



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง จีโนมของบานานาบันช์ท็อปไวรัสและเทคนิคการตรวจสอบ

Genome of *Banana bunchy top virus* and Detection Techniques

นามผู้วิจัย นางสาวพิกุลแก้ว วงศ์สุวรรณ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ศรีเมฆ ชวโพงพาง, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์อำไพวรรณ ภราดรน์วัฒน์, วท.ค.)

หัวหน้าภาควิชา

(อาจารย์อนงค์นุช ศาสนรักกิจ, Ph.D)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

จีโนมของบานานาบันช์ท็อปไวรัสและการตรวจสอบ

Genome of *Banana bunchy top virus* and Detection Techniques

โดย

นางสาวพิกุลแก้ว วงศ์สุวรรณ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พิบูลแก้ว วงศ์สุวรรณ 2556: จีโนมของบานานาบ้นซีทอปไวรัสและเทคนิคการตรวจสอบ
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, Ph.D. 91 หน้า

กล้วยเป็นพืชที่ปลูกทั่วไปในเขตร้อนชื้นทั่วโลก มักถูกทำลายด้วยโรคและแมลงต่างๆ เช่น
เชื้อรา แบคทีเรียและไวรัส บานานาบ้นซีทอปไวรัส (BBTV) เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคใน
กล้วยบางพันธุ์โดยเฉพาะกล้วยหอม ลักษณะอาการทำให้เกิดยอดอ่อน แคระแกร็นและไม่ให้ผลผลิต
หรือทำให้เสียหาย เชื้อไวรัสสาเหตุนี้อยู่ในแฟมิลี Nanoviridae โดยมีเปลือกอ่อนกล้วย (*Pentalonia*
nigronervora) เป็นแมลงพาหะแบบ circulative persistent ทำการสกัดดีเอ็นเอไวรัสจากใบกล้วยที่
ถูกเชื้อเข้าทำลายด้วยวิธีสกัดพลาสติก ทวีจีโนมทั้ง 6 ชิ้น ด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่
เป็น Universal, U_BBTVF 5' CCC MGY GCT CRG GAC GGG ACA T 3' และ U_BBTVR 5'
GGG TAA TAA TAR KCC CCM GYG C 3' และโคลนเข้าสู่ pCR[®]-XL-TOPO[®] cloning vector
แต่ละ component มีลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์ 9 ตัว TATTATTAC บนโครงสร้างของ Stem loop
common region (CR-SL), Major Common Region (CR-M), TATA box and poly A signal ลำดับ
นิวคลีโอไทด์แต่ละ component ตั้งแต่ 1-6 BBTV DNA1-TH ถึง BBTV DNA6-TH มีขนาด
1,105 bp 1,053 bp 1,076 bp 1,047 bp 1,008 bp 1,078 bp ตามลำดับ และ BBTV DNA1-TH ถึง
BBTV DNA6-TH ผลิตโปรตีนที่จำเพาะแต่ละ component คือ replication protein, unknown
protein, viral coat protein, cell-to-cell movement protein, retinoblastoma binding-like protein,
nuclear shuttle protein ตามลำดับ ยกเว้น BBTV DNA2-TH ไม่ผลิตโปรตีน จากข้อมูลจีโนม
เหล่านี้ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ การกระจายและแหล่งกำเนิดต่อไป เมื่อใช้เทคนิคพีซีอาร์
และ dot blot hybridization ตรวจสอบตัวอย่างที่แสดงอาการของโรค Banana bunchy top disease
(BBTD) พบเชื้อไวรัส BBTV ซึ่งในกล้วยหอม กล้วยไข่ กล้วยเล็บมือนาง ตรวจพบมากที่สุด ส่วน
พุทธรักษานั้นตรวจไม่พบเชื่อดังกล่าว เทคนิคเหล่านี้สามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส BBTV
ในกล้วยได้อย่างแม่นยำ

ลายมือชื่อนิติสด

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Pikulkaew Wongsuwan 2013: Genome of *Banana bunchy top virus* and Detection Techniques. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Mr. Srimek Chowpongpan, Ph.D. 91 pages.

Banana are cultivated in tropical zone world wide. They are attracted by plant pathogen and insect pest such as fungi, bacteria and virus, *Banana bunchy top virus* (BBTV) caused disease in Cavendish banana appearing as bunchy top leaf, stunted and yield loss. It belong to family Nanoviridae and transmitted by banana aphid (*Pentalonia nigronervora*) insect vector. Viral DNAs were isolated from infected leaf by alkaline lysis plasmid DNA extraction method. The total six DNA components were amplified by PCR method using universal primer U_BBTVF 5' CCC MGY GCT CRG GAC GGG ACA T 3' and U_BBTVR 5' GGG TAA TAA TAR KCC CCM GYG C 3', then cloned into pCR[®]-XL-TOPO[®] Cloning vector. Each component possess conserved nonanucleotide TATTATTAC located at stem loop common region (CR-SL), Major common region (CR-M), TATA box and poly A signal. The nucleotide sequences of each component 1-6, BBTV DNA1-TH – BBTV DNA6-TH is 1,105 bp 1,053 bp 1,076 bp 1,047 bp 1,008 bp and 1,078 bp. The component BBTV DNA1-TH to BBTV DNA6-TH appear to encode protein replication protein, unknown protein, viral coat protein, cell-to-cell movement protein, retinoblastoma binding-like protein and nuclear shuttle protein respectively, excepted BBTV DNA2-TH did not encode any protein. These genome information would further analyzed relationship, distribution and yet the origin. Display symptoms of Banana bunchy top disease (BBTD) tested by PCR and dot blot hybridization techniques gave positive reaction, kluay hom, kluay khai, kluay lepmeu nang detected most but canna not detected. And found that DNA component is not equal. This is due to the successful detection of the virus in the banana plant.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณท่านอาจารย์ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพรงพาง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักเป็นอย่างยิ่ง ที่ให้ความช่วยเหลือด้านแนวทางการค้นคว้างานวิจัย ให้คำปรึกษาและถ่ายทอดความรู้ต่างๆ ตลอดจนเทคนิคที่ใช้ในการทำงานวิจัยและตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้เป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อำไพวรรณ ภราคร์นุวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ดร. อนงค์นุช สาสนรักกิจ ประธานการสอบ และดร.วันเพ็ญ ศรีทองชัย ผู้ทรงคุณวุฒิ ในการสอบที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนสำหรับงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ คุณกัลยาณี สุวิทวัช จากสถานีวิทยุปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และ รศ.นิพนธ์ วิสารทนนท์ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างกล้วยในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่อบรมสั่งสอนและคอยดูแลห่วงใยในทุกเรื่อง ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแต่ คุณบิดามารดา

ขอขอบคุณ ญาติพี่น้องทุกคนที่คอยห่วงใยและเป็นกำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณ สมาชิกใน ห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในการทำงาน รวมทั้งให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจระหว่างทำการทดลองจนสำเร็จตามความมุ่งหมาย

พิกุลแก้ว วงศ์สุวรรณ

เมษายน 2556

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	17
อุปกรณ์	17
วิธีการ	20
ผลและวิจารณ์	37
สรุป	80
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	82
ภาคผนวก	86
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	91

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 โปรเมอร์ Universal ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	37
2 โปรเมอร์ Specific ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับ component 2 และ 5	38
3 โปรเมอร์ Specific สำหรับ DNA Component ที่ 1-6 ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์	39
4 ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบเชื้อ <i>Banana bunchy top virus</i> ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ใช้โปรเมอร์ Universal	62
5 ผลการตรวจสอบ DNA component 1, 3, 6 และ DNA component 2, 4, 5 ด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 10 ตัวอย่าง	67
6 ผลการตรวจสอบ DNA component 1, 3, 6 ด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 24 ตัวอย่าง	68
7 ตัวอย่างพืชที่นำมาตรวจสอบ DNA component 3 และ DNA component 6 ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization	72
8 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบ DNA component 3 และ DNA component 6 ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization กับวิธีพีซีอาร์	74
9 สรุปลักษณะของโรค Banana bunchy top disease (BBTD) และผลการตรวจสอบ เชื้อไวรัส <i>Banana bunchy top virus</i>	76

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะอาการของโรคบานานาบันชีทอป	9
2 เพลี้ยอ่อนกล้วย (<i>Pentalonia nigronervosa</i>)	10
3 อนุภาคของเชื้อไวรัส <i>Banana bunchy top virus</i>	12
4 โครงสร้างและส่วนประกอบจีโนมของ <i>Banana bunchy top virus</i>	14
5 แผนที่ยีนบนพลาสมิด pCR®-XL-TOPO® cloning vector	27
6 ตัวอย่างกล้วยที่แสดงอาการบันชีทอป	40
7 เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจากกล้วยที่ใช้วิธีสกัด 2 วิธี	41
8 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของ <i>Banana bunchy top virus</i> ที่ตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ ใช้ Universal Primer	42
9 ผลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของ <i>Banana bunchy top virus</i> DNA Component 2, 5	43
10 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอขนาด ~1,000 คู่เบส ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Universal จำนวน 88 โคลน	45
11 การตรวจสอบ Recombinant plasmid โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Restriction Enzyme <i>EcoRI</i>	46
12 แสดงการ Assembly ชิ้นดีเอ็นเอ BBTV DNA2-TH	48
13 แสดงการ Assembly ชิ้นดีเอ็นเอ BBTV DNA5-TH	48
14 ผลการเปรียบเทียบบริเวณ Stem loop Common Region ของ BBTV DNA1-6 TH	49
15 ผลการเปรียบเทียบบริเวณ Major Common Region (CR-M) ของ BBTV DNA1-6 TH	49
16 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA1-TH ขนาด 1,005 คู่เบส	52
17 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA2-TH ขนาด 1,053 คู่เบส	53
18 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA3-TH ขนาด 1,076 คู่เบส	54
19 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA4-TH ขนาด 1,047 คู่เบส	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
20 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA5-TH ขนาด 1,008 คู่เบส	56
21 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA6-TH ขนาด 1,078 คู่เบส	57
22 ภาพจำลอง โครงสร้างของ DNA Component (BBTV DNA1-TH – BBTV DNA6-TH)	58
23 ผลตรวจสอบ <i>Banana bunchy top virus</i> ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Universal จำนวน 25 ตัวอย่าง	65
24 ผลตรวจสอบ <i>Banana bunchy top virus</i> ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Universal จำนวน 24 ตัวอย่าง	65
25 ผลตรวจสอบ <i>Banana bunchy top virus</i> ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Universal จำนวน 14 ตัวอย่าง	66
26 ผลตรวจสอบ DNA Component 1, 3, 6 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Specific, 10 ตัวอย่าง	69
27 ผลตรวจสอบ DNA Component 2, 4, 5 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Specific, จำนวน 10 ตัวอย่าง	69
28 ผลตรวจสอบ DNA Component 1, 3, 6 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Specific, จำนวน 25 ตัวอย่าง	70
29 ผลการตรวจสอบ DNA component 3 ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization	73
30 ผลการตรวจสอบ DNA component 6 ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization	73

จีโนมของบานานาบับชีท็อปไวรัสและเทคนิคการตรวจสอบ

Genome of *Banana bunchy top virus* and Detection Techniques

คำนำ

กล้วยเป็นพืชเศรษฐกิจที่คนไทยใช้บริโภคและนำมาใช้สอย ถือเป็นผลไม้ยอดนิยม สามารถปลูกและเจริญเติบโตได้ดีในทุกภาคของประเทศไทย การปลูกกล้วยเพื่อการส่งออกต้องเน้นการผลิตที่มีคุณภาพสูงและในปริมาณที่มากพอ ประเทศที่มีการปลูกกล้วยเพื่อการส่งออกมีการตั้งองค์กรขึ้นเพื่อทำการศึกษาค้นคว้าวิจัยในเรื่องกล้วยและรวบรวมข้อมูลให้คำแนะนำที่ถูกต้องให้กับเกษตรกร (เบญจมาศ, 2545) แต่มักพบอุปสรรคในการปลูกกล้วย คือการเกิดการแพร่ระบาดของโรคทำให้แหล่งปลูกทั่วประเทศมีความเสียหายและให้ผลผลิตลดลง โรคบานานาบับชีท็อปเกิดจากเชื้อไวรัส *Banana Bunchy Top Virus* (BBTV) เป็นโรคที่สำคัญในกล้วย (*Musa* spp.) ซึ่งยากต่อการกำจัดและควบคุม พบโรคนี้ครั้งแรกในประเทศฟิลิปปินส์ ใต้หวัน และเกาะแถบแปซิฟิกใต้ บางพื้นที่ของอินเดียและแอฟริกา ส่วนอเมริกากลางหรือตอนใต้ยังไม่พบโรคนี้

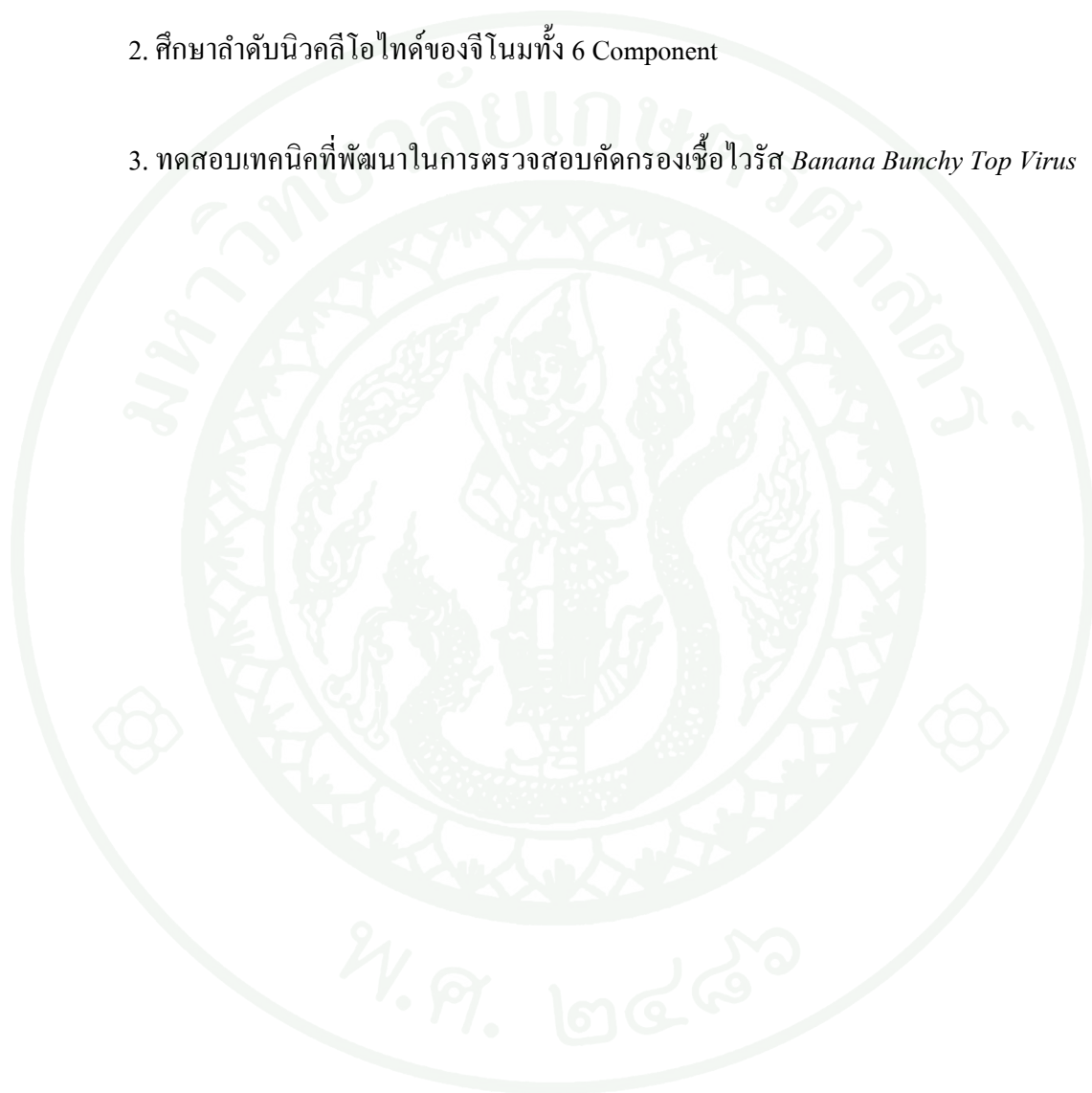
ในเอเชียมีเพียงบางประเทศเท่านั้นที่ยังไม่พบโรค Banana bunchy top disease (BBTD) ได้แก่ มาเลเซีย ไทย โดยยังไม่พบต้นกล้วยที่มีอาการของโรค แต่เมื่อสำรวจพบว่า ต้นกล้วยที่ไม่แสดงอาการนั้นให้ปฏิกิริยาผลบวกกับ monoclonal antibodies ซึ่งให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ที่เชื้อ BBTV ได้เข้าทำลายแล้วแต่มีจำนวนน้อยหรือเป็นสายพันธุ์ที่อ่อนแอ จึงทำให้ไม่แสดงอาการ (Department of Agriculture, Fishers and Forestry, 1995) ในประเทศไทยมีการศึกษาการถ่ายทอดโรคและพืชอาศัยของเชื้อไวรัส พบกล้วยที่มีอาการของโรคบานานาบับชีท็อปในหลายจังหวัดคือ กาญจนบุรี จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี นนทบุรี และกรุงเทพมหานคร และตรวจพบในตัวเพลี้ยอ่อน *Pentalonia nigronervosa* Coq. เมื่อใช้วิธี double antibody sandwich ELISA ด้วย monoclonal antibody จากใต้หวัน และพบว่าพืชอาศัยของโรคนี้อยู่ใน order Scitaminaceae ได้แก่ ข่า กระชาย คล้า พุทธรักษา กล้วยที่พบได้แก่ กล้วยหอม กล้วยน้ำว้า กล้วยน้ำว้าค่อม และกล้วยป่า (พัฒน์พงษ์ และคณะ, 2536) ในปีต่อมายังตรวจพบเชื้อ BBTV อีกหลายจังหวัดในประเทศเมื่อตรวจสอบด้วย anti-BBTV monoclonal antibody (2H6) นอกจากนี้ยังพบในพืชชนิดอื่นด้วยคือ

พุทธรักษา (*Canna indica*), ข่า (*Alpinia galangal* (L.) Swartz) และกระชาย (*Kaenferia pandurata* Roxb) (ไมตรี และคณะ, 2537) เนื่องจากโรคบานานาบันชีทอปเป็นโรคที่สำคัญต่ออุตสาหกรรม การผลิตกล้วยและมีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย จึงทำการศึกษาและคิดวิธีการตรวจสอบที่ ง่ายและแม่นยำ

ในการทำการศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการตรวจสอบเชื้อ BBTV เนื่องจากให้ ประสิทธิภาพความแม่นยำและความจำเพาะต่อเชื้อสูงรวมไปถึงความรวดเร็วในการทดสอบและ ราคาถูกเนื่องจากไวรัสชนิดนี้มีจีโนมเป็นดีเอ็นเอจึงง่ายและรวดเร็วกว่าการตรวจสอบจีโนมที่เป็น อาร์เอ็นเอ โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถตรวจสอบจีโนมไวรัสได้ทุก component (1-6) และ ใช้เทคนิค Dot blot hybridization เพื่อตรวจสอบกล้วยที่แสดงอาการของโรค BBTD และไม่แสดง อาการของโรค BBTD เพื่อประโยชน์ในการควบคุมและกำจัดโรคได้อย่างรวดเร็ว

วัตถุประสงค์

1. พัฒนารูปแบบการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Banana Bunchy Top Virus* อย่างรวดเร็วและแม่นยำ
2. ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมทั้ง 6 Component
3. ทดสอบเทคนิคที่พัฒนาในการตรวจสอบคัดกรองเชื้อไวรัส *Banana Bunchy Top Virus*



การตรวจเอกสาร

1. กล้วย

กล้วยจัดอยู่ในวงศ์ *Musaceae* อันดับ *Scitamineae* หรือ *Zingiberales* (เบญจมาศ, 2545) สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยแบ่งคร่าวๆ เป็นกล้วยประดับ กล้วยป่า กล้วยบ้าน หากแบ่งตามลักษณะเผ่ามี 2 ลักษณะคือ กล้วยแตกกอสกุล *Musa* กล้วยโทนสกุล *Ensete* กล้วยปลูก ส่วนกล้วยบ้านหรือกล้วยที่ทานได้ (Banana, Plantain) นั้น ได้จากกล้วยชนิดป่า 2 ชนิด คือ กล้วยป่า (*Musa acuminata*) จีโนมเป็น AAA และ กล้วยตานี (*Musa balbisiana*) จีโนมเป็น BBB ซึ่งมีถิ่นกำเนิดจากตอนใต้และตะวันออกเฉียงใต้ของออสเตรเลียซึ่งมี *M. schizocarpa* อยู่ด้วย จีโนมกล้วยที่พบในประเทศไทยมากที่สุดคือ จีโนม AAA ได้แก่ กล้วยไข่, กล้วยน้ำไท, กล้วยสา, กล้วยหอมทอง จีโนม ABB ได้แก่ กล้วยน้ำว้า, กล้วยหักมุก เป็นต้น และจีโนม ABBB ลักษณะของปลีกล้วยจะหลุดหายไปหลังจากติดผลแล้ว (ดวงแก้ว, 2544) กล้วยเป็นพืชที่ชอบอากาศแบบร้อนชื้น ถิ่นแรกของกล้วยอยู่ในแถบเอเชียคือ ทางเหนือของอินเดีย พม่า เขมร ไทย ลาว และจีนตอนใต้ หมู่เกาะอินโดนีเซีย เกาะบอเนียว ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน ประเทศไทยเป็นถิ่นกำเนิดของกล้วยป่า กล้วยทานได้นั้นพบอยู่ใยแถบแหลมมาลาญ ซึ่งหมายถึงภาคใต้ของประเทศไทยรวมอยู่ด้วย ปัจจุบันมีการเพาะปลูกทั่วไปในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน (เบญจมาศ, 2545)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

กล้วยมีลำต้นอยู่ใต้ดินที่เรียกว่า rhizome หรือ corm การเจริญคล้ายการเจริญแบบซิมโพลีทัลที่ลำต้นมีตาอยู่ทางด้านข้างมีกาบใบหุ้ม เหง้าใต้ดินคือลำต้นใต้ดินหรือลำต้นแท้ประกอบไปด้วยโคนต้นเทียม มีตาอยู่ทั่วไปช่อดอกจะเจริญมาจากตาที่อยู่ใจกลางเหง้าส่วนตารอบๆจะเจริญไปเป็นเหง้าอ่อน เหง้าจะเจริญไปเป็นหน่อแล้วกลายเป็นต้นอ่อน (ดวงแก้ว, 2544) กลางลำต้นแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนของ central cylinder และ cortex โดยมีท่อน้ำท่ออาหารเป็นตัวเชื่อมเนื้อเยื่อของลำต้นประกอบด้วยเซลล์พาราเอนไคมาซึ่งบรรจุด้วยแป้งจำนวนมาก ในการสร้างใบจากจุดเจริญด้านล่างก่อให้เกิดลำต้นเทียมเหนือดินที่เห็นอยู่ทั่วไปหรือส่วนของกาบใบที่อัดแน่น การจัดเรียงของกาบใบเป็นลำต้นเทียมนั้นเกิดซ้อนๆกันที่บริเวณ โคนต้น ส่วนปลายไม่ซ้อนแต่มีการเรียงของใบแตกต่างตามอายุของต้นกล้วย รากของกล้วยเป็น adventitious root และมีการสร้าง lateral root ซึ่งมี root hair เพื่อดูดน้ำและอาหาร (เบญจมาศ, 2545)

