CVd III มีค่า Identities เท่ากับ 99% มีค่า Score อยู่ที่ 531 bits และมีค่า Expect value ที่ $2e-147$ (Figure 8 and 9) ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้เป็นเชื้อไวรัส CBLVd และ CVd III

```
AGACUUCUUGUGGGUUCUGUGGGUGACACCCUCAGCCUGCCUGCGAAAGAAAAAGU
CAUUAGAAGGCGCCAGAGGAGACUGAGCGGUCGUCGACGAAGGCUCCUCAGUCG
CAGAGCGCCGCUUGGAUCGACUGGCCUCCGGUGGAAAACGAAGAUUCGUCUUCUUUC
UGUAACCGGACCGGUCUCCUUCGGCCGCCGAGCGCUGGUUGCCGCUAGUCGAGCGGA
CUCCGUCUCUUCUCCUCCGAGGCGCUUUUCUCUUUGACCGACUCCGUAGCAGCGG
GGAGAGGGUGAAGCCCGUGAACCCUGAGGGCUCCUC
```

Figure 6 RNA sequence of *Citrus bent leaf viroid* from lime fruit sample (accession number KM214207)

AGACUUCUUGUGGUUCCUGUGGGUGACACCCCUCAGCCCUACCUUGCGAAAGAAAAAGU
CAUUAGAAGGCGCCAGAGGAGACUGAGCGGUCGUCGUCGACGAAGGCUCCUCAGUCG
CAGAGCGCCGCGUGGAUCGACUGGCCUCCGGUGGAAAACGAAGAUUCGUCUUCAAUUUC
UGUAACCGGACCGGUCUCCUUCGGCCGCGAGCGCUGGUUGCCGCUAGUCGAGCGGA
CUUCCGUCUCUUCUCCUCCGAGGGCGCUUUUCUCUUGACCGACUUCCGUAGCAGCGG
GGAGAGGGUGAAGCCCCGUGAACCCUGAGGGCUCCUCGG

Figure 7 RNA sequence of *Citrus bent leaf viroid* from orange fruit sample (accession number KM214213)

GAGGAAACUCCGUGUGGUUCCUGUGGGGCACACCCCCUUGCCGAAAAUAAAACGCAGA
GAGGGAAAGGGGAACUUACCUUGUCGUCGUCGACGAAGGCAGCUAAGUUGGUGACGCC
GAGUGGAGUAAAGACGGAGAGUCUCCGCUAGUCGGAAAGACUCCGCAUCCUCCGGCAG
ACCCUUCUAGCUCCCGCUAGUCGAGCGGACAACUGAGUGAGUUGUCCCAAUCCUAAUC
UGUUUUUAUUUAGGCUAGAAGGGGAUUGGGCCUCCAGGGUAAAACACGAUUGGUGUUU
CCCCG

Figure 8 RNA sequence of *Citrus viroid* III from lime fruit sample (accession number KM214214)

GAGGAAACUCCGUGUGGUUCCUGUGGGGCACACCCCCUUGCCGAAAAUAAAACGCAGA
GAGGGAAAGGGGAACUUACCUUGUCGUCGUCGACGAAGGCAGCUAAGUUGGUGACGCCGA
GUGGAGUAAAGACGGAGAGUCUCCGCUAGUCGGAAAGACUCCGCAUCCUCCGGCAGAC
CCUUCUAGCUCCCGCUAGUCGAGCGGACAACUGAGUGAGUUGUCCCAAUCCUAAUCUG
UUUUUAUUUAGGCUAGAAGGGGAUUGGGCCUCCAGGGUAAAACACGAUUGGUGUUUCC
CCG

Figure 8 RNA sequence of *Citrus viroid* III from orange fruit sample (accession number KM214215)

จากผลการตรวจติดตามเชื้อไวรัสที่
ปนเปื้อนเข้ามาที่ผลส้มที่นำเข้าจากสาธารณรัฐ
ประชาชนจีนจำนวน 77 ครั้ง และผลมะนาวที่
นำเข้าจากประเทศกัมพูชาจำนวน 41 ครั้งตั้งแต่
เดือนมิถุนายน ปี พ.ศ. 2556 ถึง พฤษภาคม