1.2 การขยายพันธุ์

การขยายพันธุ์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 วิธีคือ การขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด การใช้หน่อหรือแยกเหง้าและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ อากาศที่เหมาะสมคือ อบอุ่นและชุ่มชื้น อุณหภูมิช่วง 15-35 องศาเซลเซียส ดินน้ำไหลทรายมูล (deep friable loam) เป็นดินที่มีความอุดมสมบูรณ์มีการระบายน้ำและหมุนเวียนอากาศดี ปลูกในดินที่ร่วนซุยและดินเหนียวที่อุ้มน้ำ ไม่ชอบที่มีน้ำขัง ควรมีการปลูกพืชคลุมดินส่วนใช้หว่านด้วยเมล็ด เช่น ถั่วแระ ถั่วพุ่ม ปอเทือง แหล่งที่เหมาะสมกับการปลูกกล้วยในประเทศไทยคือภาคใต้แต่แหล่งปลูกกล้วยหอมทองที่ปลูกมากในปัจจุบันคือภาคกลาง (เบญจมาศ, 2545)

1.3 อุปสรรคและปัญหา

อุปสรรคในการปลูกกล้วยคือการเกิดการแพร่ระบาดของโรคทำให้แหล่งปลูกทั่วประเทศมีความเสียหายและให้ผลผลิตลดลงเชื้อโรคที่ทำให้เกิดความเสียหายได้แก่ เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส ไล่เดือนฝอย โรคที่เกิดขึ้น เช่น โรคตาพราย โรคใบจุดกระ โรครากเน่าสีน้ำตาล โรคเหี่ยว เป็นต้น (ดวงแก้ว, 2544) ส่วนโรคกล้วยที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส ได้แก่ *Banana bract mosaic virus* (BBrMV), *Banana mild mosaic virus* (BanMMV), *Banana streak virus* (BSV), และ *Banana bunchy top virus* (BBTV) (Magee., 1927) การป้องกันและกำจัดโรคย่อมมีความจำเป็นและสำคัญยิ่ง เพื่อเป็นการป้องกันไม่ให้เชื้อโรคเข้าสู่แปลงปลูกกล้วย นอกจากนี้ยังทำการกำจัดโรคที่กำลังแพร่ระบาดอยู่ให้หมดสิ้นไปเพื่อไม่ให้เกิดการระบาดต่อไป

2. โรคบานานาบันช์ท็อป (Banana bunchy top disease (BBTD))

โรคบานานาบันช์ท็อป Banana bunchy top disease (BBTD) มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* (BBTV) ที่เกิดในกล้วย (*Musa* spp.) เป็นโรคไวรัสที่ทำความเสียหายแก่กล้วยมากที่สุด มีผลกระทบต่อเศรษฐกิจการส่งออกทำให้ผลผลิตเสียหาย มีการรายงานว่าเชื้อ BBTV พบครั้งแรกในประเทศฟิลิปปินส์ ปี 1889 (Magee., 1927) มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในแหล่งปลูกที่สำคัญในประเทศต่างๆ ทั้งในทวีปแอฟริกา (บุรันดิ คองโก สาธารณรัฐแอฟริกากลาง อียิปต์ กาบอง ซาอีร์) ทวีปเอเชีย (บังกลาเทศ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ญี่ปุ่น มาเลเซีย พม่า ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ ศรีลังกา ไต้หวัน ไทย เวียดนาม) แปซิฟิก (ออสเตรเลีย ฮาวาย กวม คิริบาส) ทวีปอเมริกา

(อเมริกากลางและอเมริกาใต้ และแคริบเบียน) (Dale *et al.*, 1987) อาการของโรคบานานาบ้นซีทอปในกล้วยมักจะปรากฏอยู่ในกลุ่มของ Cavendish หรือกล้วยหอม ที่มีจีโนมเป็น AAA ซึ่งอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อและยังไม่มีพันธุ์ใดที่ต้านทานต่อโรค อาการของโรคมีความเด่นชัดและแตกต่างจากโรคไวรัสชนิดอื่นที่เกิดขึ้น (Harding *et al.*, 1991)

2.1 ลักษณะอาการ

เชื้อ BBTV สามารถเข้าทำลายต้นกล้วยได้ทุกระยะการเติบโต การปรากฏขึ้นของอาการนั้นจะเกิดขึ้นหลังจากที่เพลี้ยอ่อนกล้วยเข้าดูดกินน้ำเลี้ยงในต้นกล้วยและจะแสดงอาการจนกว่าจะมีใบใหม่เกิดขึ้นอย่างน้อยสองใบ อาการเริ่มแรกจะเกิดเป็นรอยขีดและจุด (dot-dashes) เป็นขีดสีเขียวเข้ม (dark green streaks) หรืออาจที่เรียกว่า รอยขีดรหัสมอส “Morse code streaking” บนเส้นใบ เส้นกลางใบ ก้านใบ ใต้ใบ และยังมีรอยสีเขียวเข้มนั้นมีลักษณะคล้ายกับตะขอยาวๆ (hook) ตามเส้นใบมีสีเขียวอ่อนอยู่ระหว่างรอยขีดดังกล่าว แต่อาการเหล่านี้อาจจะไม่พบในกล้วยบางพันธุ์ อาการที่เกิดขึ้นภายหลังมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงภายในของท่ออาหารและเนื้อเยื่อบริเวณรอบๆท่อลำเลียง การผลิออกของยอดใหม่จะเกิดขึ้นยาก ใบอ่อนจะสั้นและแคบกว่าปกติมีอาการใบซีดเหลืองขอบใบเป็นสีน้ำตาลจะปรากฏลักษณะแบบมัดกระจุกที่ส่วนบนหรือยอดของต้นกล้วย หากมีอาการรุนแรงจะไม่เกิดผลแต่ถ้ามีผลจะทำให้ลักษณะของหวีกล้วยจะบิดเบี้ยว สำหรับต้นที่เกิดจากหน่อของต้นที่เป็นโรคลักษณะใบที่เกิดขึ้นมีขนาดเล็ก สั้นตั้งตรง ริมขอบใบจะขาวซีดหรือเหลืองและห่อม้วน ต้นไม่สูงเตี้ยแคระหยุดการเจริญอาการดังกล่าวจะเกิดอยู่เป็นช่อหรือกระจุก จากลักษณะอาการเป็นกระจุกของใบที่แตกออกมา นี้จึงให้ชื่อว่าโรคบ้นซีทอป (เบญจมาศ, 2545) นอกจากนี้ เชื้อ BBTV สามารถถ่ายทอดไปยังกล้วยพันธุ์ ladyfinger และ Cavendish cv. Williams ที่ปลูกจากวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ง่ายและรวดเร็ว (Soweha *et al.*, 2005)

ถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะที่กล้วยโตเต็มที่แล้วอาการจะไม่ปรากฏชัดเจนมากนักหรือมีรอยขีดสีเขียวเข้มเพียงเล็กน้อยที่ยอดของปลีกล้วยและไม่มีการออกผลในปีต่อมาโดยทั่วไปแล้วต้นจะตายภายในสองปีเชื้อ BBTV มักจะอยู่ในบริเวณท่ออาหารเกิดอาการ hypertrophy และ hyperplasia และทำให้มีการสร้างเส้นใยลดลงบริเวณรอบๆท่อลำเลียง เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจากบริเวณที่มีรอยขีดพบว่าคลอโรพลาสต์จำนวนมากที่มีรูปร่างผิดปกติ

2.2 การแพร่กระจายและการพัฒนาของโรค

โรคบานานาบ้นชืทอปจะแพร่กระจายโดยเพลี้ยอ่อนกล้วย *Pentalonia nigronervosa* ความสัมพันธ์ของไวรัสกับเพลี้ยอ่อนเป็นแบบ circulative persistent ไม่มีการขยายพันธุ์ (non-propagative type) (Hafner *et al.*, 1995) โดยการใช้ปากดูด (stylet) แทะเข้าสู่เซลล์พืช เพื่อดูดกินน้ำเลี้ยงจากเซลล์หรือท่ออาหารของพืช ซึ่งทำให้เพลี้ยอ่อนกล้วยมีโอกาสได้รับเชื้อไวรัสที่อยู่ในต้นกล้วยที่เป็นโรคและสามารถถ่ายทอดไปยังต้นอื่นได้เมื่อเพลี้ยอ่อนกล้วยไปดูดกินน้ำเลี้ยง แต่การแพร่กระจายของเชื้อไวรัส BBTV ไม่สามารถถ่ายทอดได้ทางวิธีกลหรือน้ำคั้น (Wu *et al.*, 1990) และไม่เป็น soil-borne (Magee, 1927) เชื้อไวรัสจะเข้าไปในระบบหมุนเวียนของในตัวเพลี้ยอ่อน แต่ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้ภายในเพลี้ยอ่อนกล้วย ไวรัสไม่ถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูก (viviparous agamic, progeny) ไวรัสจะอยู่ภายในตัวเพลี้ยอ่อนที่ตัวเต็มวัยเป็นระยะเวลา 15-20 วัน ระหว่างนี้เพลี้ยอ่อนสามารถที่จะส่งผ่านไวรัสไปยังต้นกล้วยปกติได้โดยการดูดกินอาหารโดยใช้เวลาเพียง 15 นาทีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่ดีที่สุดคือ 1.5-2 ชั่วโมง แล้วจะปรากฏอาการภายใน 1 เดือน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเนื้อเยื่อท่ออาหาร (Magee, 1927) เชื้อไวรัส BBTV มีการเริ่มต้นเพิ่มจำนวนที่มีระยะเวลาสั้นในบริเวณที่เพลี้ยอ่อนกล้วยดูดกินน้ำเลี้ยงแล้วปล่อยเชื้อไวรัส BBTV และในเวลาต่อมาจะมีการเคลื่อนที่ลงไปยังลำต้นและไปยังส่วนฐานที่เป็นเนื้อเยื่อเจริญ (basal meristematic region) และสุดท้ายจะอยู่ที่บริเวณรากและใบที่เกิดขึ้นมาใหม่ (Hafner *et al.*, 1995) กล้วยเป็นโรคที่ยังเป็นต้นอ่อนอยู่จะเป็นแหล่งของไวรัสได้ดีกว่าต้นที่โตเต็มที่แล้ว ส่วนเพลี้ยอ่อนกล้วยในระยะตัวอ่อนจะเป็นพาหะนำโรคได้ดีกว่าตัวเต็มวัย เพลี้ยอ่อนกล้วยบางตัวที่มีปีกนั้นสามารถแพร่กระจายไวรัสได้เป็นอย่างดี (Hu *et al.*, 1996, & Magee, 1940) มักจะพบกลุ่มของเพลี้ยอ่อนอยู่บริเวณปลีกล้วย กาบใบลำต้นเทียม หน่อที่เกิดใหม่และก้านใบเมื่อสังเกตจะชุกชอนตัวอยู่เพื่อกินอาหารและปกป้องตนเองจากสภาพแวดล้อม บางครั้งก็พบเพลี้ยอ่อนในพืชพวกเดียวกับกล้วยเช่น Heliconia, Strelitzia, Ravenala (Harding *et al.*, 1993) นอกจากเพลี้ยอ่อนแล้วหน่อที่เป็นส่วนขยายพันธุ์หรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มาจากต้นเป็นโรคก็ทำให้มีการแพร่กระจายของเชื้อได้เช่นกัน

2.3 การควบคุมโรคและการแก้ปัญหา

สิ่งที่สำคัญที่สุดคือการฆ่าทำลายเชื้ออ่อนอาจใช้สารเคมีกำจัดเชื้ออ่อนกล้วยและเคลื่อนย้ายหรือทำลายต้นที่เป็นโรคเพื่อหลีกเลี่ยงการแพร่กระจายไวรัสจากต้นเป็นโรคไปยังต้นปกติจะทำให้ลดการแพร่กระจายได้ การกำจัดทำลายต้นที่ถูกไวรัสเข้าทำลายทั้งสองวิธีการนี้ต้องอาศัยการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ (Dale *et al.*, 1987) การทำลายหน่อโดยการตัดแล้วจะบริเวณใจกลางเพื่อใส่สารเคมีโรซิน 5-10 มิลลิกรัม เมื่อหน่อตายแล้วจึงขุดหน่อและรากออก การปลูกกล้วยที่เป็นต้นใหม่ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากต้นที่ปราศจากไวรัสจะต้องมาจากห้องปฏิบัติการที่มีการจัดการด้านการปลอดเชื้อที่ดี การใช้กฎหมายกักกันพืชโดยไม่อนุญาตให้นำส่วนหรือชิ้นส่วนของกล้วยขยงเว้นผลหรือการนำเข้าพืชที่เป็นพวก Heliconia, Flowering ginger จะต้องรับประกันว่าไม่มีเชื้ออ่อนกล้วยติดมาด้วย (Department of Agriculture, Fishers and Forestry, 1995) พืชที่ผ่านเข้า ออกในประเทศได้ต้องมีใบรับรองการปลอดโรคจากต้นทาง เป็นวิธีการหนึ่งที่จะป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อโรคจากแหล่งหนึ่งไปสู่อีกแหล่งหนึ่ง ส่วนในระดับท้องถิ่นคือ ห้ามบุคคลนำกล้วยจากแหล่งอื่นเข้ามาปลูกภายในท้องถิ่น (เบญจมาศ, 2545)



ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของโรคบานานาบันชีท็อป

ที่มา : College of Tropical Agriculture and Human Resources (2006)



ภาพที่ 2 เพลี้ยอ่อนกล้วย (*Pentalonia nigronervosa*)

ที่มา : Bolton (2009)

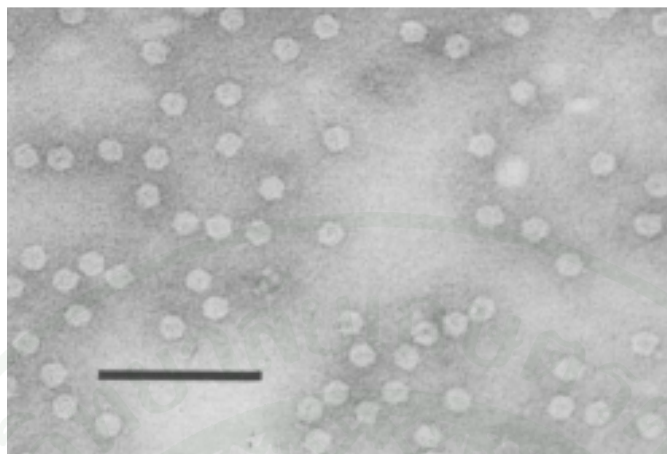
3. *Banana bunchy top virus* (BBTV)

ลักษณะทางชีววิทยาและ โครงสร้างของเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสบนานาบันชีทอปอยู่ในวงศ์ *Nanoviridae* ที่ประกอบไปด้วย *Subterranean clover stunt virus* (SCSV), *Coconut foliar decay virus* (CFDV), *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV), *Milk vetch dwarf virus* (MVDV) *Banana bunchy top virus* (BBTV) (Harding *et al.*, 1991) จินัส *Babuvirus* สปีชีส์ *Banana bunchy top virus* คำว่า nano มาจากภาษากรีกที่หมายถึง เล็ก แคระ เนื่องจากไวรัสดังกล่าวมีจีโนมขนาดเล็กและยังทำให้ต้นกล้วยที่ถูกทำลายมีลักษณะเตี้ยแคระ เชื้อไวรัส BBTV ที่เข้าทำลายกล้วย มีการรายงานแล้ว 10 ประเทศ และได้ถูกจัดออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ประกอบด้วย ไชเลตจาก ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และเวียดนาม กลุ่มแปซิฟิกใต้

ประกอบด้วยไอโซเลทจาก ออสเตรเลีย บรูไนดิ อียิปต์ ฟีจี อินเดีย ทองกา และเวสเทิร์น ซามัว (Karan *et al.*, 1994)

ในปี ค.ศ. 1989 มีการทำเชื้อให้บริสุทธิ์จากกล้วยที่มีอาการบ้นซีทอป แต่เดิมเรียกเชื้อว่า คล้ายไวรัส (virus-like particles) เชื่อดังกล่าวมีขนาด 28 nm (Iskra *et al.*, 1989) ในประเทศไต้หวัน พบขนาด 20-22 นาโนเมตร ไวรัสในแฟมิลีนี้มีส่วนประกอบของ capsid เป็นส่วนที่ทำให้ไวรัสมี มลัษณะรูปร่างแบบ icosahedral มีขนาด 18-20 nm แต่ไม่พบ envelope ที่อยู่รอบๆ จีโนมของ ไวรัสประกอบด้วย circular single stranded DNA ที่มีขนาดเล็ก 6 component แต่ละ component มี ขนาดประมาณ 1,100 คู่เบส ได้แก่ DNA-R คือโปรตีนที่เริ่มต้นกระบวนการเพิ่มปริมาณของ ไวรัส แบบ rolling-circle [Rep] จำเป็นสำหรับกระบวนการ Replication, DNA-S โปรตีนห่อหุ้มไวรัส Coat Protein [CP], DNA-C โปรตีนเกี่ยวกับ cell-cycle link protein เกี่ยวข้องกับกระบวนการชักนำ ให้ไวรัสเข้าสู่กระบวนการสร้างและสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเซลล์พืช [Clink], DNA-M คือ โปรตีนที่ เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายจากเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง Movement Protein [MP], DNA-N โปรตีนที่มีหน้าที่นำดีเอ็นเอของไวรัส เข้า-ออก จากนิวเคลียส Nuclear Shuttle Protein [NSP], และ DNA-U3 ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ (Harding *et al.*, 1993) ส่วนประกอบแต่ละ component ประกอบด้วย major common region (CR-M), stem-loop common region (CR-SL), open reading frame (ORF), TATA box, และ polyadenylation signals แต่ละ component จะมีบริเวณอนุรักษ์ที่เรียกว่า conserved regions 2 ส่วน ได้แก่ CR-SL และ CR-M (Burns *et al.*, 1995) บริเวณ CR-M อยู่ระหว่าง ลำดับเบสที่ 66-92 ปัจจุบันยังไม่สามารถระบุหน้าที่ที่ชัดเจน แต่คาดว่าลำดับเบสดังกล่าวจะ เกี่ยวข้องกับเริ่มและควบคุมการถอดรหัสดีเอ็นเอหรือเป็น promotor นั้นเอง ส่วน CR-SL มี โครงสร้างของ stem-loop ที่มีลำดับเบสเป็น loop sequence เรียกว่า nonanucleotide sequence (TA(T/G)TATTAC) คือลำดับเบส conserved regions ของ Nanoviruses และ Geminiviruses (Lazarowitz, 1992) ลำดับเบสดังกล่าวที่มีอยู่ทุก component จะจำเพาะต่อการจับและจดจำกับ Rep protein ในแต่ละ component ประกอบด้วย open reading frame (ORF) ขนาดใหญ่ที่สร้างโปรตีน แตกต่างกัน ภายในมี TATA box และ 1 หรือ 2 polyadenylation signal ร่วมอยู่ด้วย บริเวณ polyadenylation มี GT-rich region ประกอบด้วย 3 nucleotide คือ TTG ซึ่งควบคุมบริเวณของ stop codon (Burns *et al.*, 1995)



ภาพที่ 3 อนุภาคของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus*, แถบขนาด 100 นาโนเมตร

ที่มา : Thomas (1991)

3.1 Component 1

DNA component 1 มี Open Reading Frame (ORF) ที่มีขนาดโปรตีน 33.6 kDa ประกอบด้วย Major ORF และ internal ORF ซึ่ง Major ORF แปลรหัสกรดอะมิโนเป็น replication protein ส่วน internal ORF ที่มีขนาดโปรตีนเท่ากับ 5 kDa นั้น ยังไม่ทราบหน้าที่แน่นอน (Beetham *et al.*, 1997) DNA Component 1 เกี่ยวข้องกับการเพิ่มปริมาณของ DNA Component อื่นๆ โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า rolling-circle mechanism ซึ่งมีความจำเพาะกับการเกิด nicking และสร้าง loop region หรือเรียกว่า recircularization จากการศึกษพบว่าโปรตีนนี้มีหน้าที่ทั้งเริ่มและหยุดการเพิ่มปริมาณในกระบวนการ rolling-circle replication (Hafner *et al.*, 1997) นอกจากจะควบคุมกระบวนการดังกล่าวแล้ว เมื่อศึกษาการทำงานของ DNA Component 1 ใน banana embryonic cell suspensions ร่วมกับ DNA Component อื่นๆ พบว่า DNA Component 1 สามารถทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณหรือเกิด replication DNA Component อื่นได้ และยังพบว่า DNA component 1 สามารถเกิด Self-replication ได้ และเป็น 'master' viral Rep (Horser *et al.*, 2001)

3.2 Component 2

จากการศึกษาพบว่า DNA Component 2 ไม่มีบริเวณของ ORF ทำให้ไม่มีลำดับที่สามารถแปลเป็นอะมิโนได้จึงไม่ทราบหน้าที่ของ DNA Component 2 แต่ยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ TATA boxes Polyadenylation signals และพบตำแหน่งของบริเวณอนุรักษ์ที่ปรากฏอยู่ทุก Component คือ CR-SL และ CR-M เมื่อทำการหาขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Universal และ specific ในการสังเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอให้ overlapping กัน ได้ขนาดดีเอ็นเอ 1,059 – 1,060 คู่เบส (Burns *et al.*, 1995)

3.3 Component 3

DNA component 3 มีขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 1,075 คู่เบส ทำหน้าที่เป็น Coat Protein ขนาดโปรตีนเท่ากับ 19.3 kDa (Wanitchakorn *et al.*, 1997) เมื่อดีเอ็นเอของไวรัสรวมกับ Coat Protein แล้วจะถูกจดจำโดย DNA Component 4 (Movement Protein) และถูกส่งไปยังบริเวณรอบเซลล์เพื่อการเคลื่อนที่และส่งผ่านระหว่างเซลล์ (Horser *et al.*, 2001)

3.4 Component 4

DNA component 4 มีขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 1,043 bp มีส่วนประกอบของ 29-30 amino acid N-terminal hydrophobic region เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งผ่านบริเวณเยื่อเมมเบรน (transmembrane) (Burns *et al.*, 1995) DNA Component 4 จะปรากฏอยู่ที่บริเวณจำเพาะ คือรอบๆ เซลล์ของ banana embryogenic cell แล้วทำการขนส่ง NSP-DNA complexes มายังบริเวณรอบๆ เซลล์ เป็นการเคลื่อนที่ระหว่างเซลล์หนึ่งไปสู่อีกเซลล์ (Wanitchakorn *et al.*, 2000)

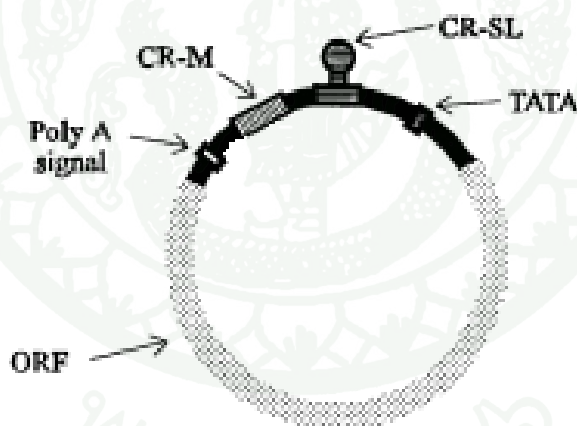
3.5 Component 5

DNA component 5 ประกอบไปด้วย LXCXE motif แสดงให้เห็นว่าโปรตีนดังกล่าวจะมีกิจกรรมร่วมกับ retinoblastoma protein (Rb) ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงการควบคุมเมตาบอลิซึมในเซลล์พืช นั่นคือ Rb-binding-like protein จะเป็นตัวที่ทำให้ไวรัสสามารถนำส่วนประกอบในเซลล์พืชมาใช้ประโยชน์ โปรตีนจาก component นี้จะถูกสร้างขึ้นจำนวนมากก่อนที่จะเข้าวงจรการเข้า

ทำลาย (infection cycle) ทำให้เกิดกระบวนการถอดรหัสและเพิ่มปริมาณของ dsDNA ซึ่งคาดว่าเป็นตัวเปิด-ปิด (switching) และเปลี่ยน cell cycle ของพืชให้อยู่ในระยะเวลาที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอ (S-phase) เป็นการเตรียมและให้ย่ำต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการเกิด self-primed มากกว่า DNA component อื่นๆ (Wanitchakorn *et al.*,2000)

3.6 Component 6

DNA component 6 ทำหน้าที่เป็น Nucleus Shuttle Protein มีหน้าที่เคลื่อนย้าย ssDNA หรือ DNA ที่รวมอยู่กับ movement protein เข้าหรือออกจากบริเวณนิวเคลียสที่เกิดการ replication จะพบว่าโปรตีนดังกล่าวจะปรากฏหรือมีเป้าหมายอยู่ทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม มักจะทำงานร่วมกับ transmembrane หรือ movement Protein จาก component 4 จะส่ง NSP-DNA complexes ไปยังบริเวณรอบๆเซลล์เพื่อส่งไประหว่างเซลล์ใกล้เคียง (Wanitchakorn *et al.*, 2000)



ภาพที่ 4 โครงสร้างและส่วนประกอบจีโนมของ *Banana bunchy top virus*

ที่มา : Hafner (1995)

4. การศึกษาและตรวจสอบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus*

การใช้วิธี green fluorescent protein (GFP)-tagging เพื่อติดตามว่า มีการ localization ภายในเซลล์ที่มีโปรตีนจาก DNA Component 3, 4, 6 โปรตีนที่ผลิตจาก DNA Component 4 ทำหน้าที่เป็น Movement Protein มี hydrophobic N terminus พบว่ามีอยู่เฉพาะบริเวณรอบนอกเซลล์ โปรตีนจาก DNA Component 3 และ DNA Component 6 พบทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม โปรตีนทั้ง 3 ชนิดมีการแสดงออกร่วมกัน โดยโปรตีนจาก DNA Component 4 สามารถเข้าไปจับกับโปรตีนจาก DNA Component 6 ที่บริเวณรอบนอกเซลล์ แต่ไม่ปรากฏปฏิกริยาดังกล่าวกับ Coat Protein (Wanitchakorn *et al.*, 2000) การพิสูจน์โครงสร้างของ ORF ใน DNA Component 1 ที่มี Rep ORF โดยการถ่ายยีนดังกล่าวด้วย *Agrobacterium tumefaciens* สู่นิยาสุบ การถ่ายยีนเพื่อคูณการเพิ่มปริมาณของ DNA Component 1, 3, 5 โดยใช้ BBTV 1.1 mers ใน Banana embryogenic cell suspensions ตรวจสอบการตัด (nick) และการกลับเข้าสู่วงกลมให้เป็น circular DNA เหมือนเดิม (recircularization) หลังจากถ่ายยีนแล้ว 4 วัน นำ bombarded banana embryogenic cell suspensions มาสกัดดีเอ็นเอและทำ PCR ต่อทันทีโดยใช้ไพรเมอร์ Specific ที่ถูกออกแบบมาสำหรับการเพิ่มปริมาณยีนดังกล่าว ซึ่งจะตรวจพบก็ต่อเมื่อ เกิดการทำงานของ 1.1 mers ที่มีการตัดที่บริเวณ stem-loop และเกิด recircularized เป็น single monomeric unit เมื่อทำการวิเคราะห์ DNA Component 1, 3, 5 พบว่า bombarded banana embryogenic cell suspensions ที่มียีนจาก DNA Component 1 จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของ DNA Component 3 และ DNA Component 5 ได้ (Horser *et al.*, 2001)

การศึกษาการเคลื่อนย้ายและการเพิ่มปริมาณของ DNA component 1 ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ใช้เทคนิคพีซีอาร์ และ Strand-specific RNA probes เพื่อตรวจสอบว่า ไวรัสจะปรากฏอยู่ในส่วนใดบ้างเมื่อมีการเข้าทำลาย วิธี Strand-specific RNA probes ยังสามารถตรวจสอบได้ว่าการเพิ่มปริมาณที่ตำแหน่งใดบ้างของต้นกล้วย ได้ตรวจพบว่าเชื้อไวรัสดังกล่าวจะเพิ่มปริมาณในระยะเวลาอันสั้นบริเวณที่ถูกเข้าทำลายหลังจากนั้นจะเคลื่อนย้ายมายังลำต้นจนถึงรากและเนื้อเยื่อเจริญที่จะก่อให้เกิดใบใหม่ ซึ่งจะตรวจพบเชื้อไวรัสได้จากใบกล้วยที่แตกออกมาใหม่หลังจากถูกเชื้อเข้าทำลายแล้ว 21 วัน ด้วยวิธีพีซีอาร์ แต่ไม่สามารถใช้ RNA probes ตรวจสอบได้ แสดงให้เห็นว่าไวรัสสามารถเคลื่อนย้ายได้โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณตัวเองได้ด้วยวิธี rolling circle mechanism (Hafner *et al.*, 1995)

การศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน DNA component 1 ที่สำรวจจาก 10 ประเทศ พบว่าความแตกต่างนั้นถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแปซิฟิกใต้ ได้แก่ ไอโซเลทจากประเทศ ออสเตรเลีย บูร์นดิ อียิปต์ ฟิจิ อินเดีย ทองกา เวสเทิร์นซามัว และกลุ่มเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไอโซเลทจากประเทศ ฟิลิปปินส์ ใต้หวัน และเวียดนาม ภายในกลุ่มเดียวกันนั้นความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับร้อยละ 1.9 ถึง 3.0 ในระหว่างกลุ่มแตกต่างกันร้อยละ 10 ส่วนที่เหมือนกันคือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ Stem-loop ถึง TATA box (Karan *et al.*, 1994) การตรวจสอบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ด้วยวิธี (DAS-ELISA) และ dot-blot immunoassay (DBIA) มีการใช้แอนติบอดีในการตรวจสอบเชื้อไวรัสไอโซเลทจาก ออสเตรเลีย แอฟริกา แปซิฟิกใต้ อินเดีย และไอโซเลทจาก เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ ฟิลิปปินส์ ใต้หวัน เวียดนาม นอกจากนี้ยังใช้ nucleic acid probes สำหรับเทคนิคไฮบริโดเซชันและเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) (Thomas *et al.*, 1994) ประโยชน์จากการใช้เทคนิคพีซีอาร์ สามารถที่จะตรวจสอบสารพันธุกรรมของไวรัสที่เข้าทำลายกล้วยได้อย่างแม่นยำซึ่งนำไปสู่การใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบกล้วยที่ไม่แสดงอาการนั้นคือความเข้มข้นของไวรัสมีปริมาณน้อยแต่ก็ยังสามารถตรวจสอบได้และให้ความจำเพาะสูงกว่าการใช้วิธี ELISA

ในประเทศอียิปต์มีการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์มีการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับนิวคลีโอไทด์ของ component 2 ได้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 1,056 bp โดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้ P₁, 5'GGT CCC CTT TAA GAT TCC TTT CTT CGT CGC3' and P₂, 5'ACT CAA AAT ACA GCT GTC ATT GAA TTA TTA3' และถือว่าเทคนิคพีซีอาร์เหมาะสมในการตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดนี้และสามารถตรวจสอบได้หากเชื้อไวรัสมีปริมาณน้อยหรือความเข้มข้นต่ำและยังพบว่ากล้วยพันธุ์ Baradica, Grand Nain, Maghraby ตรวจพบเชื้อ BBTV และตรวจพบเชื้อมากตามลำดับในต้นที่ไม่แสดงอาการด้วย (Soweha *et al.*, 2005)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัสดุอุปกรณ์

- 1.1 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
- 1.2 เครื่อง Micro centrifuge (Clover Laboratories, USA)
- 1.3 เครื่องวิเคราะห์ภาพ (Gel documentation) (Syngene, UK)
- 1.4 เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ 37 องศาเซลเซียส (Memmert, Germany)
- 1.5 เครื่องไมโครเวฟ (Sharp, Japan)
- 1.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Ohaus, USA)
- 1.7 เครื่อง Electrophoresis (i – Myrum, Japan)
- 1.8 เครื่อง Vortex (Scientific, Thailand)
- 1.9 เครื่อง Thermocycler (Biometra, Germany)
- 1.10 เครื่องเขย่า (Labnet, USA)
- 1.11 ไมโครปีเปต (Labnet, USA)
- 1.12 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sharp, Japan)
- 1.13 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Sanyo, Japan)
- 1.14 เครื่อง Autoclave
- 1.15 ตู้ Laminar air flow
- 1.16 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ
- 1.17 เครื่อง Hybridization oven
- 1.18 หลอด Hybridization
- 1.19 Pipette tip ขนาด 1,000, 200, และ 20 ไมโครลิตร
- 1.20 microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 1.21 แผ่นไนลอนเมมเบรน (Roche, Switzerland)
- 1.23 intensifier cassette (Kodak, Japan)

2. สารเคมี

- 2.1 1kb Gene ruler DNA Ladder (Fermentas, UK)
- 2.2 Loading dye (Fermentas, UK)
- 2.3 Agarose
- 2.4 TAE buffer
- 2.5 Chloroform
- 2.6 Ethidium bromide
- 2.7 6M NaI
- 2.8 Wash buffer
- 2.9 Deoxyribonucleotide triphosphate; dNTPs (Fermentas, UK)
- 2.10 Absolute ethanol
- 2.11 RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas, UK)
- 2.12 Calcium chloride
- 2.13 อาหารแข็งและอาหารเหลว 2xYT
- 2.14 DMSO
- 2.15 สารละลาย TB
- 2.16 TE buffer
- 2.17 Lysis buffer (0.2 mM NaOH, 1% SDS) สำหรับสกัดพลาสมิด
- 2.18 Precipitation buffer (5 M potassium acetate, 96% acetic acid)

สำหรับสกัดพลาสมิด

- 2.19 ไอโซโพรพานอล (isopropanol)
- 2.20 70% เอทานอล
- 2.21 dH₂O
- 2.22 RNase A (Fermentas, UK)
- 2.23 *Taq* DNA polymerase
- 2.24 10X *Taq* Buffer
- 2.25 เอนไซม์ตัดจำเพาะ FastDigest® *Eco*RI (Fermentas, UK)
- 2.26 T4 DNA Ligase
- 2.27 Competent cell ของเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ MachI
- 2.28 อาหารเหลว 2xYT และอาหารเหลว SOC

- 2.29 สารปฏิชีวนะ kanamycin
- 2.30 β – mercaptoethanol
- 2.31 Homogenization buffer (0.1 M NaCl, 0.2 M sucrose, 0.01 M EDTA, 0.03 M Tris-HCl, pH 8) สำหรับสกัดดีเอ็นเอ
- 2.32 Lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 2.5% SDS) สกัดดีเอ็นเอ
- 2.33 Precipitation buffer (5 M potassium acetate, 3 M 96% acetic acid) สกัดดีเอ็นเอ
- 2.34 DIG – dUTP (Roche, Switzerland)
- 2.35 Hybridization Buffer
- 2.36 Wash I (2X SSC, 0.1% SDS)
- 2.37 Wash II (0.5X SSC, 0.1% SDS)
- 2.38 Washing buffer (maleic buffer)
- 2.39 Tween 20
- 2.40 Blocking solution (Roche, Switzerland)
- 2.41 ฟิล์ม X-ray (Kodak, Japan)
- 2.42 CDP-Star chemiluminescent reagent (Roche, Switzerland)
- 2.43 Polypropylene plates (Roche, Switzerland)
- 2.45 Developer (Kodak, Japan)
- 2.46 Fixer (Kodak, Japan)

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างกล้วยที่แสดงอาการบ้นจีทอป

เก็บตัวอย่างกล้วยที่แสดงอาการของโรค Banana bunchy top disease (BBTD) จาก อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา ลักษณะอาการต้นแคระ ยอดเป็นกระจุกหรืออาการยอดอื่น ขอบใบเหลือง ใบและก้านรวมถึงลำต้นเป็นเส้นสีเขียวเข้มสลับกับเขียวอ่อน ที่ใบมีเส้นสีเขียวเข้มมีลักษณะคล้ายตะขอบริเวณที่ติดกับเส้นกลางใบ (hook) บริเวณกาบใบมีเส้นสีเขียวเข้มเป็นจุด (dot – dashes)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

2.1 การสกัดดีเอ็นเอรวม

ส่วนของใบกล้วยที่แสดงอาการของโรคนำมาสกัดดีเอ็นเอรวม โดยตัดใบกล้วย 0.5 กรัม ใส่ในหลอด microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร พร้อมสแตนเลสบีคขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร จำนวน 3 ลูก ที่มี homogenization buffer (50 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.2 M sucrose, 10 mM EDTA, pH 8.0, ที่เติม 1% β mercaptoetanol ก่อนใช้) 200 μ l ใช้เครื่องเขย่า 25 Hz นาน 2 นาที หลังจากนั้นเติม lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 2.5 % SDS pH 8.0 200 μ l ผสมให้เข้ากัน โดยการพลิกหลอดอุ่นที่ 65 °C 5 นาที เติม precipitation buffer (3M potassium acetate, pH 5.2) 300 μ l พลิกหลอดไปมา แล้วเติม $CHCl_3$ 300 μ l ทำให้สารละลายเข้ากัน โดยการ vortex แชนในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วหมุนเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใสย้ายใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol อัตรา 1 เท่าของปริมาตรส่วนใส พลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล 500 μ l แล้วเทออก เติม 70% เอทานอล 500 ไมโครลิตร อีกครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วินาที ใช้ pipette ดูดน้ำส่วนใสออกให้มากที่สุด เติมน้ำ + RNase เพื่อละลายตะกอน DNA เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การสกัดดีเอ็นเอวิธีสกัดพลาสมิด

ส่วนของกล้วยที่แสดงอาการทั้งใบอ่อนและใบแก่นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีสกัดแบบพลาสมิด ตัดใบกล้วย 0.5 กรัม ใส่ในหลอด microcentrifuge tube 1.5 มิลลิลิตร พร้อมสแตนเลสบีดจำนวน 3 ลูก ที่มี homogenization buffer 200 μ l (TE buffer + 1% β mercaptoetanol) ใช้เครื่องเขย่า 25 Hz นาน 2 นาที เติม lysis buffer 400 μ l (0.2% NaOH, 1% SDS) พลิกหลอดไปมา เติม precipitation buffer 300 μ l (3M potassium acetate + 5M acetic acid) พลิกหลอดไปมา แล้วเติม CHCl_3 300 μ l ทำให้สารละลายเข้ากัน โดยการ vortex แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที คูด่วนใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol อัตรา 1 เท่าของปริมาตรส่วนใส พลิกหลอดกลับไปมาเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล 500 μ l แล้วเทออก เติม 70% เอทานอล 500 ไมโครลิตรอีกครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วินาที ใช้ปิเปตคูดน้ำส่วนใสออกให้มากที่สุด เติมน้ำ + RNase เพื่อละลายตะกอน DNA เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

3. การออกแบบไพรเมอร์

3.1 การออกแบบไพรเมอร์ Universal

การออกแบบไพรเมอร์ Universal สำหรับตรวจสอบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยการสืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส ทั้ง 6 component จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) มาเปรียบเทียบโดยการ alignment ในโปรแกรม Clustal W หลักการเลือกคือเลือกบริเวณที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันมากที่สุดหรือเป็นบริเวณ Conserve region เพื่อให้ไพรเมอร์นั้นมีความจำเพาะกับทุก component โดยทำการเลือกบริเวณที่เป็น Stem loop common regions (CR-SL) ซึ่งเป็น โครงสร้างหลักมีลักษณะของ stem loop เป็นลักษณะเฉพาะของ *Banana bunchy top virus* ที่มีอยู่แต่ละ component ระยะห่างระหว่างไพรเมอร์ Forward และไพรเมอร์ Reverse ของไพรเมอร์ Universal ประมาณ 1,000 คู่เบส

3.2 การออกแบบไพรเมอร์ Specific

การออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละ component (Specific) สืบค้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* แต่ละ component จากฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ใน component เดียวกันนั้น มา alignment ในโปรแกรม Clustal W เลือกตำแหน่งในบริเวณที่เหมือนกันโดยเฉพาะบริเวณที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ คือ Open Reading Frame (ORF) ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะแต่ละ component ที่ให้ขนาดดีเอ็นเอต่างกัน

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

4.1 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 6 component เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบกล้วยเป็นดีเอ็นเอต้นแบบมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์ Universal U_BBTVF 5' CCC MGY GCT CRG GAC GGG ACA T 3' และ U_BBTVR 5' GGG TAA TAA TAR KCC CCM GYG C 3' ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 6 component ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction (PCR)) ซึ่งในปฏิกิริยามีองค์ประกอบดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dH ₂ O	39
10X Taq buffer	5
dNTP (10 mM, 2.5 each)	2
Primer	
U_BBTVF (10 mM)	1
U_BBTVR (10 mM)	1
Taq DNA polymerase	1
DNA Template 20 ng	1
รวม	50

ดูดสารละลายที่กล่าวข้างต้นลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่องใช้ Thermal Cycler (Biometra Germany) ที่ตั้งโปรแกรม ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ °C	เวลา (นาที)
Initial denaturation	94	5 1 รอบ
Denaturation	94	1
Annealing	58	1
Extention	72	1
Final extention	72	10 1 รอบ

} 34 รอบ

4.2 เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ component ที่ 2 และ 5 เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากใบกล้วยเป็นดีเอ็นเอต้นแบบมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยใช้ไพรเมอร์ Specific สำหรับ component ที่ 2 และ 5 ร่วมกับไพรเมอร์ Universal โดยแบ่งเป็นการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย Component ละ 3 ปฏิกิริยาพีซีอาร์

Component 2 ประกอบด้วยองค์ประกอบและปริมาตร ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dH ₂ O	39
10X Taq buffer	5
dNTP (10mM, 2.5 each)	2
Primer*	
BBTV 2-1F (10 mM)	1
U_BBTVR (10 mM)	1
Taq DNA polymerase	1
DNA Template 20 ng	1
รวม	50

* Primer U_BBTVF, BBTV 2-2R สำหรับปฏิกิริยาที่ 2,
BBTV 2-3F, BBTV 2-2R สำหรับปฏิกิริยาที่ 3

คู่มือสารละลายที่กล่าวข้างต้นแต่ละปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler (Biometra Germany) ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 34 รอบ ของกระบวนการ Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, กระบวนการ Annealing ที่ 62 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และกระบวนการ Extention ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นทำกระบวนการ Final extention ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

Component 5 ประกอบด้วยองค์ประกอบและปริมาณ ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
dH ₂ O	39
10X Taq buffer	5
dNTP (10mM, 2.5 each)	2
Primer*	
BBTV 5-1F (10 mM)	1
U_BBTVR (10 mM)	1
Taq DNA polymerase	1
DNA Template 20 ng	1
รวม	50

* Primer U_BBTVF, BBTV 5-2R สำหรับปฏิกิริยาที่ 2,
BBTV 5-3F, BBTV 5-2R สำหรับปฏิกิริยาที่ 3

คู่มือสารละลายที่กล่าวข้างต้นแต่ละปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler (Biometra Germany) ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 34 รอบ ของกระบวนการ Denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที, กระบวนการ Annealing ที่ 58 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และกระบวนการ Extention ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นทำกระบวนการ Final extention ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

นำดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1.0% agarose gel ในเครื่อง Electrophoresis ที่มี 1X TAE buffer เวลา 25 นาที กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย Ethidium bromide 10 µg/L (หรือ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้ UV transilluminator ด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene^R)

6. การเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR (PCR Product) เติม purified solution (26.2% Polyethylene glycol 800, 6.6 mM MgCl₂ · 6H₂O, 0.6 M sodium acetate) อัตรา 1:1 ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง เก็บตะกอนแล้วล้างด้วย 70% ethanol 50 µl พลิกหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ล้างด้วย 70% ethanol ออกให้หมด ละลายตะกอนด้วยน้ำ 30 µl ตรวจสอบผลการเตรียมดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค อิเล็กโตรโฟรีซิส บน 1% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TAE buffer เป็นเวลา 25 นาที ที่ 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene^R)

7. การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector) หรือการทำพลาสมิดสายผสม

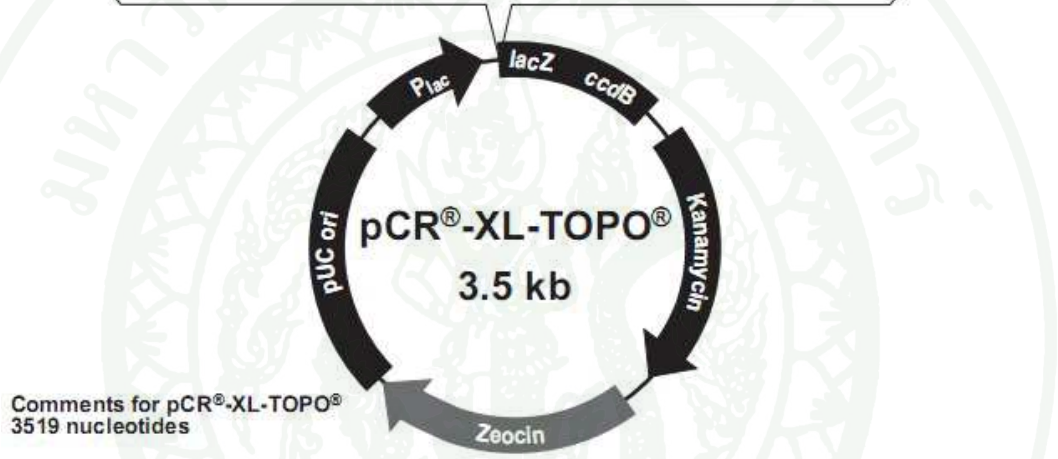
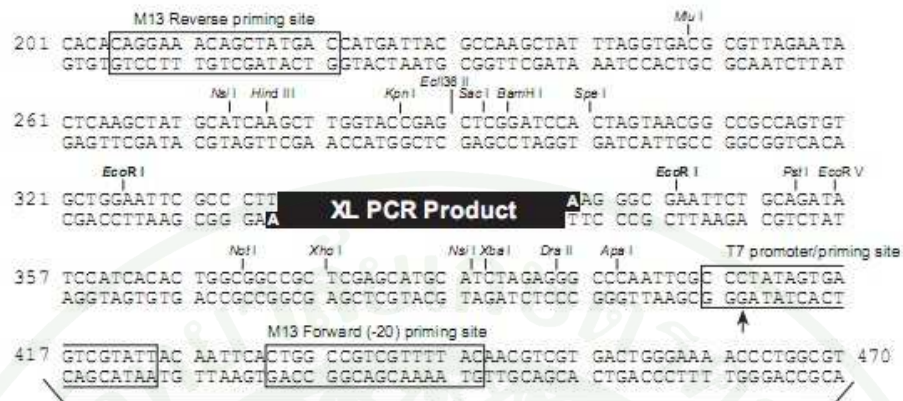
ทำการเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เข้ากับดีเอ็นเอพาหะ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ cloning vector (pCR[®]-XL-TOPO[®] cloning vector) ขนาด 3.5 kb จากบริษัท Invitrogen[®] เป็นดีเอ็นเอพาหะ ที่ชิ้นดีเอ็นเอจะเชื่อมต่อเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ โดยการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase ซึ่งมีองค์ประกอบของปฏิกิริยา Ligation ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณ
dH ₂ O	1.5 µl
Salt (1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl ₂)	1 µl
Vector pCR [®] -XL-TOPO [®]	0.5 µl
PCR Product	2 µl
รวม	5 µl

ดูดสารละลายแต่ละตัวข้างต้นลงใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายซึ่งมีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 5 ไมโครลิตร ให้เข้ากันโดยการ ดูดขึ้นและลงเบาๆ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อรอการถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย

8. การถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

ถ่ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ MachI ด้วยวิธี CaCl₂/Heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2001) โดยเติมพลาสมิดสายผสมจากปฏิกิริยา ligation ที่มีปริมาตร 5 µl ลงใน Competent cell ของแบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ MachI ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยการเคาะหลอดเบาๆ ใช้เวลาทำปฏิกิริยา 30 นาทีในน้ำแข็ง แล้วย้ายไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทันทีเป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งอีกครั้ง 3 นาที เอาออกจากน้ำแข็งมาเติม SOC medium ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำหลอดไปแช่ในเครื่องที่ควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์มีการเจริญเติบโต เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เทอาหารเหลวบางส่วนทิ้งให้เหลือประมาณ 50 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์ จากนั้นดูดสารละลายนำมาเกลี่ยบนอาหาร 2xYT agar (Tryptone 16 g, Yeast Extract 10 g, NaCl 5 g, Agar 15 g ปรับปริมาตร 1L) ที่มี Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีชั้นมีดีเอ็นเอสายผสม แล้วนำไปบ่มในตู้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 แผนที่ยีนบนพลาสมิด pCR®-XL-TOPO® cloning vector พลาสมิดมีขนาด 3,519 คู่เบส โปรโมเตอร์ T7 promotor มียีนต้านสารปฏิชีวนะ kanamycin ใช้คัดเลือกแบคทีเรียที่ได้รับพลาสมิดชนิดนี้และมี origin of replication เป็น pUC ขึ้นยีน BBTV ขนาด ประมาณ 1,000 คู่เบส จะแทรกอยู่ในตำแหน่ง TA overhang ที่มีเอนไซม์ Topoisomerase เชื่อมติดไว้ ทำหน้าที่เชื่อมดีเอ็นเอ เข้ากับเวกเตอร์ และมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ EcoRI อยู่ใกล้ตำแหน่งเชื่อมต่อของดีเอ็นเอกับเวกเตอร์

9. การคัดเลือกโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสม

ทำการคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการถ่ายพลาสมิดสายผสม Recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์บนอาหารแข็ง 2xYT ที่มี Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารนำไป

ตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอขนาด ~1,000 bp ที่เชื่อมอยู่ในเวกเตอร์ ด้วยปฏิกิริยา PCR และ PCR Profile ตามที่กล่าวข้างต้น โดยมีไพรเมอร์ Universal r U_BBTVF และ U_BBTVR เป็นตัวตรวจสอบ

10. การสกัดพลาสมิดของดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

คัดเลือกเซลล์ของเชื้อ *E. coli* ที่เจริญบนอาหารคัดเลือกแต่ละโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 2 มิลลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง สกัดพลาสมิด จากนั้นทำการสกัดพลาสมิดด้วยวิธี alkaline lysis ดูดเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในอาหารเหลวลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิตร ปั่นเก็บเซลล์ปริมาตร 1.5 มิลลิตร ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารทิ้งไป เติม homogenization buffer 200 μ l (TE buffer + 1% β mercaptoethanol) ละลายตะกอนด้วยการ vortex เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเติม lysis buffer 400 μ l (0.2% NaOH, 1% SDS) พลิกหลอดไปมา เติม precipitation buffer 300 μ l (3M potassium acetate + 5M acetic acid) พลิกหลอดไปมา แล้วเติม คลอโรฟอร์ม (CHCl_3) 300 μ l ทำให้สารละลายเข้ากัน โดยการ vortex แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ดูดส่วนใสย้ายใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol อัตรา 1 เท่าของปริมาตรส่วนใส พลิกหลอดกลับขึ้นมาเบา ๆ นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอที่ 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 70% เอทานอล 500 ไมโครลิตร แล้วเทออก เติม 70% เอทานอล 500 ไมโครลิตร อีกครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 วินาที ใช้ปิเปตดูดน้ำส่วนใสออกให้มากที่สุด เติมน้ำ + RNase เพื่อละลายตะกอน DNA เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1.0 % อะกาโรสเจล ในเครื่อง Electrophoresis ที่มี 1X TAE buffer เวลา 25 นาที กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย Ethidium bromide 10 μ g/L (หรือ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้ UV transilluminator ด้วยเครื่อง Gel documentation (Syngene^R)

11. ตรวจสอบโคลนที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

ตรวจสอบ Recombinant plasmid คือพลาสมิดที่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ *Banana bunchy top virus* (BBTV) ขนาด ~1,000 bp โดยทำปฏิกิริยา Fast digestion ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Restriction Enzyme (*EcoRI*) ซึ่งมีตำแหน่งจดจำอยู่บนพลาสมิดเวกเตอร์ pCR[®]-XL-TOPO การตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะมี องค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
dH ₂ O	3
10X buffer <i>EcoRI</i>	1
Enzyme <i>EcoRI</i> FastDigest [®]	1
Plasmid (0.1 ไมโครกรัม)	5
รวม	10

ดูดพลาสมิดที่ต้องการตรวจสอบปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารที่กล่าวข้างต้นลงไปหลอดตามปริมาณที่กำหนดไว้โดยเติมเอนไซม์เป็นตัวสุดท้ายผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยการ vortex จากนั้นปั่นเหวี่ยงหลอดด้วยเครื่องตกตะกอนสารตัวอย่างขนาดเล็ก (Spin down centrifuge) นาน 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดเวลา นำ 5 ไมโครลิตร ของผลิตภัณฑ์ หลังจากการทำปฏิกิริยามาตรวจสอบ ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis) บน 1.0 % อะกาโรสเจล ในเครื่อง Electrophoresis ที่มี 1X TAE buffer เวลา 25 นาที กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย Ethidium bromide 10 µg/L (หรือ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้ UV transilluminator ด้วยเครื่อง Gel documentation (SyngeneR)

12. การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

นำพลาสมิดที่ตรวจสอบพบว่าให้ผลเป็นบวกจากการตรวจสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค dideoxy-chain termination (Sanger *et al.*, 1977) โดยใช้ชุดปฏิกิริยา BigDye[®] Terminator kot ของบริษัทไบโอดีไซน์ ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ไพรเมอร์ คือ T7 forward [5' GTAAAACGACGGCCAG 3'] กับ M13 reverse [5' CAGGAAACA

GCTATGAC 3'] ที่มีตำแหน่งจดจำอยู่บนเวกเตอร์นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม fishTV เพื่อหาลำดับของไพรเมอร์ และยีนของ BBTV และแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวเป็นกรดอะมิโน ส่วน component ที่ 2 และ 5 ใช้ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยา PCR ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

DNA component 2 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ U_BBTVF, BBTV 2-2R จะใช้ไพรเมอร์ U_BBTVF และ BBTV 2-2R ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 2 สาย ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ BBTV 2-1, U_BBTVR จะใช้ไพรเมอร์ U_BBTVR ในการวิเคราะห์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1 สาย ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ BBTV 2-3F, BBTV 2-2R จะใช้ไพรเมอร์ BBTV 2-3F ในการวิเคราะห์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1 สาย สำหรับ Component 5 ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ BBTV 5-1, U_BBTVR จะใช้ไพรเมอร์ U_BBTVR ในการวิเคราะห์จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 1 สาย ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ U_BBTVF, BBTV 5-2R จะใช้ไพรเมอร์ U_BBTVF และ BBTV 5-2R ในการวิเคราะห์ จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 2 สาย ผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้คู่ไพรเมอร์ BBTV 5-3F, BBTV 5-2R จะใช้ไพรเมอร์ BBTV 5-3F ในการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับ component 5 จะได้ทั้งหมด 4 สาย

ใช้โปรแกรม Clustal W เพื่อจัดเรียงทิศทางของซันดีเอ็นเอให้เชื่อมต่อกัน ทั้ง DNA component 1-6 จนได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เรียงอย่างถูกต้อง จากนั้นเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้แต่ละ component เพื่อดูความเหมือนและแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ไปวิเคราะห์การสร้างชนิดโปรตีนว่าเหมือนหรือใกล้เคียงกับจีโนมในฐานข้อมูล GenBank

13. การตรวจสอบเชื้อ *Banana bunchy top virus* ทั้งจีโนมด้วยวิธีพีซีอาร์

สกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยด้วยวิธีการสกัดแบบการสกัดพลาสมิดดังที่กล่าวข้างต้น นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในปฏิกิริยาพีซีอาร์เพื่อตรวจสอบหาเชื้อ *Banana bunchy top virus* DNA component ที่ 1- 6 จะแบ่งเป็นสองปฏิกิริยา แต่ละปฏิกิริยาจะให้อุณหภูมิ Annealing เท่ากัน ดังนั้นจะใช้ไพรเมอร์ปฏิกิริยาละ 3 คู่ไพรเมอร์ในการตรวจสอบดีเอ็นเอ Component ที่ 2, 4,

5 ใช้ไพรเมอร์ BBTV 2-3 F BBTV 2-2R, BBTV 4-1 F BBTV 4-2R, BBTV 5-1R BBTV 5-2R สำหรับดีเอ็นเอ Component ที่ 1, 3, 6 BBTV 1-1 F BBTV 1-2R, BBTV 3-1 F BBTV 3-2R, BBTV 6-1R BBTV 6-2R

ในการตรวจสอบเชื้อ *Banana bunchy top virus* ด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ Specific Primer ที่ออกแบบมาอย่างจำเพาะแต่ละ component โดยมีส่วนประกอบของปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย Component ที่ 2, 4, 5 ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
dH ₂ O	38
10X Taq buffer	5
dNTP (10mM, 2.5 each)	2
Primer	
BBTV 2-3F (10 mM)	0.5
BBTV 2-2R (10 mM)	0.5
BBTV 4-1F(10 mM)	0.5
BBTV 4-2R(10 mM)	0.5
BBTV 5-1R(10 mM)	0.5
BBTV 5-2R(10 mM)	0.5
Taq DNA polymerase	1
DNA Template 20 ng	1
รวม	50

ดูดสารละลายที่กล่าวข้างต้นแต่ละปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler (Biometra Germany) ที่ตั้งโปรแกรม ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ °C	เวลา (นาที)
Initial denaturation	94	5 1 รอบ
Denaturation	94	1
Annealing	58	1
Extention	72	1
Final extention	72	10 1 รอบ

ส่วนประกอบสำหรับปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย Component 1, 3, 6 มีดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณ
dH ₂ O	38 µl
10X Taq buffer	5 µl
dNTP (10mM, 2.5 each)	2 µl
Primer	
BBTV 1-1F(10 mM)	0.5 µl
BBTV 1-2R(10 mM)	0.5 µl
BBTV 3-1F(10 mM)	0.5 µl
BBTV 3-2R(10 mM)	0.5 µl
BBTV 6-1F(10 mM)	0.5 µl
BBTV 6-2R(10 mM)	0.5 µl
Taq DNA polymerase	1 µl
DNA Template 20 ng	1 µl
รวม	50 µl

คู่มือสารละลายที่กล่าวข้างต้นแต่ละปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler (Biometra Germany) ที่ตั้งโปรแกรม ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ °C	เวลา (นาที)
Initial denaturation	94	5 1 รอบ
Denaturation	94	1
Annealing	60	1
Extention	72	1
Final extention	72	10 1 รอบ

14. การตรวจสอบหา DNA component 3 และ DNA component 6 ในตัวอย่างกล้วยด้วยเทคนิค

Dot blot hybridization

นำชิ้นส่วนใบของต้นกล้วยตัวอย่างมาแยกสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีสกัดแบบการสกัดพลาสติกตามวิธีการทดลองข้อ 2 ตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1.0% agarose gel ในเครื่อง Electrophoresis ที่มี 1X TAE buffer เวลา 25 นาที กระแสไฟฟ้า 135 โวลต์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย Ethidium bromide 10 µg/L (หรือ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้ UV transilluminator ด้วยเครื่อง Gel documentation

14.1 การเตรียมดีเอ็นเอโพรบ

เตรียมดีเอ็นเอโพรบ โดยปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่จะมีการติดฉลากโพรบด้วยสารปลดครึ่งดี Digoxigenin (DIG) คือ DIG-dUTP

ดีเอ็นเอโพรบของยีน BBTV 3 มีส่วนประกอบของปฏิกิริยามี ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
dH ₂ O	17
10x buffer Taq DNA polymerase (1x)	2.5
10x DIG-dUTP/dNTP (0.1 mM dUTP)	2.5
ไพรเมอร์ BBTV 3-1F (20 µM)	0.5
ไพรเมอร์ BBTV 3-2R (20 µM)	0.5
Taq DNA polymerase	1
พลาสติก	1
รวม	25

ดีเอ็นเอโพรบของยีน BBTV 6 มีส่วนประกอบของปฏิกิริยามี ดังนี้

องค์ประกอบ	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
dH ₂ O	17
10x buffer Taq DNA polymerase (1x)	2.5
10x DIG-dUTP/dNTP (0.1 mM dUTP)	2.5
ไพรเมอร์ BBTV 6-1F (20 μM)	0.5
ไพรเมอร์ BBTV 6-2R (20 μM)	0.5
Taq DNA polymerase	1
พลาสติก	1
รวม	25

ดูดสารละลายที่กล่าวข้างต้นแต่ละปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ แล้วนำเข้าเครื่อง Thermal Cycler (Biometra Germany) ทั้ง 2 ปฏิกิริยา ที่ตั้งโปรแกรม ดังนี้

ปฏิกิริยา	อุณหภูมิ °C	เวลา (นาที)
Initial denaturation	94	5 1 รอบ
Denaturation	94	1
Annealing	60	1
Extention	72	1
Final extention	72	10 1 รอบ

ตรวจสอบขนาดของโพรบที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยเทคนิค 1% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ก่อนนำโพรบไปไฮบริไดซ์กับดีเอ็นเอเป้าหมาย ให้นำโพรบ 1 ไมโครลิตรไปเจือจางด้วย dH₂O ปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นแช่น้ำแข็งนานประมาณ 5 นาที

14.2 การตรึงดีเอ็นเอบนเมมเบรน

หยดตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจลงบนแผ่นไนลอนเมมเบรนปริมาตร 5 ไมโครลิตร รอจนกระทั่งแผ่นเมมเบรนแห้งจึงหยด denature buffer บนตัวอย่างดีเอ็นเอ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นตรึงดีเอ็นเอบนแผ่นเมมเบรนด้วยแสงยูวีเป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที

14.3 Prehybridization

นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการ fix ด้วยแสงยูวี มาทำพรีไฮบริไดซ์ด้วย hybridization buffer โดยใช้อัตราส่วนบัฟเฟอร์ : เมมเบรน เท่ากับ 0.1 มิลลิลิตรต่อตารางเซนติเมตร (ml/cm²) ใน hybridization roller bottle จากนั้นนำเมมเบรนไปป้อนใน hybridization chamber ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

14.4 Hybridization

นำแผ่นเมมเบรนที่ผ่านการทำพรีไฮบริไดซ์ด้วย hybridization buffer มาทำไฮบริไดซ์กับ โพรบซึ่งติดฉลากด้วยสารปลดปล่อย Digoxigenin (DIG) ที่ผสมกับ hybridization buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำแผ่นเมมเบรนไปป้อนใน hybridization chamber ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 18 ถึง 22 ชั่วโมง

14.5 Washing

ทำการกำจัด unhybridized probe ด้วยการล้างด้วยสารละลาย wash I Low stringency wash (2 X SSC, 0.1% SDS) ครั้งละ 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิห้อง ตามด้วยสารละลาย wash II High stringency wash (0.5x SSC, 0.1% SDS) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นานครั้งละ 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง และแช่ใน washing buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl และ 0.03% tween 20) ที่อุณหภูมิห้อง ครั้งละ 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง

14.6 Detection

นำเมมเบรนมาเติม 1x blocking solution (Qiagen) ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีด้วยการเขย่าเบาๆ จากนั้นนำเมมเบรนมาเติมสารละลายที่ประกอบด้วย 1x blocking solution : anti DIG ติดฉลากด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase เท่ากับ 1: 10,000 ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ด้วยการเขย่าเบาๆ แล้วนำเมมเบรนออกมาใส่ในกล่องพลาสติกที่สะอาดแล้วเติมสารละลาย wash buffer (0.1 M maleic acid, 0.15 M NaCl และ 0.03% tween 20) ให้มากเกินไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 10 นาที จำนวน 2 ครั้ง นำเมมเบรนออกมาวางในถุงพลาสติกที่สะอาดเติม CDP-Star[®] ซึ่งเป็น chemiluminescent reagent สำหรับ alkaline phosphatase detection buffer ในอัตราส่วน 1 : 500 เกลี่ยให้ทั่วเมมเบรน ปิดฉนวนถุง แล้วนำไปประกบกับฟิล์ม X – ray (Kodak) นาน 30 นาที นำฟิล์ม X-ray ไปล้างน้ำยา developer solution นาน 1 นาที จากนั้นล้างฟิล์มด้วยน้ำกลั่นประมาณ 1 นาที และ fixer solution นาน 5 นาที (ทำในห้องมืดตั้งแต่ขั้นตอนการประกบฟิล์ม)

ผลและวิจารณ์

1. การออกแบบไพรเมอร์

1.1 การออกแบบไพรเมอร์ Universal

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ทั้ง 6 component ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank ซึ่งเป็นลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม รวม 6 component โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ สามารถออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนบริเวณ Stem loop common region (CR-SL) ได้พอดี (ตารางที่ 1) จากนั้นนำไพรเมอร์ไปใช้ในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้ง 6 component ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* จากดีเอ็นเอสกัดตัวอย่างได้

เนื่องจากจีโนมของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ เรียกว่า Stem loop common region (CR-SL) ซึ่งปรากฏอยู่ทุก component ดังนั้น ในการออกแบบไพรเมอร์ทั้ง Forward และ Reverse จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหลื่อมซ้อนกัน 1 เบส เมื่อไพรเมอร์เริ่มการสังเคราะห์จนเสร็จสิ้นปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง component พอดี

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ Universal ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
U_BBTVF	5' CCC MGY GCT CRG GAC GGG ACA T 3'
U_BBTVR	5' GGG TAA TAA TAR KCC CCM GYG C 3'

K = G/T, M = A/C, R = G/A, Y = C/T

1.2 การออกแบบไพรเมอร์ Specific

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับการสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA component ที่ 2 และ 5 โดยมีไพรเมอร์ DNA component ละ 3 ไพรเมอร์ เพื่อใช้ร่วมกับไพรเมอร์ Universal ในการสังเคราะห์ component ที่ 2 และ 5 ให้ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ครบทั้ง component โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 2) ที่ถูกออกแบบมาจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ Open Reading Frame (ORF) ของจีโนม component ดังกล่าว

ตารางที่ 2 ไพรเมอร์ Specific ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ สำหรับ component 2 และ 5

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
BBTV 2-1F	5' GCT GAG GCG GAA GAT CGC CA 3'
BBTV 2-2R	5' GAT GAT CGC CGG TGG CGA TCT TC 3'
BBTV 2-3F	5' GGG ACC ACA GAT AAG ACA GC 3'
BBTV 5-1F	5' TGG GAA TVG TCT GCC ATG CCA G 3'
BBTV 5-2R	5' AGG AAG CAG GAA GTT CCT CAT CAC 3'
BBTV 5-3F	5' GGA ATG TTA TCA TGG CAT CGA C 3'

จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ทั้ง 6 component ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank นำลำดับนิวคลีโอไทด์ใน component เดียวกันมาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในโปรแกรม Allign X (Clustal W) แล้วเลือกตำแหน่งในบริเวณที่เหมือนกันโดยเฉพาะบริเวณที่สามารถแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ คือ Open Reading Frame (ORF) ได้ไพรเมอร์ที่จำเพาะแต่ละ component และขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 โพรเมอร์ Specific สำหรับ DNA Component ที่ 1-6 ที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

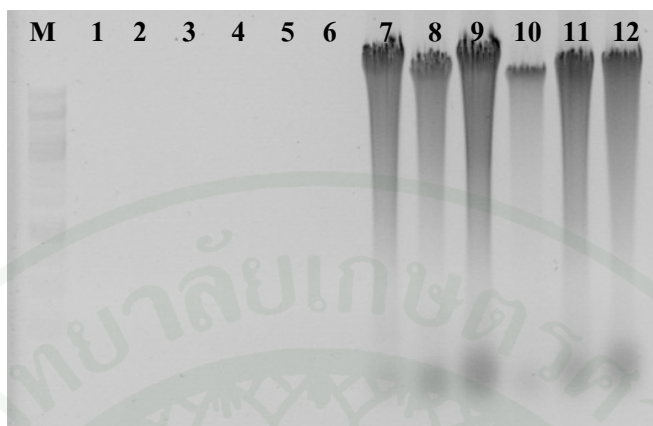
ชื่อโพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์
BBTV 1-1F	GCGCGATATGTGGTATGCTGGAT	280 คู่เบส
BBTV 1-2R	GCACCAAACCTCGAAGGGACCT	
BBTV 2-3F	GGGACCACAGATAAGACAGC	532 คู่เบส
BBTV 2-2R	GATGATCGCCGGTGGCGATCTTC	
BBTV 3-1F	CACCGCGAGGTATCCGAAGAAATC	500 คู่เบส
BBTV 3-2R	TCATACATGATATGTAATTCTGTTCTGGTAG	
BBTV 4-1F	GCACGCAGGGAAATGGCATT	333 คู่เบส
BBTV 4-2R	CTTGCTCGTCCCTTCTAGGTTGA	
BBTV 5-1F	TGGGAATCGTCTGCCATGCCAG	351 คู่เบส
BBTV 5-2R	AGGAAGCAGGAAGTTCCTCATCAC	
BBTV 6-1F	GCCAGCCTGGAAGTGGATAAT	918 คู่เบส
BBTV 6-2R	GGGCTACGTTGTAAACCAATCAGAGATTAG	

2. การสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีสกัดแบบสกัดพลาสมิด (Alkaline lysis)

การสกัดดีเอ็นเอจากใบกล้วยที่แสดงอาการบ้นซีทอป ตัวอย่างจาก อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา โดยใช้วิธีแบบสกัดพลาสมิด (alkaline lysis) เปรียบเทียบกับการสกัดดีเอ็นเอรวม ปรากฏว่าวิธีการสกัดแบบสกัดพลาสมิดนั้นไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอแต่การสกัดดีเอ็นเอรวมปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 7) เนื่องจากการสกัดแบบการสกัดดีเอ็นเอรวมนั้น จะได้ดีเอ็นเอทั้งหมดคือดีเอ็นเอของกล้วยและไวรัส สำหรับการสกัดแบบสกัดพลาสมิดนั้น จะได้เฉพาะดีเอ็นเอของไวรัส *Banana bunchy top virus* เพราะจีโนมของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* เป็น Multipartite genome ประกอบด้วย ssDNA ที่มีลักษณะเป็นวงกลมปิด ทั้ง 6 component ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับพลาสมิด เมื่อนำมาตรวจหาแถบดีเอ็นเอของวิธีการสกัดแบบพลาสมิดนั้น ไม่มีแถบดีเอ็นเอของพืช อยู่เลยและเป็นไปได้ว่าดีเอ็นเอของไวรัสอาจมีจำนวนน้อยจึงไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของไวรัส



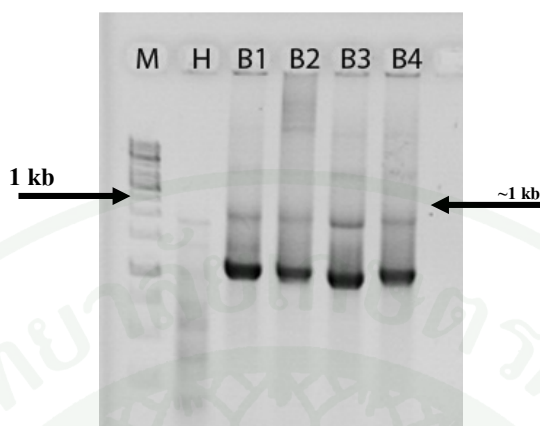
ภาพที่ 6 ตัวอย่างกล้วยที่แสดงอาการบ้นชีทอป ต้นแคระแกร็น ขอบใบไหม้เหลือง ใบ ก้านและ
ลำต้นเป็นรอยขีดสีเขียวเข้ม (dot-dashes)



ภาพที่ 7 เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอจากกล้วยที่ใช้วิธีสกัด 2 วิธี จากกล้วย 6 ตัวอย่าง ช่องเจลที่ 1-6 ใช้วิธีแบบการสกัดพลาสติก, ช่องเจลที่ 7-12 ใช้วิธีสกัดดีเอ็นเอรวม, ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (Fermentus)

3. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อ *Banana bunchy top virus* ด้วยวิธีพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ Universal