ปี พ.ศ. 2557 ตรวจพบเชื้อ CBLVd จำนวน 14
ครั้ง (34.2%) และ CVd III จำนวน 8 ครั้ง
(19.5%) จากตัวอย่างมะนาวที่มีการนำเข้า 41
ครั้ง (Table 3) ในขณะที่ผลส้มนำเข้าจาก
สาธารณรัฐประชาชนจีนจำนวน 77 ครั้งตรวจ

Table 3 Number of viroids detected in lime fruit samples imported from Cambodia

Type of fruit	sampling sites	period	no. of sampling/ month	no. of detected samples				
				CBLVd	CVd III	CEVd	HSVd	CBLVd + CVd III
Lime	Chanthaburi	June, 2013	1	-	-	-	-	-
		March, 2014	14	1	-	-	-	-
		April, 2014	3	3	1	-	-	1
		May, 2014	8	6	2	-	-	2
	Aranyaprathet	June, 2013	2	-	2	-	-	-
		July, 2013	1	-	-	-	-	-
	Chon Buri	July, 2013	2	-	2	-	-	-
	Phetchabun	March, 2014	5	-	-	-	-	-
		April, 2014	1	1	1	-	-	1
		May, 2014	2	2	-	-	-	-
	Sa Kaeo	March, 2014	1	-	-	-	-	-
		April, 2014	1	1	-	-	-	-
	Total		41	14	8	-	-	3

Table 4 Number of viroids detected in orange fruit samples imported from China

Type of fruit	sampling sites	period	no. of sampling/ month	no. of detected samples					
				CBLVd	CVd III	CEVd	HSVd	CBLVd + CVd III	
Orange	Chiang Khong PQS	October, 2013	12	7	11	-	-	6	
		November, 2013	21	12	12	-	-	9	
		December, 2013	12	6	10	-	-	6	
		January, 2014	5	5	5	-	-	5	
	Laemchabang Port PQS	February, 2014	3	3	3	-	-	3	
		March, 2014	14	6	9	-	-	-	
	Talaad Thai	December, 2013	3	2	2	-	-	1	
		January, 2014	1	1	-	-	-	-	
		February, 2014	5	5	5	-	-	5	
	DOA fair	market	December, 2013	1	1	1	-	-	1
	Total			77	48	58	-	-	36

Chiang Khong PQS = Chiang Khong Plant Quarantine station, Laemchabang Port PQS = Laemchabang Port Plant Quarantine station

พบเชื้อ CBLVd จำนวน 48 ครั้ง (62.3%) และ CVd III จำนวน 58 ครั้ง (75.3%) (Table 4) ซึ่งเป็นปริมาณการปนเปื้อนที่สูงมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ CBLVd และ CVd III อย่างไรก็ตามจากการตรวจติดตามดังกล่าวไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อไวรอยด์ 2 ชนิดคือ *Citrus exocortis viroid* และ *Hop stunt viroid* ที่มีรายงานในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และสาธารณรัฐประชาชนจีน อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีการกระจายน้อยมากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และสาธารณรัฐประชาชนจีนเมื่อเทียบกับเชื้อ CBLVd และ CVd III และเนื่องจากเชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีกลไกในการถ่ายทอดโรคผ่านทางกิ่งพันธุ์ การติดตา ตอนกิ่ง และทางวิธีกล แต่จะไม่ถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ และละอองเกสร (Hadidi *et al.*, 2003)

สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองได้เทคนิคใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อ CBLVd และ CVd III ได้แถบดีเอ็นเอที่ชัดเจนขนาดประมาณ 320 และ 300 คู่เบส ตามลำดับ และเมื่อนำมาใช้ตรวจสอบผลส้มที่นำเข้ามาจากประเทศกัมพูชาและผลส้มจากสาธารณรัฐประชาชนจีน สามารถตรวจพบเชื้อ CBLVd และ CVd III ติดเข้ามากับผลมะนาวจำนวน 14 ตัวอย่าง (34.15%) และ 8 ตัวอย่าง (19.51 %) ตามลำดับในขณะที่ผลส้มนำเข้าตรวจพบเชื้อ CBLVd จำนวน 48 ตัวอย่าง และ CVd III จำนวน 58 ตัวอย่าง (คิด