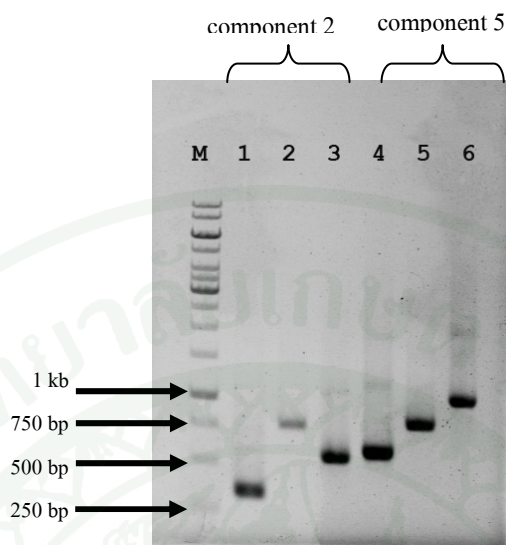
นำดีเอ็นเอรวม (total DNA) ที่สกัดจากใบกล้วยตัวอย่าง จาก อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา มาใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส BBTV ทั้งจีโนมด้วยปฏิกิริยา PCR ที่ใช้ Universal primer U_BBTVF 5' CCC MGY GCT CRG GAC GGG ACA T 3' และ U_BBTVR 5' GGG TAA TAA TAR KCC CCM GYG C 3' ที่ออกแบบจากบริเวณ CR-SL เมื่อตรวจสอบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโตรโพรเซสและดูแถบดีเอ็นเอภายใต้ยูวี พบแถบดีเอ็นเอขนาด ~1,000 คู่เบส (ภาพที่ 8) จากตัวอย่างกล้วยทั้งหมด (B1, B2, B3 และ B4) ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่คาดไว้ และไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าวในตัวอย่างกล้วยปกติ (H) จากปฏิกิริยา PCR เมื่อใช้ Universal primer สามารถตรวจสอบดีเอ็นเอเป้าหมายได้ พบแถบดีเอ็นเอขนาด ~1,000 bp ที่มีลักษณะเข้ม แสดงให้เห็นว่าปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายมีจำนวนค่อนข้างมากจากการใช้ Universal primer ที่มีนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 1 ตำแหน่ง ในบริเวณ Stem loop ซึ่งเป็นโครงสร้างสำคัญของเชื้อ BBTV ที่มีอยู่ทั้ง 6 component หรือเรียกว่าบริเวณอนุรักษ์ ไพรเมอร์ทั้งสองจะเริ่มต้นที่จุดเดียวกันแต่สังเคราะห์สายดีเอ็นเอในทิศทางที่แยกออกจากกัน เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ จะทำให้ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้เท่ากับขนาดดีเอ็นเอ component ของเชื้อ BBTV



ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของ *Banana bunchy top virus* ที่ตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ ใช้ Universal Primer M คือ ขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (ช่อง M) 1 kb (Fermentus) และ ช่องเจด H คือ กล้วยที่ไม่แสดงอาการของโรค bunchy top ช่องเจด B1-B4 คือ ตัวอย่าง กล้วยที่แสดงอาการของโรค

4. การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ด้วยไพรเมอร์ Specific

การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* DNA Component 2 และ 5 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Specific และไพรเมอร์ Universal เพื่อให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอครบ ทั้งจีโนม โดยแบ่งปฏิกิริยาเป็น component ละ 3 ปฏิกิริยา เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยาจะพบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน (ภาพที่ 9) เนื่องจากการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะและต่อเนื่อง จนสามารถสังเคราะห์สายดีเอ็นเอจนครบทั้ง component ในแต่ละปฏิกิริยาต่อ 1 คู่ไพรเมอร์นั้น จะได้ขนาดดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับช่องเจด ดังนี้ 1. U_BBTVF กับ BBTV2-2R ได้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 300 คู่เบส 2. BBTV2-1F กับ U_BBTVR ได้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 750 คู่เบส 3. BBTV2-3F กับ BBTV2-2R ได้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 530 คู่เบส 4. BBTV5-1F กับ U_BBTVR ได้ขนาดของดีเอ็นเอเท่ากับ 570 คู่เบส 5. U_BBTVF กับ BBTV5-2R ได้ขนาดดีเอ็นเอเท่ากับ 800 คู่เบส 6. BBTV5-3F กับ BBTV5-2R ได้ดีเอ็นเอขนาดเท่ากับ 970 คู่เบส นำดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์แล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค dideoxy-chain termination (Sanger *et al.*, 1977) โดยใช้ชุดปฏิกิริยา BigDye® Terminator kot ของบริษัทไบโอดีไซน์



ภาพที่ 9 ผลการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของ *Banana bunchy top virus* Component 2 และ 5 ; Component 2 คือ ช่องเจล 1 ขนาด ~300 คู่เบส (U_BBTVF, BBTV 2-2R), ช่องเจล 2 ขนาด ~750 คู่เบส (BBTV 2-1, U_BBTVR), ช่องเจล 3 ขนาด ~ 530 คู่เบส (BBTV 2-3F, BBTV 2-2R). Component 5 คือ ช่องเจล 4 ขนาด ~ 570 คู่เบส (BBTV 5-1, U_BBTVR), ช่องเจล 5 ขนาด ~ 800 คู่เบส (U_BBTVF, BBTV 5-2R), ช่องเจล 6 ขนาด ~970 คู่เบส (BBTV 5-3F, BBTV 5-2R), M คือ ขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Fermentus)

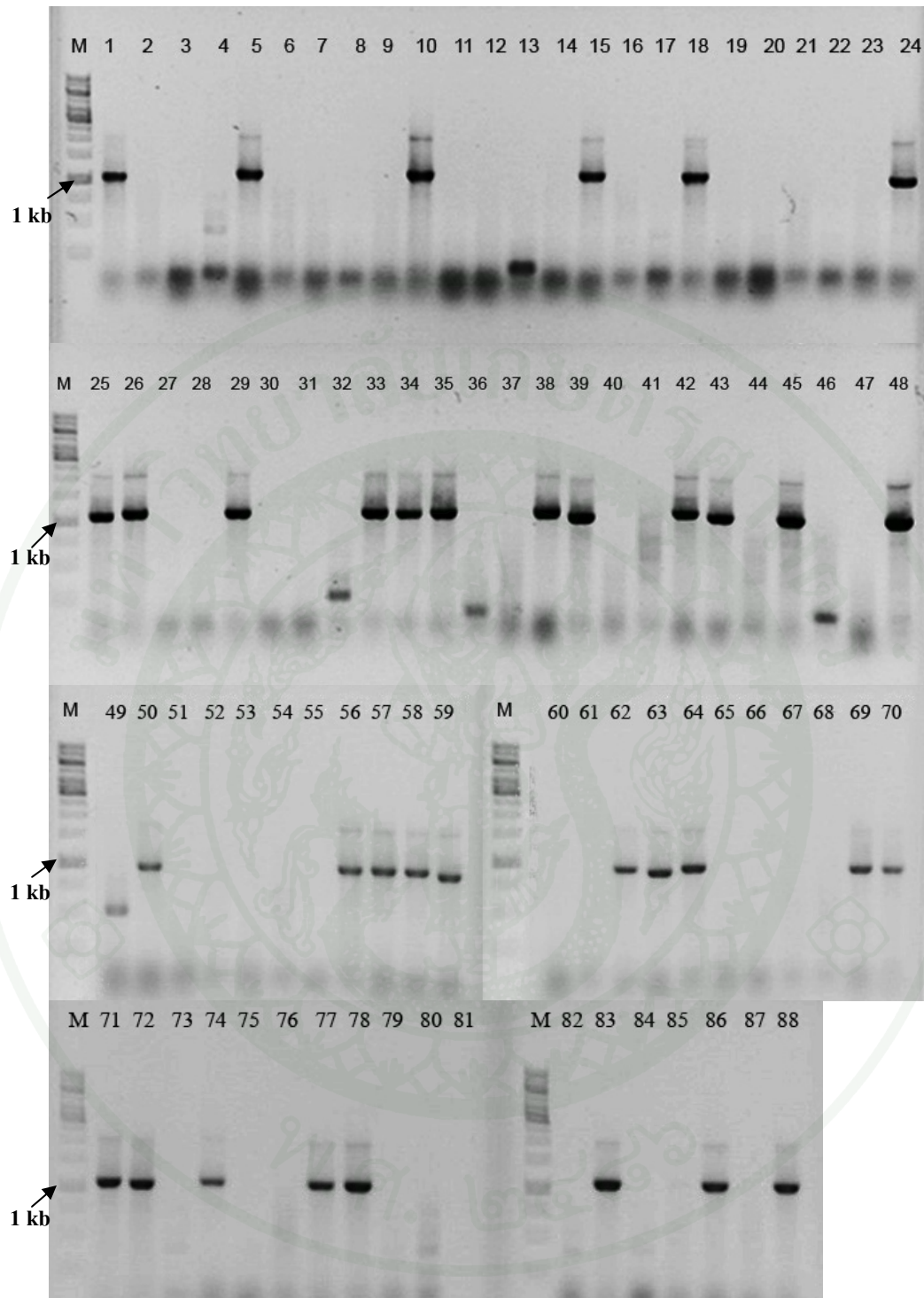
5. การเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะ (vector) และตรวจเช็คโคลนนิ่งที่มี Recombinant plasmid

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ใช้ Universal primer มีขนาด ประมาณ 1,000 คู่เบส เมื่อทำให้บริสุทธิ์ นำมาเชื่อมต่อกับ cloning vector (pCR[®]-XL-TOPO[®] cloning vector) ที่มีขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส ซึ่งเวกเตอร์ดังกล่าวมีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *EcoRI* อยู่ 2 ตำแหน่ง บริเวณใกล้กับตำแหน่งของ inserting site และมียีนต้านสารปฏิชีวนะ Kanamycin หลังจากเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับเวกเตอร์ ได้ถ่ายโอนพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ MachI ด้วยวิธีด้วยวิธี $CaCl_2$ /Heat shock transformation ทำการคัดเลือก โคโลนีบนอาหาร 2xYT agar ที่มี Kanamycin 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งพบโคโลนีจำนวนมาก จึงสุ่มเลือกโคโลนีมาทำมาสเตอร์เพลทบนอาหารแข็งชนิดเดิม พร้อมกับตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Universal ทำการทดสอบจำนวน 88 โคโลนี เมื่อตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอ ขนาด

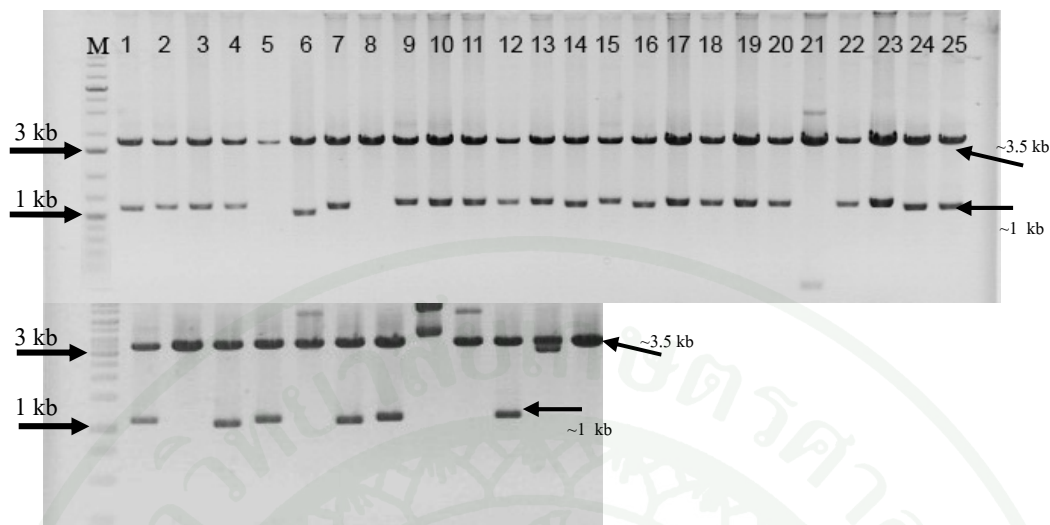
ประมาณ 1,000 คู่เบส จำนวน 36 โคลน (ภาพที่ 10) จึงนำโคโลนีทั้ง 36 โคลน เพิ่มปริมาณในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรีย แล้วนำมาสกัดพลาสมิดเพื่อตรวจสอบหา Recombinant plasmid ด้วยวิธีการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

6. การตรวจสอบ Recombinant plasmid โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Restriction Enzyme *EcoRI*

ตัดย่อยพลาสมิดทั้ง 36 โคลนและอีก 1 โคลนที่เป็น negative control ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* แล้วตรวจสอบคุณภาพและขนาดบน 1% อะกาโรสเจล เพื่อตรวจสอบการแทรกของชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* บนเวกเตอร์ พบว่าพลาสมิดจากโคโลนีที่ 1-4, 6-7, 9-20, 22-26, 28-29, 31-32, 35 มีแถบดีเอ็นเอสองแถบ ขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส อยู่แถบด้านบน และขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส อยู่แถบล่าง (ภาพที่ 11) น่าจะเป็นแถบชิ้นดีเอ็นเอของเวกเตอร์ pCR[®]-XL-TOPO[®] และแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส banana bunchy top ที่แทรกอยู่ ตามลำดับ ซึ่งถูกเอนไซม์ *EcoRI* ตัดออกจากเวกเตอร์ บริเวณ inserting site ในปฏิกิริยา Fast digestion พลาสมิดโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส BBTV แทรกอยู่ (Recombinant Plasmid) เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ *EcoRI* จะได้แถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสขนาด ~1,000 bp และเวกเตอร์ขนาด 3.5 kb ได้คัดเลือกโคลนหมายเลข 1, 2, 6, 15, 24 รวม 5 โคลน เป็นพลาสมิดที่ตรวจสอบแล้วพบว่าให้ผลเป็นบวกจากการตรวจสอบด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งได้มาจากพลาสมิดของโคลนที่ 1, 5, 24, 42, 56 ตามลำดับ นำพลาสมิดไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยเทคนิค dideoxy-chain termination (Sanger *et al.*, 1977) โดยใช้ชุดปฏิกิริยา BigDye[®] Terminator kot ของบริษัท ไบโอดีไซน์ ใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ไพรเมอร์ คือ T7 forward กับ M13 reverse ที่มีตำแหน่งจดจำอยู่บนเวกเตอร์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม fishTV เพื่อหาลำดับของไพรเมอร์ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในโปรแกรม Clustal W และในฐานข้อมูล NCBI



ภาพที่ 10 การตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอขนาด ~1,000 คู่เบส ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Universal จำนวน 88 โคลน M คือ ขนาดกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Fermentus)



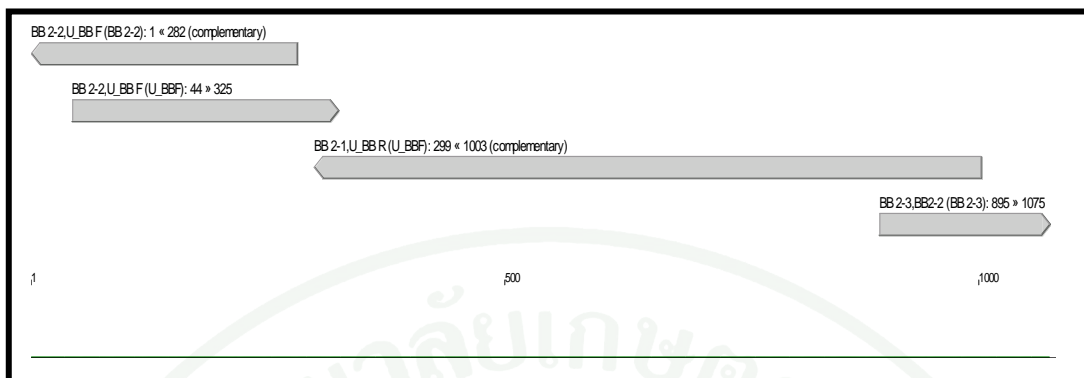
ภาพที่ 11 การตรวจสอบ Recombinant plasmid โดยการตัดพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Restriction Enzyme *EcoRI* ช่อง M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb (Fermentus) ช่องเจลที่ 1 ถึง 36 คือ โคลนที่คาดว่ามียีนของ BBTV ช่องเจลที่ 37 คือ พลาสมิดที่ไม่มีดีเอ็นเอของ BBTV (negative control)

7. ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส BBTV

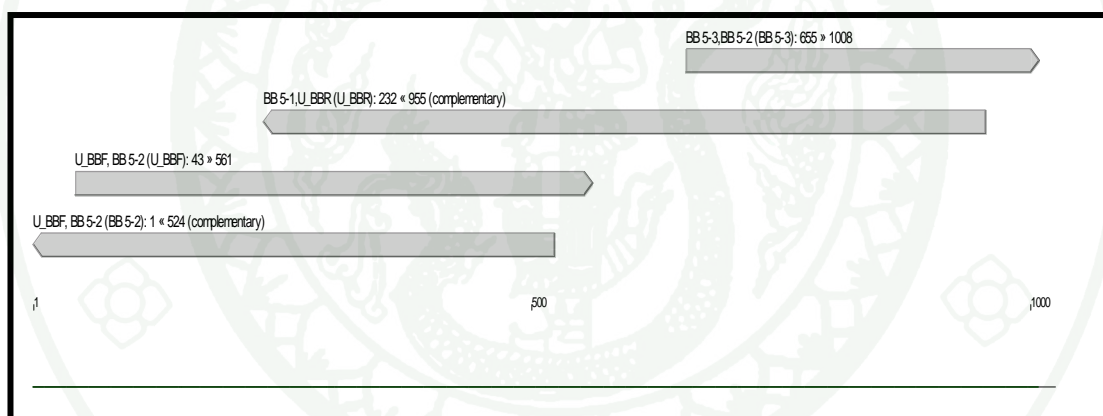
โคลนที่มีรีคอมบิแนนท์พลาสมิดเมื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์แล้ว นำมาจัดเรียงแล้วนำไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล NCBI พบว่า โคลนที่คัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยปฏิกิริยา Fast digestion โคลนที่ 1, 5, 24, 34, 42, 56 พบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ BBTV ทั้งหมด 4 component คือ DNA Component ที่ 4 ได้จากโคลนที่ 1, DNA Component ที่ 6 ได้จากโคลนที่ 5, DNA Component ที่ 3 ได้จากโคลนที่ 34, DNA Component ที่ 1 ได้จากโคลนที่ 42 และ DNA Component ที่ 6 ได้จากโคลนที่ 56 ซึ่งยังไม่ครบทั้งจีโนม ดังนั้น จึงทำการตรวจสอบหา DNA Component ที่ 2 และ 5 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยออกแบบไพรเมอร์ Specific ที่จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนดีเอ็นเอ Component จากภาพที่ 9 แล้ววิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ Component ที่ 2 และ 5 มีดังนี้ Component 2 แถบดีเอ็นเอขนาด ~300 คู่เบส (U_BBTVF, BBTV 2-2R), ใช้ไพรเมอร์ U_BBTVF และ BBTV 2-2R ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จะได้ลำดับนิวคลีโอไทด์สองสาย เริ่มตั้งแต่บริเวณ stem loop ถึง ตำแหน่งที่ 325 ,แถบดีเอ็นเอขนาด ~750 คู่เบส (BBTV 2-1,

U_BBTVR) ใช้ไพรเมอร์ U_BBTVR ในการวิเคราะห์ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 299 – 1003, แถบดีเอ็นเอขนาด ~ 530 คู่เบส (BBTV 2-3F, BBTV 2-2R) ใช้ไพรเมอร์ BBTV 2-3F ในการวิเคราะห์ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 895–1075 ดังนั้น ลำดับนิวคลีโอไทด์จากชั้นดีเอ็นเอทั้ง 4 ชั้นจะถูกจัดเรียง ด้วยโปรแกรม Clustal W แล้ว Assembly เพื่อจัดทิศทางของชั้นดีเอ็นเอให้เชื่อมต่อกัน มีขนาดรวมทั้งสิ้น 1,075 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 12) สำหรับ Component 5 แถบดีเอ็นเอขนาด ~ 570 bp (BBTV 5-1, U_BBTVR) ใช้ไพรเมอร์ U_BBTVR ในการวิเคราะห์ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 232-955, แถบดีเอ็นเอขนาด ~ 800 bp (U_BBTVF, BBTV 5-2R) ใช้ไพรเมอร์ U_BBTVF และ BBTV 5-2R ในการวิเคราะห์ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตั้งแต่ stem loop ถึงตำแหน่งที่ 561, แถบดีเอ็นเอขนาด ~970 bp (BBTV 5-3F, BBTV 5-2R) ใช้ไพรเมอร์ BBTV 5-3F ในการวิเคราะห์ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งที่ 655-1,008 (ภาพที่ 13) ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับ component 5 หลังจากจัดเรียงชั้นดีเอ็นเอแล้ว ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์รวมทั้งสิ้น 1,008 นิวคลีโอไทด์ เมื่อได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์นำไปเปรียบเทียบในฐานข้อมูล NCBI ดูการสร้างชนิดโปรตีนว่าเหมือนหรือใกล้เคียงกับจีโนมใดในฐานข้อมูล NCBI พบว่า ทั้ง 2 component เป็น component ที่ 2 และ 5 ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* จริง จึงได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ทั้งจีโนม

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 6 component โดยการ alignment ในโปรแกรม Clustal W พบบริเวณอนุรักษ์คือ 1. Stem loop Common Region (CR-SL) มี nonanucleotide sequence (TATTATTAC) อยู่บนโครงสร้างของ Stem loop ซึ่งเป็นลักษณะจำเพาะของไวรัสวงศ์ *Nanoviridae* (ภาพที่ 14) 2. Major Common region (CR-M) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เป็น GC-rich จำนวน 14 นิวคลีโอไทด์ (GGCCGCAGGCCCG) อยู่ทาง 5' ของตำแหน่ง CR-SL (ภาพที่ 15) และส่วนประกอบอื่นได้แก่ TATA box อยู่ทาง 3' ของ CR-SL, ตำแหน่ง Open Reading Frame (ORF) อยู่ทาง 3' ของ TATA box, ตำแหน่ง Poly (A) Signal อยู่ทาง 3' ของ ORF ส่วนประกอบเหล่านี้จะปรากฏอยู่ทุก Component แต่จะมีขนาด ORF ที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 12 แสดงการ Assembly ชิ้นดีเอ็นเอ BBTV DNA2-TH ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบส (name label ; (primer,primer (primer ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับเบส))



ภาพที่ 13 แสดงการ Assembly ชิ้นดีเอ็นเอ BBTV DNA5-TH ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบส (name label ; (primer,primer (primer ที่ใช้วิเคราะห์ลำดับเบส))

			U_BBTVR	U_BBTVF	
			←	→	
		1			50
BBTV DNA1-TH	(1)	AGCACGGGGGCTTATTATTACCCCCAGCGCTCGGGACGGGACAT			-----
BBTV DNA2-TH	(1)	GGGGCTGGGGCTTATTATTACCCCCAGTCCTCGGGACGGGACAT			-----
BBTV DNA3-TH	(1)	AGCACTGGGGCTTATTATTACCCCCAGTGCTCGGGACGGGACAT			GG-GCT
BBTV DNA4-TH	(1)	AGCACTGGGGCTTATTATTACCCCCAGCGCTCGGGACGGGACAT			----CA
BBTV DNA5-TH	(1)	AGCACGGGGGCTTATTATTACCCCC-----GGGACGGGACAT			----CA
BBTV DNA6-TH	(1)	AGCGCGGGGACTTATTATTACCCCCAGTGCTCGGGACGGGACAT			GACGTC
Consensus	(1)	AGCACTGGGGCTTATTATTACCCCCAGTGCTCGGGACGGGACAT			C

ภาพที่ 14 ผลการเปรียบเทียบบริเวณ Stem loop Common Region ของ BBTV DNA1-6 TH ;

ตัวหนา คือ nonanucleotide sequence

		951		1000
BBTV DNA1-TH	(1034)	AAGGGCCGCAGGCCCGTCAAGATGGA	---	CGGTTTGATCAGATGTCCCG
BBTV DNA2-TH	(795)	AAGGGCCGCAGGCCCGTCAAGATGGATGAACGGTCAGATTGCTTGCTTA		
BBTV DNA3-TH	(872)	AAGGGCCGCAGGCCCGT	-----	TGAAA--TGATTCTTATAAAACA
BBTV DNA4-TH	(843)	AAGGGCCGCAGGCCCGT	-----	TGAAA--TGATTCTTATAAAACA
BBTV DNA5-TH	(885)	AAGGGCCGCAGGCCCGT	-----	TTAAA-----TATGTGGTGGACGA
BBTV DNA6-TH	(870)	AAGGGCCGCAGGCCCGT	-----	TGAAAAATAAATCGAATTATTA
Consensus	(951)	AAGGGCCGCAGGCCCGT		TGAAA TAAT TTGAT AT A

ภาพที่ 15 ผลการเปรียบเทียบบริเวณ Major Common Region (CR-M) ของ BBTV DNA1-6 TH ;

ตัวเอนคือ CR-M

เมื่อสืบค้นข้อมูลการแปลรหัสและเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ได้ข้อมูลแต่ละ component ดังนี้ BBTV DNA1-TH ได้จากโคลนที่ 42 มีขนาด 1,105 คู่เบส (ภาพที่ 16) นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปสืบค้นข้อมูลการแปลรหัสได้ยีนที่สร้างโปรตีน Replication Protein เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีค่าความเหมือนกัน (Identity) กับ ลำดับนิวคลีโอไทด์จากไอโซเลทอื่นเท่ากับ 99% Identity กับ accession number AB 113660.1 และ 98% Identity กับ AF 416474.1, AF 416475.1, AB 113659.1 จากประเทศเวียดนาม

BBTV DNA2-TH ได้จาก PCR product จากภาพที่ 9 ช่องเจลที่ 1, 2, 3 นำมาวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ เพื่อให้ได้ลำดับที่สมบูรณ์ทั้ง component จึงวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยใช้โปรแกรมที่ช่วย ในการหาลำดับที่ครบถ้วนจะได้จำนวนทั้งหมด 4 ชิ้น แล้ว Assembly (ภาพที่ 12) ได้ลำดับเบส ทั้งหมด 1,053 คู่เบส ซึ่งมีลำดับของ nonanucleotide sequence, TATA box, CR-M, แต่ไม่พบ ORF จึงไม่มีการสร้างโปรตีน ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 17) เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับไอโซเลทอื่นจากฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีค่า 94 % Identity กับ accession number FJ773283.1, DQ 826391.1 จากประเทศไต้หวัน

BBTV DNA3-TH ได้จากโคลนที่ 34 มีขนาด 1,076 bp (ภาพที่ 18) นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป สืบค้นข้อมูลการแปลรหัสได้ยีนที่สร้างโปรตีน Viral coat Protein เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ กับไอโซเลทอื่นมีความเหมือนเท่ากับ 96% Identity กับ accession number AB113661.1, AB113662.1 จากประเทศเวียดนาม

BBTV DNA4-TH ได้จากโคลนที่ 1 มีขนาด 1,047 คู่เบส (ภาพที่ 19) นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไป สืบค้นข้อมูลการแปลรหัสได้ยีนที่สร้างโปรตีน Cell-to-cell Movement Protein และเปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์กับไอโซเลทอื่นมีความเหมือนเท่ากับ 83% Identity กับ FJ463045.1 จาก ประเทศจีนกับ accession number DQ826394.1 และ EU366172 จากประเทศไต้หวัน

BBTV DNA5-TH ได้จาก PCR product จากภาพที่ 9 lane 4, 5, 6 จำนวน 4 ชิ้น นำมา วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อให้ได้ลำดับที่สมบูรณ์ทั้ง component จึงวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยใช้ โปรแกรมที่ช่วยในการหาลำดับที่ครบถ้วนจะได้จำนวนทั้งหมด 4 ชิ้น แล้ว Assembly (ภาพที่ 13) ได้ ลำดับเบสทั้งหมด 1,008 คู่เบส (ภาพที่ 20) นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปสืบค้นข้อมูลการแปลรหัสได้ ยีนที่สร้างโปรตีน Retinoblastoma-binding Protein gene และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับ

ไอโซเลทอื่นมีความเหมือนเท่ากับ 86% Identity กับ accession number HQ378193.1, HQ616078.1 จากประเทศจีน

BBTV DNA6-TH ได้จากโคลนที่ 5 ในเพลทที่ 1 และโคลนที่ 8 ในเพลทที่ 2 มีขนาด 1,078 คู่เบส (ภาพที่ 21) นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปสืบค้นข้อมูลการแปลรหัสยีนได้ที่สร้างโปรตีน Nuclear Shuttle Protein และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับไอโซเลทอื่นมีความเหมือนเท่ากับ 94% Identity กับ accession number AY494787.1 และ 93% Identity กับ HQ378194.1 จากประเทศจีน เป็นไปได้ว่ามีการคัดเลือกโคลนเพื่อมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยเกินไป จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะ (Specific primer) เพื่อศึกษา Component ที่ 2 และ 5 แล้วนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จึงได้ครบทั้งจีโนมซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ไม่ต้องอาศัยกระบวนการโคลนนิ่ง ทำให้รวดเร็วในการศึกษา

BBTV DNA1-TH

CR-SL

1 AGCACGGGGG ^{Nonanucleotide seq.} CC**TATTATTA** CCCCCAGCGC TCGGGACGGG ACATTTGCAT
TATA box

51 CTATAAAATAG ACCTCCCCC CCCTCCACTT CAAGATCATC ATCGTCGACA

101 GAAATGGCGC GATATGTGGT ATGCTGGATG TTCACCATCA ACAATCCCGC

151 TTCACTACCA GTGATGCGGG ATGAGTTTAA ATATATGGTA TATCAAGTGG

201 AGAGGGGACA GGAGGGTACT CGTCATGTGC AGGGATACGT CGAGATGAAG

251 AGACGAAGTT CTCTGAAGCA GATGAGAGTC TTCTTCCCTG GCGCACACCT

301 TGAGAAACGA AAGGGAAGCC AAGAAGAAGC ACGGGCATAC TGTATGAAGG

351 AAGACACAAG AATCGAAGGT CCCTTCGAGT TTGGTGCCTT TAAATTGTCA

401 TGTAATGATA ATTTATTTGA TGTCATACAG GATATGCGTG AAACGCACAA

451 ACGGCCTTTG GAGTATTTAT ATGAGTGTCC AAATACCTTC GATAGAAGTA

501 AGGATACATT ATACAGAGTT CAAGCAGAGT TGAATAAAAC GAAGGCGATG

551 AATAGCTGGA AAACATCCTT CAGTTCCTTG ACATCGGAAG TTGAAAATAT

601 TATGGCGGAG CCATGTCATC GAAGGATAAT TTGGTCTAT GGCCCAAATG

651 GAGGAGAAGG AAAGACAAC TATGCAAAAT ATTTAATGAA GACGAAGAAT

701 GCGTTTTTATT CGCCAGGAGG AAAATCTTTG GATATATGTA GATTGTATAA

751 TTATGAAGAA ATAGTTATAT TTGATATTCC CAGATGCAAA GAGGAATATT

801 TAAACTATGG TTTATTAGAA GAATTTAAAA ATGGAATTAT TCAAAGCGGG

851 AAATATGAAC CCGTTTTGAA AATTGTAGAA TATGTGGAAG TCATTGTAAT

901 GGCTAACTTC CTTCCGAAGG TAGGAATCTT CTCTGAAGAT CGAATAAAGC
Poly(A) signal

951 TAGTTGCTTG CTGAACACGC TATGACAATC GTACGCTATG ACAAAGGGG

1001 AAAAGCAAAG AATCGGGGT TGATTGGGCT ATCCTAACGA TTAAGGGCCG
CR-M

1051 CAGGCCCGTC AAGATGGACG GTTTGATCAG ATGTCCCGAG TTAGTGCGCC

1101 ACGTA

ภาพที่ 16 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA1-TH ขนาด 1,005 คู่เบส; แหน่ง ORF 104-964
สร้างโปรตีน Replication Protein

BBTV DNA2-TH

CR-SL
Nonanucleotide seq.

```

1   GGGGCTGGGG CTTATTATTA CCCCCAGTCC TCGGGACGGG ACATGGGCTT
51  TTTAAATGGG CCGAGAGAGT TTGAACAGTT CAGTATCTTC GTTATTGGGC
101 CATCTGGCCC AATAATTAAG AGAACGTGTT CAAAATCGGG GTTTGACCGA
151 AGGTCAAGGT AGACGGTCAA CAATATTCTG GCTTGCGGAG CAAGCAACAC
201 GAATTAAATA TTTAATTCGT ATGACACGTG GACGGACCGA AATACTCCTG
      TATA box
251 TAAATCTATA AATAGCTTAA ATCTGGCTTG GATAAATTGCT CTCGCTCTTC
301 TGTCAAAGGT GTTGTGTTGA GCGGAAGAT CGCCACCGGC GATCATCAGA
351 CGAAAAGCTG CAAGAGAGAC GGAGAAACAT GCTGCGAAGC GTATATCGGG
401 TATTTATAGA CTTCTAGCGC AGCTAGAAGT TTCGTTGTAC TTGATTTTGT
451 ATTTTGTAAA TTACGAAGAA ATCGTACATT GATAATAATA AAACATCTGG
501 GATTGTTAAT GTTTACATTA ACCAGTATTA ATAATGTACA ATAAAAATA
551 TTGTATGAGG AACGAATACA ATAATATTAA AATATGAGGA GCGTAGCATG
601 ATAAACAGGT GTTTAAGGTA TAATPAAAAA AATTATGCAA TGTTATGATA
651 ATACGGTATA AGTTGAAGTA TGAGGTGAAA GAGGAGATAT TAGAATATTA
701 AAAACCCAAT TATATTATTT ATAATACATA CAACACGCTA TGACAAAAGG
751 GGAAAAATGA AGAATCGGGG GTTGATTGGT CTATCGTATC GCTTAAGGGC
      CR-M
801 CGCAGGCCCG TCAAGATGGA TGAACGGTCA GATTTGCTTG CTTAGCCACG
851 AAGAAAAGGAA TCTTTTTGGG ACCACAGATA AGACAGCTGT CATTACCTTT
901 TAAAATAATA TAATAACCAA TTGACGATAG TACCCCTCCC AAAGATGACG
951 TATAGGGGTG TCCGAGGTA ATTTAACATA GCTCTGACAA GAGATAGTGG
1001 ACGTTGGATG CCACGATCGG ACGATCGTGG TTTGATGAAC TTATGATGAC
1051 GTA

```

ภาพที่ 17 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA2-TH ขนาด 1,053 คู่เบส; ไม่พบตำแหน่ง ORF

BBTV DNA3-TH

CR-SL
Nonanucleotide seq.

```

1   AGCACTGGGG CTTATTATTA CCCCCAGTGC TCGGGACGGG ACATGGGCTA
51  ATGGATCATG GAATAAGGGC CCATCGGGCC CGTTAAGATG GGTTTTGGGC
101 TTATGGGCTT TATCCAGAAG ACCAAAAACA GCGGGAACC GTCCCAATTT
151 CAAATTTAGA TAGCTTGCCC CGCAAGCAA CTAAAAGTCT ATATATACCA
201 GTGTAGACAT ATTGTTTCTA TAACAAATGG CGAGGTTTCC GAAGAAATCG
251 ATCAAGAAGA GGCGGGTTGG GCGACGGAAG TATGGAAGCA AGGCGGCAAC
301 CAGTCACGAC TATTCGTCGT TAGGTTCAAT ATTGGTTCCT GAAAATACCG
351 TCAAGGTATT TAGGATTGAG CCTACTGATA AAACATTACC CAGATATTTT
401 ATCTGGAAAA TGTTTATGCT TTGGTGTGC AAGGTGAAGC CTGGAAGAAT
451 ACTTCATTGG GCTATGATTA AAAGTTCATG GGAAATCAAC CAGCCGACTA
501 CATGTCTGGA AGCACCAGGT TTATTCATAA AACCTGAACA TAGCCATCTG
551 GTGAAACTGG TATGCAGTGG GGAAGTTGAA GCCGGAGTCG CAACAGGGAC
601 ATCAGATGTA GAATGTCTTC TAAGGAAGAC AACCGTGTTC AGGAAGAATG
651 TAACAGAGGT GGATTACTAG TATTTGGCAT TTTATTGTAG TGCTGGAGTT
701 AGTATTAACT ACCAGAACAG AATTACATAT CATGTATGAT CTGTTTATGT
751 AAACATAAAC CTTTGTATGG ATTAATGACC AAATAACATA CAACACGCTA
801 TGAAATACAA CACGCTATGA CAAACGGGGA AAAATGAAGA ATCGGGGGTT
851 GATTGGTCTA TCGTATCGCT TAAGGGCCGC AGGCCCGTTG AAATGATTCT
901 TTATAAAACA AATATACATG ATACGGATTG TTGAAAATAT AATCAACGAT
951 GTATAAATAC AACAGAATGT TGAATACCAA TTAATAAAAA GAGAAGATAA
1001 GTATATTTGT GAAGGATAAG CATCAGAACC ACCACTTTAG TGGTGGGTCA
1051 GATGTCCCGA GTTAGTGCGC CACGTA

```

ภาพที่ 18 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA3-TH ขนาด 1,076 คู่เบส; ตำแหน่ง ORF 227-666 สร้างโปรตีน Viral coat protein

BBTV DNA5-TH

CR-SL
Nonanucleotide seq.

1 AGCACGGGGG CTTATTATTA CCCCGGGAC GGGACATCAC GTGCATCTAA

51 CAAATGCACG TGACAATGCA GTAGCTTGTA GCGAAAGATA ACCATCACTA

101 TCATAAAAAGT GAAAGGAATA TTCGTTGCTT AGGGACTAAG CAACGTGGAC
TATA box

151 AGATATTTGT TCGAGAAGCG ACAATGGAGG CTATTTAAAC CTGATGGTAT

201 TGTGATTTCC GAAATCACTC ATCGGAGAAG AAATGGAGTT CTGGGAATCG

251 TCTGCCATGC CAGACGATGT CAAGAGAGTG ATCAAGGAAA TATATTGGGA

301 GCATCGAAAC AAACTTCTGT TTTGTCTAGAA GTTGAAAGGC TGTGTAAGAA

351 GGATTCTGGA GCATGAAAT CAAGATGATG CTCTAGACGC AGTGAAGGAG

401 ATGAAGACTT CTATTATTCG CTATAGCGAA TATTTGAAGA AACCTTGTGT

451 GGTATTGTGT TTTAGTACTA ATAAATCTAT TGCATATAGG TTAAACACAA

501 TGGTGTTCCT TTATCATGAA TATATTGAAG ACCTAGGTGG TGACTACTCG

551 GTATATCAAG AGTTGTTCTG TGATGAGGAA CTTCCTTATT CGTCGACAGA

601 AGAAGAAGAT GAAGAAGTAA TATACAGGAA TGTTATCATG GCATCGACAG

651 AAGAGAAGAT CTCTTGAGT GAATGTCAA AGATAGTTAT ATCAGATTAT
Poly(A) signal

701 GATGTAACAT TACTGTAATG AATATCCATT ATGATAAAATA AAATAATGGA

751 ATGATGATTA TGTATTCTAG TATAAATACA TAATGGTATA CGTATAGCAT

801 AAAATACATA TACCTACATA CAACACACTA TAACAAACAG GGAAAAATGA
CR-M

851 AGAATCGGGG GTTGATTGGG CTATCTTAAC GATTAAGGGC CGCAGGCCCG

901 TTTAAATATG TGGTGGACGA AGTCCACAAC ACATAAAAAG TGATCAGAAC

951 AATGGAATAT AATGAGCTGG CAACGTAGGG ACCATGTCCC GAGTTAGTGC

1001 GCCACGTG

ภาพที่ 20 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA5-TH ขนาด 1,008 คู่เบส; ตำแหน่ง ORF 233-715 สร้างโปรตีน Retinoblastoma binding-like protein

BBTV DNA6-TH

CR-SL
Nonanucleotide seq.

1 AGCGCGGGG ACTATTATTA CCCCCAGTGC TCGGGACGGG ACATGACGTC

51 AGCATAGATT ATAATAGGGC CAACTAAAGG CCCATTTAAT AGAATAGGCG

101 GGCTTTTGAC ATATTTCAAA GGCCAGCCT GGAAGTGGAT AATGTCACGT

151 GCCGAATAAG AGGTTGCTTC GCCTCGAAGC AACCCGAACA AATGTTGCGT

TATA box

201 ATTCAATACG CAACTGAAGT CTATTAATAT GGATGTCTCT GCCGAATAAA

251 TCAGAGCGTA AGCGAAGCAG AAGCGATGGA TTGGGCAGAA TCACAATTCA

301 AGACATGTAC TCATGGGTGC GATTGGAAGA CGATATCATC GGATTCATCC

351 GAGAATCGAC AATATGTACC TTGCGTCGAC GCAGGCAGCG GAAGAAAGTC

401 ACCTCGCAAG GTECTGCTAA GATCTATTGA AGCTGTGTTT AATGGAAGCT

451 TCAAAGGAAA TAACAGGAAT GTTCGTGGGT TTATATACGT ATCAATACGA

501 GACGATGATG GAGAAATGCG TCCAGTACTC ATAATACCAT TCGGAGGATA

551 TGGATATCAT AATGATTTCT ATTATTTTGA AGGGAAGGGG AAAGTTGAAT

601 GTGATATATC ATCAGATTAT GTAGCGCCAG GAGTCGATTG GAGCAGAGAC

651 ATGGAAGTTA GTATTAGTAA CAGCAACAAC TGTAATGAAT TATGTGATCT

Poly(A)signal

701 GAAGTGTTAT GTTGTGTTGTT CGTTAAGAAT AAAGGAATAA CAGATGTGCT

751 GTAATGAATA TTAATAAAAT ATATTTTCAT GTAATTGATA GTTGTATAAA

801 ACATACAACA CGCTATGACA AACAGGGAAA AATGAAAAAT CGGGGTTGA

CR-M

851 TTGGTCTATC GTATCGCTTA AGGGCCGCAG GCCCGTTGAA AAATAATAAT

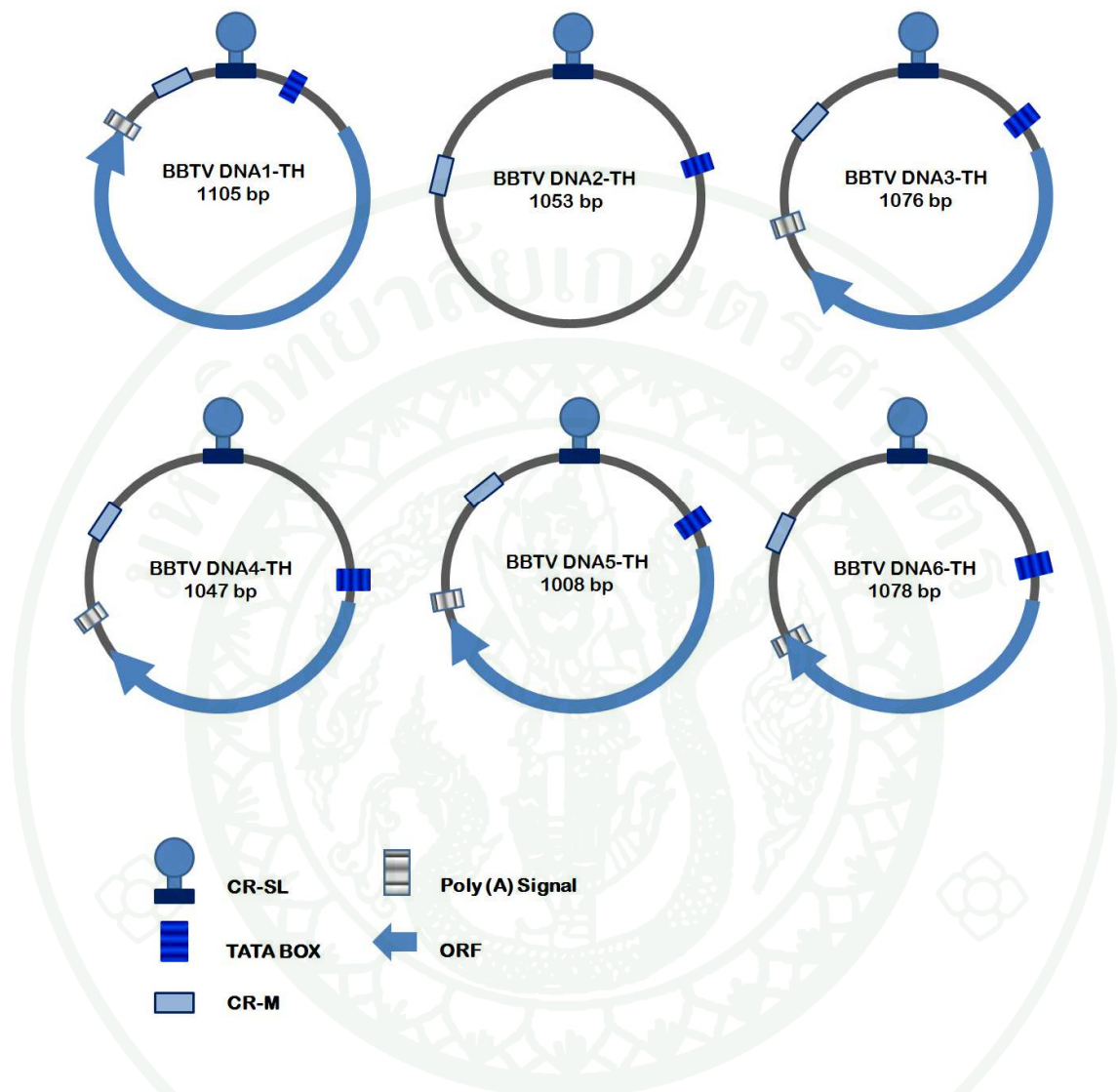
901 CGAATTATTA ACGTTTGATA ATAATCAGAG ATAGATGATA AGCATCCAAA

951 AAACATAGAC GAAGTATATG GCTGTATAAT AAAACAAGC ATATAAATAA

1001 AATATGTGAA CTAATCTCTG ATTGGTTTAC AACGTAGCCC CACCAACTTT

1051 ATGTTGGTGG AAATGTCCCG ATGACGTA

ภาพที่ 21 Nucleotide sequence ของ BBTV DNA6-TH ขนาด 1,078 คู่เบส; ตำแหน่ง ORF 276-740 สร้างโปรตีน Nuclear shuttle protein



ภาพที่ 22 ภาพจำลองโครงสร้างของ DNA Component (BBTV DNA1-TH – BBTV DNA6-TH) แสดงตำแหน่งของ CR-SL, TATA Box, ORF, Poly (A) Signal, และ CR-M

8. การตรวจสอบหาเชื้อ *Banana bunchy top virus* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