เป็น 62.34 และ 75.32% ตามลำดับ) แต่ตรวจไม่พบเชื้อ *Citrus exocortis viroid* และ *Hop stunt viroid*

การปนเปื้อนของเชื้อ CBLVd และ CVd III ที่ติดเข้ามากับผลมะนาว และส้มที่นำเข้าอาจส่งผลกระทบต่อเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวตั้งรกราก (establish) และแพร่กระจายในประเทศไทยได้ แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากปัจจุบันข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อเหล่านี้ยังมีน้อย จึงทำให้ยากต่อการทราบถึงผลกระทบและความเสี่ยงที่ชัดเจนของเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ ดังนั้นประเทศไทยจึงควรมีมาตรการเฝ้าระวัง (surveillance) และมีความเข้มงวดในการควบคุมการลักลอบนำเข้ากิ่งหรือตาพันธุ์พืชกลุ่มส้ม หรือกำหนดมาตรการทางกฎหมายอื่น ๆ เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิดนี้เข้ามาแพร่ระบาด และทำความเสียหายแก่ผลผลิตในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- คณินันต์ เทริญวารกร. 2556. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ (*Viroid Disease of Plants*). ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 164 หน้า.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า.

- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2553. *การพัฒนาเทคนิคการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR*. ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม, กรมวิชาการเกษตร. 18 หน้า.
- วรลักษ์ณ์ รักษะแดง. 2545. *การตรวจสอบเชื้อไวรัสในองุ่น*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 95 หน้า.
- สมบูรณ์ พรหมมา. 2545. *การตรวจสอบเชื้อไวรัสในมะนาว*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 94 หน้า.
- Allen, R.M. 1968. Survival time of exocortis virus of citrus on contaminated knife blades. *Plant. Dis. Repr.* 52: 935-939.
- CAB international. 2007. *Crop Protection Compendium 2007 Edition*. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.
- EPPO.2006. PQR database (version 4.5). Paris, France: European and Mediterranean Plant Protection Organization. www.eppo.org.
- CABI/EPPO. 2007. *Citrus exocortis viroid*. Distribution Maps of Plant Diseases, No. 291. Wallingford, UK: CAB International.
- Fawcett, H.S. and L.J.Koltz, 1948. Exocortis on trifoliate orange. *Citrus Leaves*. 28: 8.
- Fristch, E.F., J. Sambrook and T. Maniatis. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 186 p.
- Hadidi, A., R. Flores, J.W. Randles and J.S. Semancik. 2003. *Viroids*. Science Publishers, Inc., USA. 370 P.
- Reanwarakorn, K., and J.S. Semancik, 1999. Discrimination of Cachexia disease agents among citrus variants of *Hop stunt viroid*. *Ann. appl. Biol.* 135: 481-487.
- Rizza, S. and A. Catara. 2007. Detection of Multiple Infections of *Citrus exocortis viroid*, *Citrus viroid III*, and *Hop stunt viroid* Variants in Hunan Province, China. *Plant Disease*. 91: 1205.
- Roistacher, C.N., E.C. Calavan and R.L. Blue. 1969. Citrus exocortis virus - chemical inactivation on tools and tolerance to heat and separation of isolates. *Plant. Dis. Rep.* 53: 333 - 336.
- Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. "Preparation of Plasmid DNA by Small-scale Boiling Lysis." *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. Vol.1. 1.44-1.46

- Semancik, J.S., A.G. Rakowski, J.A. Bash, D.J. Gumpf. 1997. Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of "Valencia" orange. *J Horticult Sci.* 72:563–570.
- Thompson, J.R., S. Wetzels, 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. *J Virol Methods.* 111: 85-93.
- Wang, X.F., C.Y. Zhou, K.Z. Tang and Z.A. Li. 2008. Occurrence of Four Citrus Viroids in Chongqing, China. *Plant Disease.* 92: 978 p.
- Whittle, A.M. 1992. Diseases and pests of citrus in Vietnam. *FAO Plant Protection Bulletin.* 40(3):75-81.