8.1 ใช้ Universal primer

จากการนำตัวอย่างกล้วยและพืชอาศัย มาตรวจสอบหาเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Universal ที่ออกแบบมาเพื่อใช้ตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสดังกล่าวทั้งจีโนม ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบรวมทั้งสิ้น 62 ตัวอย่าง ได้แก่ กล้วยเล็บมือนาง 19 ตัวอย่าง กล้วยไข่ 4 ตัวอย่าง กล้วยนาก 4 ตัวอย่าง กล้วยน้ำว้า 23 ตัวอย่าง กล้วยหอม 5 ตัวอย่าง พุทธรักษาและก้ามกุ้ง 4 ตัวอย่าง กล้วยหิน 1 ตัวอย่าง กล้วยป่า 1 ตัวอย่าง (ตารางที่ 4) หลังเสร็จสิ้นปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส จำนวน 43 ตัวอย่าง ผลการตรวจสอบหาเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* จากตัวอย่างที่ 1-25 เป็นตัวอย่างจากจังหวัดชุมพร และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบว่าตัวอย่างที่เป็นกล้วยเล็บมือนาง และกล้วยน้ำว้าตัวอย่างที่ 17 มีแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส และตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว ได้แก่ กล้วยเล็บมือนางตัวอย่างที่ 1, 2, 12 กล้วยน้ำว้าตัวอย่างที่ 18 – 20, 25 ก้ามกุ้ง พุทธรักษา ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวไม่แสดงอาการเป็นโรค (ภาพที่ 23) จากตัวอย่างที่ 26-48 (23 ตัวอย่าง) เป็นตัวอย่างกล้วยหอม กล้วยป่า กล้วยหิน กล้วยไข่ และกล้วยน้ำว้า จำนวน 9 ตัวอย่าง จากอำเภอปากช่องจังหวัดนครราชสีมา และกล้วยน้ำว้า จำนวน 14 ตัวอย่าง จากอำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส จำนวน 19 ตัวอย่าง อีก 4 ตัวอย่างที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอขนาดดังกล่าว นั้น คือกล้วยน้ำว้าจังหวัดสมุทรสาคร (ภาพที่ 24) จากตัวอย่างที่ 49-73 (25 ตัวอย่าง) เลือกมาตรวจสอบ 14 ตัวอย่าง คือกล้วยหอมตัวอย่างที่ 50-52, กล้วยไข่ตัวอย่างที่ 54-56, กล้วยนากตัวอย่างที่ 57-58, 64-65, และกล้วยน้ำว้าที่ไม่แสดงอาการเป็นโรค ตัวอย่างที่ 73 พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส จำนวน 3 ตัวอย่าง คือกล้วยนาก 2 ตัวอย่าง และกล้วยน้ำว้า 1 ตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างดังกล่าวไม่แสดงอาการของโรค (ภาพที่ 24)

จากตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบหาเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* จำนวน 63 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวน 43 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างกล้วยที่แสดงอาการของโรคบานานาบันชีทอป ที่บริเวณก้านใบ และใบจะมีรอยขีดสีเขียว (dot – dash) ขอบใบเหลือง แต่สำหรับตัวอย่างกล้วยที่ไม่แสดงอาการดังกล่าวนี้ไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Universal สามารถตรวจสอบหาเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ได้

หลังจากการตรวจสอบอาการด้วยตาเปล่า ซึ่งกล้วยที่แสดงอาการนั้นตรวจพบพบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ทุกตัวอย่าง

8.2 ใช้ Specific primer

ทำการตรวจสอบหา DNA component ทั้ง 6 component ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ specific แยกเป็น 2 ปฏิกิริยา ปฏิกิริยาแรกคือ ตรวจสอบ DNA component 1, 3, 6 และตรวจสอบ DNA component 2, 4, 5 นำดีเอ็นเอกล้วย จำนวน 10 ตัวอย่าง จากตารางที่ 4 ได้แก่ 1. กล้วยป่า (ตัวอย่างที่ 27) 2. กล้วยไข่ (ตัวอย่างที่ 29) 3. กล้วยหอมพันธุ์ Tumok (ตัวอย่างที่ 28) 4. กล้วยหอมเขียว (ตัวอย่างที่ 26) 5. กล้วยหิน (ตัวอย่างที่ 30) จาก อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา 6. กล้วยเล็บมือนาง อ. ประทิว จ. ชุมพร (ตัวอย่างที่ 5) 7. กล้วยเล็บมือนาง อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร (ตัวอย่างที่ 16) 8. กล้วยน้ำว้า (ตัวอย่างที่ 31) 9. กล้วยน้ำว้า (ตัวอย่างที่ 32) 10. กล้วยน้ำว้า (ตัวอย่างที่ 33) จาก อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา (ตารางที่ 5) การตรวจสอบหา DNA component 1, 3, 6 ใช้ไพรเมอร์ จำนวน 3 คู่ (1. BBTV 1-1F, BBTV 1-2R 2. BBTV 3-1F, BBTV 3-2R 3. BBTV 6-1F, BBTV 6-2R) พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ใน 1 ช่อง เจล ประกอบด้วยแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 900 คู่เบส, 500 คู่เบส และ 280 คู่เบส ซึ่งมีขนาดเท่ากับขนาดดีเอ็นเอที่คาดไว้ของ DNA component ที่ 6, 3, 1 ตามลำดับ ในช่องเจลที่ 1 และ 2 เป็น ตัวอย่างกล้วยป่าและกล้วยไข่ ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบ ขนาดประมาณ 900 คู่เบส และ 500 คู่เบส ซึ่งเป็น DNA component 6 และ 3 ตามลำดับ แต่ตรวจไม่พบ DNA component 1 ส่วน ตัวอย่างกล้วยอีก 8 ตัวอย่างนั้น ตรวจพบ DNA component 1, 3, 6 ทุกตัวอย่าง และไม่พบแถบดีเอ็นเอใดเลยในตัวอย่างจากกล้วยน้ำว้าที่ไม่แสดงอาการ (ภาพที่ 26)

ปฏิกิริยาที่สอง ตรวจสอบ DNA component 2, 4, 5 จากดีเอ็นเอตัวอย่างเดียวกันกับการ ตรวจสอบ DNA component 1, 3, 6 จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 3 คู่ (1. BBTV 2-3F, BBTV 2-2R 2. BBTV 4-1F, BBTV 4-2R 3. BBTV 5-1F, BBTV 5-2R) เมื่อตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ พบว่ามีแถบดีเอ็นเอปรากฏอยู่ 2 แถบ ขนาดประมาณ 530 คู่เบส และประมาณ 350 คู่เบส ซึ่งตรวจพบแถบดีเอ็นเอดังกล่าวในทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ ส่วนขนาดดีเอ็นเอที่คาดไว้ของ DNA component ที่ 2, 4, 5 เมื่อใช้ไพรเมอร์ดังกล่าว คือ 532 คู่เบส 333 คู่เบส และ 351 คู่เบส สังกัดได้ว่า

แถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 350 มีแถบขนาดใหญ่ จึงเป็นไปได้ว่ามีดีเอ็นเอขนาด 333 และ 351 คู่เบส อยู่ด้วยกัน (ภาพที่ 27)

ทำการตรวจสอบหา DNA component 1, 3, 6 จากตัวอย่างกล้วยจำนวน 25 ตัวอย่าง จากตัวอย่างตารางที่ 4 ได้แก่ ช่องเจลที่ 1-5 กล้วยหอม (ตัวอย่างที่ 49-53), ช่องเจลที่ 6-8 กล้วยไข่ (ตัวอย่างที่ 54-56), ช่องเจลที่ 9-12 กล้วยนาก (ตัวอย่างที่ 57-60, ช่องเจลที่ 13-15 กล้วยเล็บมือนาง (ตัวอย่างที่ 61-63), ช่องเจลที่ 15-16 กล้วยนาก (ตัวอย่างที่ 64-65), ช่องเจลที่ 17 กล้วยเล็บมือนาง ตัวอย่างที่ 66, ช่องเจลที่ 18-22 กล้วยนาก (ตัวอย่างที่ 67-71), ช่องเจลที่ 23 กล้วยไข่ ตัวอย่างที่ 72, ช่องเจลที่ 24 กล้วยน้ำว้าที่ไม่แสดงอาการของโรคบนานาบันชีทอป (ตารางที่ 6) พบแถบดีเอ็นเอจำนวน 3 แถบ ภายใน 1 ช่องเจล ขนาดประมาณ 900 คู่เบส, 500 คู่เบส และ 280 คู่เบส จำนวน 14 ตัวอย่าง และไม่พบแถบดีเอ็นเอดังกล่าว จำนวน 10 ตัวอย่าง (ภาพที่ 28)

จากการตรวจสอบหาเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* โดยใช้ไพรเมอร์ Universal และไพรเมอร์ Specific ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ สามารถตรวจสอบได้อย่างแม่นยำ การใช้ไพรเมอร์ Universal เพียงอย่างเดียวก็สามารถตรวจสอบหาเชื้อไวรัสดังกล่าวได้ เนื่องจากมีการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ CR-SL ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* โดยที่ไพรเมอร์ Forward และไพรเมอร์ Reward นั้นมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหลื่อมกัน 1 ตำแหน่ง เมื่อทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะได้ขนาดดีเอ็นเอที่ครบวงและมีขนาดเท่ากับดีเอ็นเอแต่ละ component พอดีไพรเมอร์ Universal จึงเหมาะแก่การนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ในต้นกล้วยที่คาดว่าถูกเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* เข้าทำลายหรือใช้ในการตรวจรับรองหน่อพันธุ์ที่ปลอดโรค เป็นการลดการกระจายของโรคได้ สำหรับการตรวจสอบหา DNA component 1-6 โดยใช้ไพรเมอร์ Specific สามารถตรวจสอบได้ว่าตัวอย่างกล้วยที่ถูกเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* เข้าทำลายนั้น มี DNA component ใดอยู่บ้าง จากการตรวจสอบพบว่าตัวอย่างกล้วยที่แสดงอาการของโรค จะตรวจพบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* เมื่อใช้ไพรเมอร์ Universal แต่เมื่อนำตัวอย่างกล้วยป่า และกล้วยไข่ ตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ Specific พบว่าไม่มีแถบดีเอ็นเอของ DNA component 1 และกล้วยไข่ตัวอย่างที่ 29 พบแถบดีเอ็นเอของ DNA component 3 ก่อนข้างบาง ทำให้ทราบว่าจำนวนของ DNA component แต่ละ component นั้นมีจำนวนไม่เท่ากัน และจากการทดลองพบแถบดีเอ็นเอที่มีลักษณะเข้มที่สุดคือ DNA component 6

ตารางที่ 4 ตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบหาเชื้อ *Banana bunchy top virus* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์
ใช้ไพรเมอร์ Universal

ตัวอย่างที่	พันธุ์	แหล่งปลูก	ผลการตรวจสอบ
1	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	-
2	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	-
3	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	+++
4	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	+++
5	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	+++
6	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	+++
7	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	++
8	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	++
9	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	+
10	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	+
11	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+
12	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-
13	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+
14	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+
15	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+
16	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+++
17	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+++
18	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-
19	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-
20	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-
21	ก้ามกุ้ง	อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์	-
22	ก้ามกุ้ง	อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์	-
23	ก้ามกุ้ง	อ. หัวหิน จ. ประจวบคีรีขันธ์	-
24	พุทธรักษา	บางเจน	-
25	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-
26	กล้วยหอมเขียว	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++
27	กล้วยป่า	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	++
28	กล้วยหอม Tumok	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	++

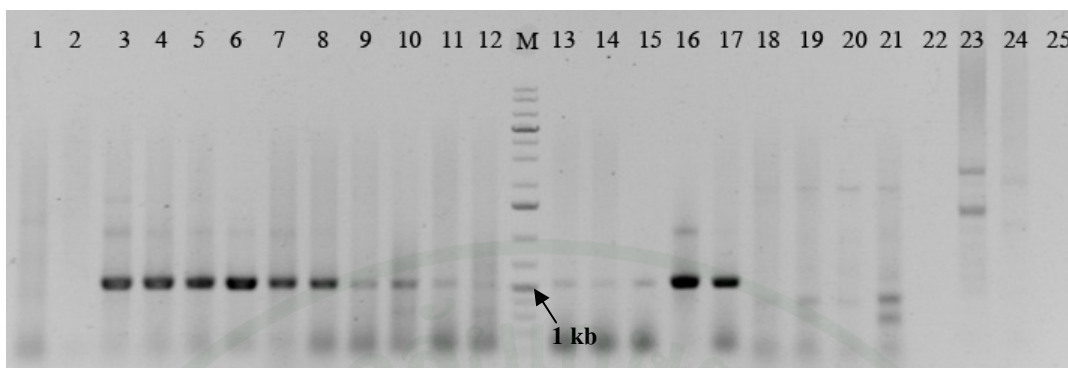
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	พันธุ์	แหล่งปลูก	ผลการตรวจสอบ
29	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
30	กล้วยหิน	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
31	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
32	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
33	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
34	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
35	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++
36	กล้วยน้ำว้า	อ.เมือง จ. สมุทรสาคร	++
37	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++
38	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++
39	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	-
40	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	-
41	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	+++
42	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++
43	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	+++
44	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	-
45	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++
46	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++
47	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++
48	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	-
49	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
50	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
51	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
52	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
53	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
54	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
55	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
56	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
57	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-

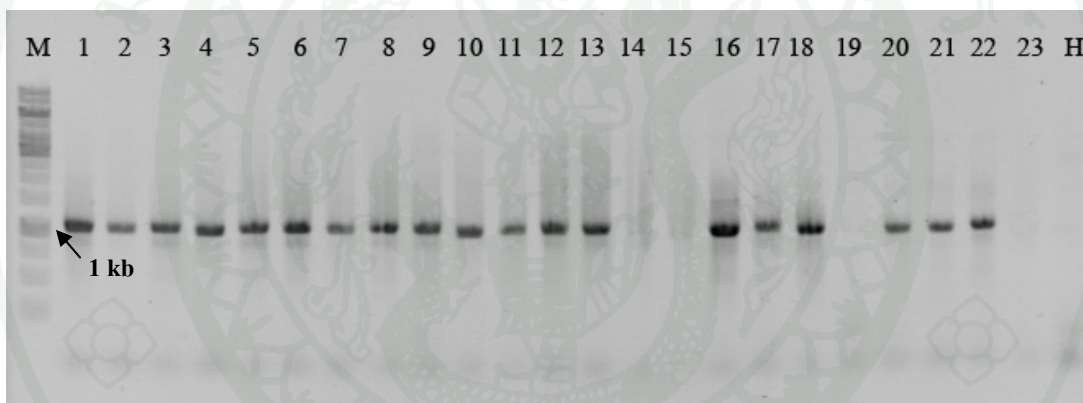
ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	พันธุ์	แหล่งปลูก	ผลการตรวจสอบ
58	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
59	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
60	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
61	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
62	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
63	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
64	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
65	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
66	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
67	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
68	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
69	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
70	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
71	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
72	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	0
73	กล้วยน้ำว้า	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-

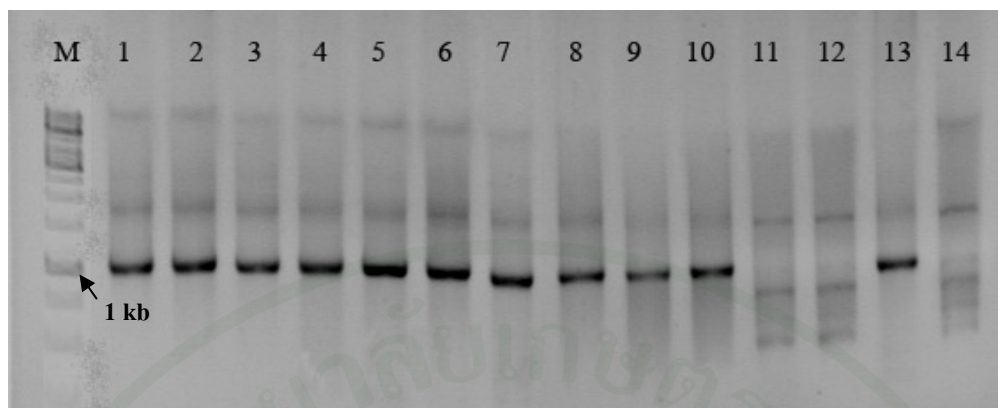
หมายเหตุ ไม่ถูกตรวจสอบ = 0, ตรวจไม่พบ = -, พบแถบดีเอ็นเอ น้อย = +, พบแถบดีเอ็นเอ
ปานกลาง = ++, พบสัญญาณ/แถบดีเอ็นเอ มาก = +++



ภาพที่ 23 ผลตรวจสอบ *Banana bunchy top virus* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Universal จำนวน 25 ตัวอย่าง ช่องเจลที่ 1-25 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 1-25



ภาพที่ 24 ผลตรวจสอบ *Banana bunchy top virus* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Universal จำนวน 24 ตัวอย่าง ช่องเจลที่ 1-5 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 26-30, ช่องเจลที่ 6-9 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 31-34, ช่องเจลที่ 10-23 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 35-48, ช่องเจล H คือกล้วยน้ำว้าที่ไม่แสดงอาการ



ภาพที่ 25 ผลตรวจสอบ *Banana bunchy top virus* ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Universal จำนวน 14 ตัวอย่าง ช่องเจลที่ 1-3 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 50-52, ช่องเจลที่ 4-6 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 54-56, ช่องเจลที่ 7-10 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 61-64, ช่องเจลที่ 11-12 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 57-58, ช่องเจลที่ 13 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 65, ช่องเจลที่ 14 คือ กล้วยน้ำว่าที่ ไม่แสดงอาการจากตัวอย่างที่ 73

ตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบ DNA component 1, 3, 6 และ DNA component 2, 4, 5
ด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 10 ตัวอย่าง

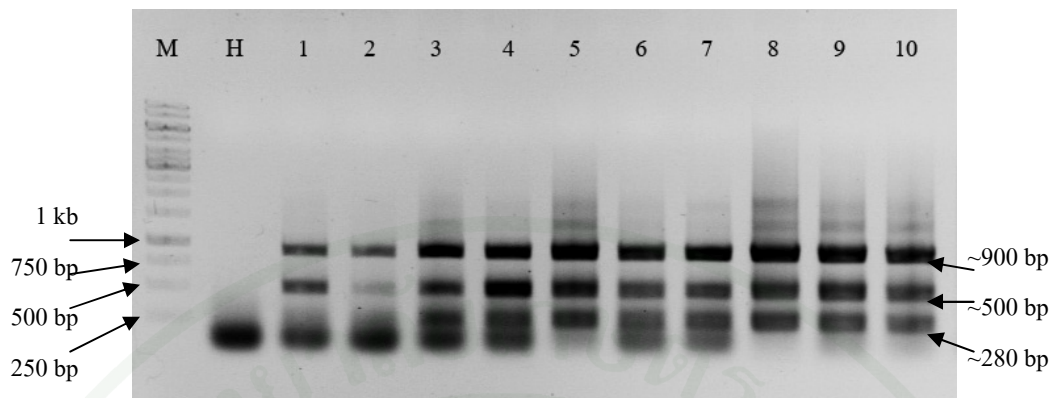
ช่องเจลที่	ตัวอย่างที่	พันธุ์	แหล่งปลูก	ผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์	
				1, 3, 6	2, 4, 5
1	27	กล้วยป่า	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++	+++
2	29	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+	+++
3	28	กล้วยหอม Tumok	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++	+++
4	26	กล้วยหอมเขียว	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++	+++
5	30	กล้วยหิน	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++	+++
6	6	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทีป จ. ชุมพร	++	+++
7	16	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	++	++
8	31	กล้วยน้ำว้า	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++	++
9	32	กล้วยน้ำว้า	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++	++
10	33	กล้วยน้ำว้า	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++	++

หมายเหตุ ไม่ถูกตรวจสอบ = 0, ตรวจไม่พบ = -, พบแถบดีเอ็นเอ น้อย = +, พบแถบดีเอ็นเอ
ปานกลาง = ++, พบสัญญาณ/แถบดีเอ็นเอ มาก = +++

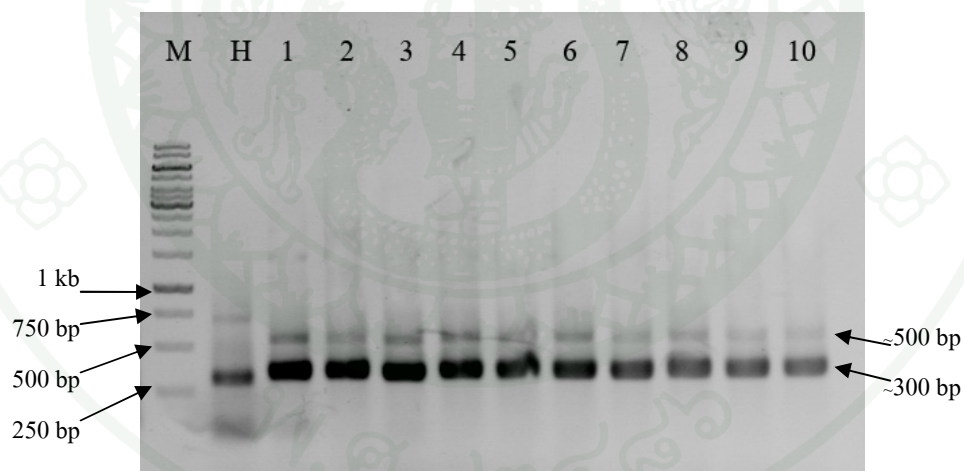
ตารางที่ 6 ผลการตรวจสอบ DNA component 1, 3, 6 ด้วยวิธีพีซีอาร์ จำนวน 24 ตัวอย่าง

ช่องเจลที่	ตัวอย่างที่	พันธุ์	แหล่งปลูก	ผลการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์
				1, 3, 6
1	49	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
2	50	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
3	51	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
4	52	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
5	53	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
6	54	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
7	55	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
8	56	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
9	57	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
10	58	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
11	59	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
12	60	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
13	61	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
14	62	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
15	63	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
16	64	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
17	65	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++
18	66	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++
19	67	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
20	68	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
21	69	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
22	70	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
23	71	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-
24	72	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-

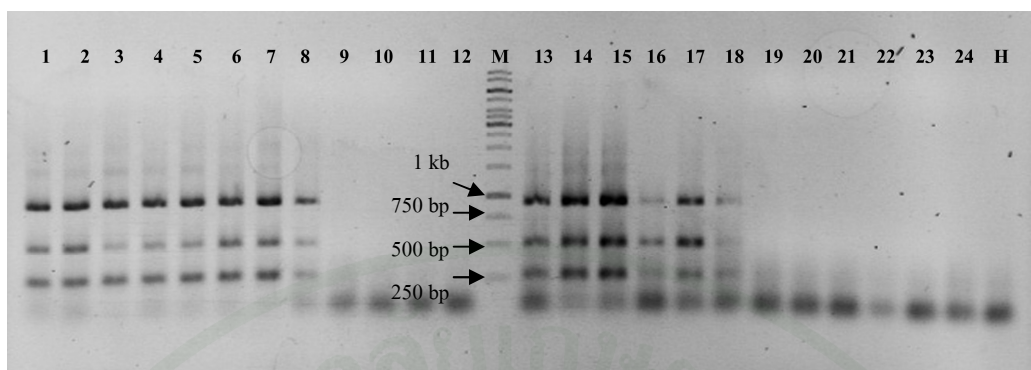
หมายเหตุ ไม่ถูกตรวจสอบ = 0, ตรวจไม่พบ = -, พบแถบดีเอ็นเอ น้อย = +, พบแถบดีเอ็นเอ ปานกลาง = ++, พบสัญญาณ/แถบดีเอ็นเอ มาก = +++



ภาพที่ 26 ผลตรวจสอบ DNA Component 1, 3, 6 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ Specific, 10 ตัวอย่าง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (Fermentus), H คือ กล้วยน้ำว้า ที่ไม่แสดงอาการ ช่องเจลที่ 1-10 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 27, 29, 28, 26, 30, 6, 16, 31, 32, 33



ภาพที่ 27 ผลตรวจสอบ DNA Component 2, 4, 5 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ Specific, จำนวน 10 ตัวอย่าง M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (Fermentus), H คือ กล้วยน้ำว้าที่ไม่แสดงอาการ ช่องเจลที่ 1-10 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 27, 29, 28, 26, 30, 6, 16, 31, 32, 33



ภาพที่ 28 ผลตรวจสอบ DNA Component 1, 3, 6 ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ใช้ไพรเมอร์ Specific, จำนวน 25 ตัวอย่าง M คือ แถบคี่เอ็นเอมาตรฐานขนาด 1 kb (Fermentus), H คือ กลัวยน้ำว่าที่ไม่แสดงอาการของเจลที่ 1-24 ทดสอบจากตัวอย่างที่ 49-72

การตรวจสอบ DNA component 3 และ DNA component 6 ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization

การใช้เทคนิค Dot blot hybridization ตรวจสอบ DNA component 3 และ DNA component 6 ในคี่เอ็นเอตัวอย่าง จำนวน 30 ตัวอย่าง ได้แก่ กลัวยป่า กลัวยหิน กลัวยเล็บมือนาง กลัวยหอม กลัวยน้ำว่า กลัวยนาก และพุทธรักษา (ตารางที่ 7) ตรวจพบสัญญาณ hybridization ของ DNA component 3 กับคี่เอ็นเอ โพรบที่ติดฉลากด้วยสารปลอดภัย Digoxigenin (DIG) บนแผ่นฟิล์ม ซึ่งมีสัญญาณ จำนวน 22 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่พบสัญญาณชัดเจน ได้แก่ จุดที่ 7, 9-21, 23, 26, 35 รวม 16 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Universal แล้วพบแถบคี่เอ็นเอ ขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส ตัวอย่างที่พบสัญญาณต่ำ ได้แก่ จุดที่ 1, 4, 5, 27, 28 (ภาพที่ 29) และ ตรวจพบสัญญาณการ hybridization ของ DNA component 6 กับคี่เอ็นเอ โพรบอย่างชัดเจน จำนวน 17 ตัวอย่าง ตัวอย่างที่พบสัญญาณชัดเจน ได้แก่ จุดที่ 1, 4, 9-19, 21, 26, 35 รวม 16 ตัวอย่าง พบสัญญาณต่ำ ได้แก่ จุดที่ 28 (ภาพที่ 30)

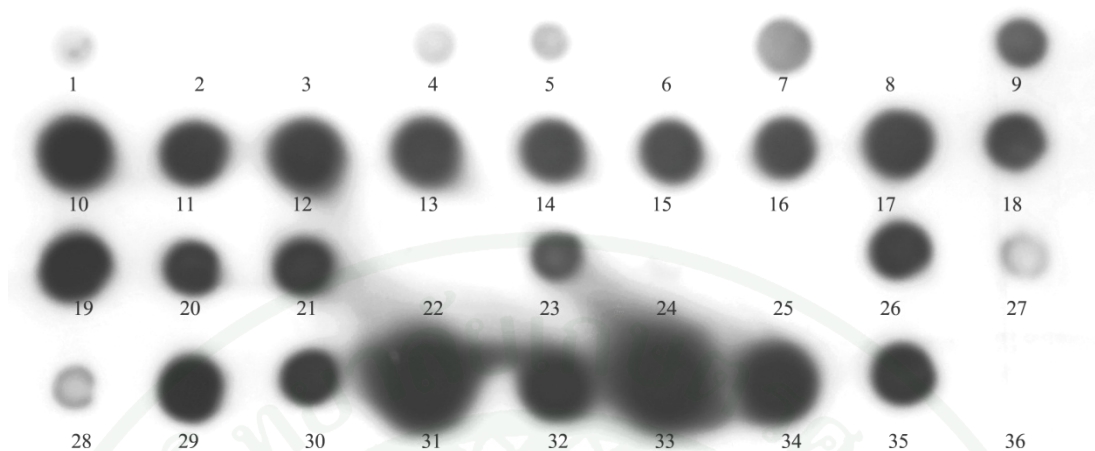
การตรวจพบสัญญาณ hybridization พบว่า คี่เอ็นเอ โพรบของ DNA component 3 จะให้สัญญาณที่ดีกว่า DNA component 6 ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณของ DNA component 3 ในคี่เอ็นเอตัวอย่าง ที่มีจำนวนมากกว่าจึงมีโอกาสทำให้คี่เอ็นเอ โพรบสามารถ hybridization ได้ดีกว่า ทำให้ได้สัญญาณที่ชัดเจนกว่า ตัวอย่างคี่เอ็นเอที่ให้สัญญาณชัดเจนเหมือนกันคือ จุดที่ 9-19, 26 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่นำไปตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Universal แล้วพบแถบคี่เอ็นเอขนาดประมาณ

1,000 คู่เบส จุดที่ 9-18 ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Specific ก็ตรวจพบแถบดีเอ็นเอของ DNA component 3, 6 ที่มีแถบดีเอ็นเอเข้มด้วยเช่นกัน สำหรับการตรวจพบสัญญาณที่แตกต่างกันนั้น ได้แก่ จุดที่ 4 ถัดจากตัวอย่างที่ 29 พบสัญญาณการตรวจสอบ DNA component 6 ดีกว่า DNA component 3 เนื่องจากการตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Specific สำหรับตรวจสอบ DNA component 1, 3, 6 พบว่าแถบดีเอ็นเอของ DNA component 6 เข้มกว่าแถบดีเอ็นเอของ DNA component 3 ดังนั้นเมื่อตรวจสอบด้วย Dot blot hybridization จึงทำให้พบสัญญาณของ DNA component 6 ดีกว่า อาจเป็นไปได้ว่าจำนวนแต่ละ Component นั้นมีการเพิ่มปริมาณที่ไม่เท่ากัน จึงทำให้การตรวจสอบมีผลที่แตกต่างกัน สำหรับจุดอื่นๆ ที่ให้สัญญาณแตกต่างกัน เป็นตัวอย่างที่ตรวจสอบด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Universal แต่ไม่ได้ตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ Specific จึงอาจเป็นไปได้ว่าจุดที่ให้สัญญาณชัดเจนกว่าอาจจะมีปริมาณของ DNA component นั้นมากกว่า ส่วนจุดที่ไม่พบสัญญาณเลยคือตัวอย่างดีเอ็นเอที่ตรวจด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้วไม่พบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* หรือปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อดังกล่าวที่นำมาตรึงบนเมมเบรนมีน้อยมากหรือมีการสลายตัวจึงทำให้ไม่พบสัญญาณ (ตารางที่ 8)

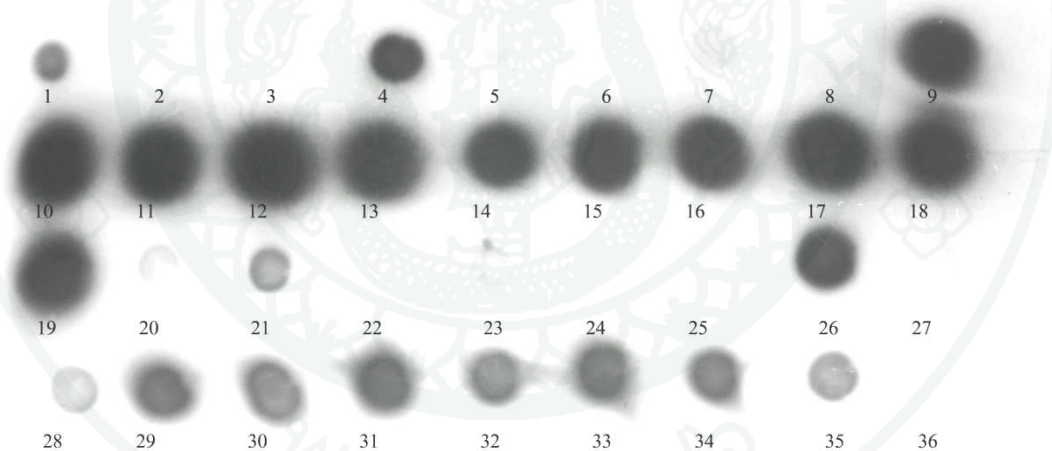
ตารางที่ 7 ตัวอย่างพืชที่นำมาตรวจสอบ DNA component 3 และ DNA component 6 ด้วยเทคนิค

Dot blot hybridization

จุดที่	ตัวอย่างที่	พันธุ์	ลำดับที่	ตัวอย่างที่	พันธุ์
1	27	กล้วยป่า	19	33	กล้วยหอม
2	28	กล้วยหอม Tumok	20	4	กล้วยเล็บมือนาง
3	30	กล้วยหิน	21	5	กล้วยเล็บมือนาง
4	29	กล้วยไข่	22	41	กล้วยน้ำว้า
5	3	กล้วยเล็บมือนาง	23	42	กล้วยน้ำว้า
6	2	กล้วยเล็บมือนาง	24	18	กล้วยน้ำว้า
7	11	กล้วยเล็บมือนาง	25	19	กล้วยน้ำว้า
8	12	กล้วยเล็บมือนาง	26	16	กล้วยเล็บมือนาง
9	26	กล้วยหอมเขียว	27	24	พุทธรักษา
10	51	กล้วยหอม	28	17	กล้วยน้ำว้า
11	52	กล้วยหอม	29	1:100	Plasmid BBTV3/6
12	54	กล้วยไข่	30	1:500	Plasmid BBTV3/6
13	55	กล้วยไข่	31	1:100	PCR 3/PCR 6
14	61	กล้วยเล็บมือนาง	32	1:500	PCR 3/PCR 6
15	62	กล้วยเล็บมือนาง	33	1:100	Probe
16	65	กล้วยนาก	34	1:500	Probe
17	64	กล้วยนาก	35	50	กล้วยหอม
18	56	กล้วยไข่	36	73	กล้วยน้ำว้าไม่แสดง อาการ



ภาพที่ 29 ผลการตรวจสอบ DNA component 3 ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization ด้วยโพรบ BBTv-DNA3-DIG จุดที่ 1 – 26, 28 คือตัวอย่างดีเอ็นเอของกล้วย จุดที่ 27 คือ พุทธรักษา จุดที่ 29-35 คือ positive control และจุดที่ 36 คือ negative control



ภาพที่ 30 ผลการตรวจสอบ DNA component 6 ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization ด้วยโพรบ BBTv-DNA6-DIG จุดที่ 1 – 26, 28 คือตัวอย่างดีเอ็นเอของกล้วย จุดที่ 27 คือ พุทธรักษา จุดที่ 29-35 คือ positive control และจุดที่ 36 คือ negative control

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบผลการตรวจสอบ DNA component 3 และ DNA component 6 ด้วยเทคนิค Dot blot hybridization กับวิธีพีซีอาร์

จุดที่	พันธุ์	Dot blot hybridization		วิธีพีซีอาร์	
		Component 3	Component 6	Universal	Specific
1	กล้วยป่า	+	++	+++	++
2	กล้วยหอม Tumok	-	-	+++	++
3	กล้วยหิน	-	-	+++	+++
4	กล้วยไข่	+	++	+++	+
5	กล้วยเล็บมือนาง	+	-	+++	0
6	กล้วยเล็บมือนาง	-	-	-	0
7	กล้วยเล็บมือนาง	+++	-	+	0
8	กล้วยเล็บมือนาง	-	-	-	0
9	กล้วยหอมเขียว	+++	+++	+++	+++
10	กล้วยหอม	+++	+++	+++	++
11	กล้วยหอม	+++	+++	+++	++
12	กล้วยไข่	+++	+++	+++	+++
13	กล้วยไข่	+++	+++	+++	+++
14	กล้วยเล็บมือนาง	+++	+++	+++	+++
15	กล้วยเล็บมือนาง	+++	+++	+++	+++
16	กล้วยนาก	+++	+++	+++	+++
17	กล้วยนาก	+++	+++	+++	++
18	กล้วยไข่	+++	+++	+++	+++
19	กล้วยเล็บมือนาง	+++	+++	+++	+++
20	กล้วยเล็บมือนาง	+++	-	+++	0
21	กล้วยเล็บมือนาง	+++	++	+++	0
22	กล้วยน้ำว้า	-	-	+++	0
23	กล้วยน้ำว้า	+++	-	0	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)

จุดที่	พันธุ์	Dot blot hybridization		วิธีพีซีอาร์	
		Component 3	Component 6	Universal	Specific
24	กล้วยน้ำว้า	-	-	++	-
25	กล้วยน้ำว้า	-	-	-	0
26	กล้วยเล็บมือนาง	+++	+++	-	++
27	พุทธรักษา	-	-	+++	0
28	กล้วยน้ำว้า	+	+	-	0
29	1:100 Plasmid	+++	-	0	0
30	1:500 Plasmid	+++	-	0	0
31	1:100 PCR	+++	-	0	0
32	1:500 PCR	+++	-	0	0
33	1:100 Probe	+++	-	0	0
34	1:500 Probe	+++	-	0	0
35	กล้วยหอม	+++	++	++	+++
36	กล้วยน้ำว้า	-	-	-	-

หมายเหตุ ผลการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์และ Dot blot hybridization, ไม่ถูกตรวจสอบ = 0,
 ตรวจไม่พบ = -, พบสัญญาณ/แถบดีเอ็นเอ น้อย = +, พบสัญญาณ/แถบดีเอ็นเอ
 ปานกลาง = ++, พบสัญญาณ/แถบดีเอ็นเอ มาก = +++

ตารางที่ 9 สรุปลักษณะของโรค Banana bunchy top disease (BBTD) และผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus*

ที่	พันธุ์	แหล่งปลูก	อาการ	วิธีพีซีอาร์			Dot Blot	
				DNA component ที่			hybridization	
				1-6	1, 3, 6	2, 4, 5	3	6
1	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	-	-	0	0	0	0
2	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	-	-	0	0	-	-
3	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	++	+++	0	0	+	-
4	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	++	+++	0	0	0	0
5	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	+++	+++	0	0	+++	-
6	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	+++	+++	++	+++	+++	++
7	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	++	++	0	0	0	0
8	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	++	++	0	0	0	0
9	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	+	+	0	0	0	0
10	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ประทิว จ. ชุมพร	++	+	0	0	+++	-
11	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+	+	0	0	-	-
12	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-	-	0	0	0	0
13	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+	+	0	0	0	0
14	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+	+	0	0	0	0
15	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+	+	0	0	0	0
16	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+++	+++	++	++	+++	+++
17	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	+++	+++	0	0	+	+
18	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-	-	0	0	-	-
19	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-	-	0	0	-	-
20	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-	-	0	0	0	0

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ที่	พันธุ์	แหล่งปลูก	อาการ	วิธีพีซีอาร์			Dot Blot	
				DNA component ที่			hybridization	
				1-6	1, 3, 6	2, 4, 5	3	6
21	ก้ามกุ้ง	จ. ประจวบคีรีขันธ์	-	-	0	0	0	0
22	ก้ามกุ้ง	จ. ประจวบคีรีขันธ์	-	-	0	0	0	0
23	ก้ามกุ้ง	จ. ประจวบคีรีขันธ์	-	-	0	0	0	0
24	พุทธรักษา	ม. เกษตรศาสตร์ บางเขน	-	-	0	0	-	-
25	กล้วยน้ำว้า	อ. ท่าแซะ จ. ชุมพร	-	-	0	0	0	0
26	กล้วยหอมเขียว	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	+++	+++	+++	+++	+++
27	กล้วยป่า	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	++	++	++	+++	+	++
28	กล้วยหอม Tumok	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	++	++	+++	-	-
29	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	++	++	+	+++	+	++
30	กล้วยหิน	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	++	++	+++	+++	-	-
31	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	++	+++	++	+++	+++
32	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	++	+++	++	0	0
33	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	++	+++	++	0	0
34	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	++	0	0	0	0
35	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	++	0	0	0	0
36	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	++	0	0	0	0
37	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	++	0	0	0	0
38	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	++	0	0	0	0
39	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	-	-	0	0	0	0
40	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	-	-	0	0	0	0

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ที่	พันธุ์	แหล่งปลูก	อาการ	วิธีพีซีอาร์			Dot Blot	
				DNA component ที่			hybridization	
				1-6	1, 3, 6	2, 4, 5	3	6
41	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	+++	0	0	-	-
42	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	++	0	0	+++	-
43	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	+++	0	0	0	0
44	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	-	-	0	0	0	0
45	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	++	0	0	0	0
46	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	++	0	0	0	0
47	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	++	0	0	0	0
48	กล้วยน้ำว้า	อ. เมือง จ. สมุทรสาคร	++	-	0	0	0	0
49	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	0	+++	0	0	0
50	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	++	+++	0	+++	++
51	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	+++	++	0	+++	+++
52	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	+++	++	0	+++	+++
53	กล้วยหอม	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	0	+++	0	0	0
54	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	+++	+++	0	0	0
55	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	+++	+++	0	+++	+++
56	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	+++	+++	++	0	+++	+++
57	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	-	-	-	0	0	0
58	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	-	-	-	0	0	0
59	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	-	0	-	0	0	0
60	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา	-	0	-	0	0	0

ตารางที่ 9 (ต่อ)

ที่	พันธุ์	แหล่งปลูก	อาการ	วิธีพีซีอาร์			Dot Blot	
				DNA component ที่			hybridization	
				1-6	1, 3, 6	2, 4, 5	3	6
61	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++	+++	+++	0	+++	+++
62	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+++	++	+++	0	+++	+++
63	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	+	++	+++	0	0	0
64	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++	++	++	0	+++	+++
65	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++	+++	+++	0	+++	+++
66	กล้วยเล็บมือนาง	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	++	0	++	0	0	0
67	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	0	-	0	0	0
68	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	0	-	0	0	0
69	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	0	-	0	0	0
70	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	0	-	0	0	0
71	กล้วยนาก	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	0	-	0	0	0
72	กล้วยไข่	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	0	-	0	0	0
73	กล้วยน้ำว้า	อ. ปากช่อง จ.นครราชสีมา	-	-	0	0	-	-

หมายเหตุ ไม่แสดงอาการ = -, อาการน้อย = +, อาการปานกลาง = ++, อาการรุนแรง = +++
 ผลการตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์และ Dot blot hybridization, ไม่ถูกตรวจสอบ = 0,
 ตรวจไม่พบ = -, พบสัญญาณ/แถบดีเอ็นเอ น้อย = +, พบสัญญาณ/แถบดีเอ็นเอ
 ปานกลาง = ++, พบสัญญาณ/แถบดีเอ็นเอ มาก = +++

สรุป

1. จากการศึกษาครั้งนี้สามารถตรวจสอบหาเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ได้ ด้วยวิธีพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ Universal ที่ออกแบบจากบริเวณ Stem loop common region (CR-SL) จะได้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส

2. ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ทั้งจีโนมด้วยวิธีพีซีอาร์ และการโคลนนิ่ง DNA component ที่ได้จากการโคลนนิ่งได้แก่ DNA component 1, 3, 4, 6 คือ BBTV DNA1-TH ขนาด 1,105 คู่เบส, BBTV DNA3-TH ขนาด 1,076 คู่เบส, BBTV DNA4-TH ขนาด 1,074 คู่เบส, BBTV DNA6-TH ขนาด 1,078 คู่เบส ตามลำดับ และที่ได้จากวิธีพีซีอาร์ได้แก่ DNA component 2, 5 คือ BBTV DNA2-TH ขนาด 1,053 คู่เบส, BBTV DNA5-TH ขนาด 1,008 คู่เบส

3. ทราบหน้าที่ของ DNA component แต่ละ component เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปสืบค้นในฐานข้อมูล พบว่า BBTV DNA1-TH สร้าง Replication Protein, BBTV DNA2-TH ไม่มีตำแหน่งของ ORF จึงไม่ทราบหน้าที่, BBTV DNA3-TH สร้าง Coat Protein, BBTV DNA4-TH สร้าง cell-to-cell Movement Protein, BBTV DNA5-TH สร้าง Retinoblastoma binding-like Protein, BBTV DNA6-TH สร้าง Nuclear Shuttle Protein

4. พบส่วนประกอบของจีโนมที่ประกอบด้วย 1. Stem loop common region (CR-SL) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TATTATTAC เรียกว่า nonanucleotide 2. TATA boxes 3. Major Common Region (CR-M) มี 14 นิวคลีโอไทด์ คือ GGGCCGCAGGCCCG 4. Open Reading Frame (ORF) ที่มีขนาดแตกต่างกันแต่ละ component และไม่พบส่วนประกอบนี้ใน BBTV DNA2-TH

5. นอกจากใช้ไพรเมอร์ Universal ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ได้แล้ว ยังสามารถใช้ไพรเมอร์ Specific ในการตรวจสอบว่าตัวอย่างที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายนั้นมีการสะสมของ DNA component ไດมากที่สุด

6. เทคนิค dot blot hybridization ก็เป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* ได้ด้วยเช่นกัน แต่จะใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบนานกว่าวิธีพีซีอาร์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ดีเอ็นเอโพรบที่เป็น Universal ก็ยังสามารถตรวจสอบได้เช่นกัน

7. จากตัวอย่างกล้วยที่มีอาการของโรค Banana bunchy top disease (BBTD) จำนวน 62 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบด้วยวิธีพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ Universal พบเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* จำนวน 44 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 70.97 ของตัวอย่างกล้วยที่นำมาตรวจสอบ กล้วยเล็บมือนาง กล้วยไข่ กล้วยหอม และกล้วยน้ำว้าที่แสดงอาการของโรคมักจะตรวจพบเชื้อไวรัสดังกล่าว ส่วนกล้วยขนาดใหญ่ไม่พบอาการของโรคและตรวจไม่พบเชื้อไวรัสดังกล่าว

8. จากการศึกษาจีโนมและวิธีการตรวจสอบในครั้งนี้ ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการต่อยอดการศึกษาสามารถนำข้อมูลไปใช้เปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่นเพื่อหาความสัมพันธ์ แหล่งกำเนิดและการกระจายของเชื้อไวรัส *Banana bunchy top virus* รวมถึงใช้เทคนิคข้างต้นในการป้องกันตรวจสอบโรค เพื่อความรวดเร็วในการป้องกันการกระจายของโรคได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ดวงแก้ว ศรีลักษณ์. 2544. **มหัศจรรย์พันธุ์กล้วยในไทย**. สำนักพิมพ์แสงแดดเพื่อนเด็ก, กรุงเทพฯ.

เบญจมาศ ศิลาชัย. 2545. **กล้วย**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พัฒน์พงศ์ ภัทรโกศล, เกียรติ ถิระเศรษฐกุล และ ประวีติ ต้นบุญเอก. 2536. **การถ่ายทอดและพืชอาศัยของเชื้อไวรัส Bunchy top ของกล้วยในประเทศไทย**, กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร บางเขน กรุงเทพมหานคร.

ไมตรี พรหมมินทร์, นวลจันทร์ ดีมา และ ดวงใจ ชูปัญญา. 2537. **โรคบันชีทอปในประเทศไทย**, น. 554-560. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32 (สาขาพืช)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Beetham, P.R., G.J. Hafner., R. M. Harding. and J.L. Dale. 1997. Two mRNAs are transcribed from *banana bunchy top virus*. **Journal of General Virology**. 78: 229-36.

Bolton, C., 2009. **Development of a Rep-inducible, BBTV in based expression system in banana**, The Queensland University of Technology Brisbane Australia.

Burns, T.M., R.M. Harding. and J.L. Dale. 1995. The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components. **Journal of General Virology**. 76: 1471-1482.

College of Tropical Agriculture and Human Resources. 2006. **Banana Bunchy Top Disease in Hawaii**. Available Source: http://www.ctahr.hawaii.edu/bbtd/morse_code.asp, December 17, 2011.

Dale, J.L. 1987. Banana bunchy top: An economically important tropical plant virus disease.

Advances in Virus Research. 33: 301-325.

Department of Agriculture, Fishers and Forestry. 1995. **Bunchy Top.** Available Source:

<http://www.daff.qld.gov.au/home.htm>, December 17, 2011.

Hafner, G.J., R.M. Harding, and J.L. Dale. 1995. Movement and transmission of *banana bunchy top virus* DNA component one in bananas. **Journal of General Virology.** 76: 2279-2285.

Hafner, G.J., M.R. Stafford., L.C. Wolter., R.M. Harding, and J.L. Dale. 1997. Nicking and joining activity of *banana bunchy top virus* replication protein *in vitro*. **Journal of General Virology.** 78: 1795-1799.

Harding, R.M., E.J. Thomas, and J.L. Dale. 1991. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. **Journal of General Virology.** 72: 225-230.

Harding, R.M., T.M. Burns., G.J. Hafner., R. Dietzgen, and J.L. Dale. 1993. The nucleotide sequence of one segment of the banana bunchy top genome contains a putative replicase gene. **Journal of General Virology.** 74: 323-328.

Horser, L.C., R.M. Harding, and J.L. Dale. 2001. Banana bunchy top nanovirus DNA-1 encodes the 'master' replication initiation protein. **Journal of General Virology.** 82: 459-464.

Hu, J.S., M. Wang., D. Sether., W. Xie, and K.W. Leonhardt. 1996. Use of polymerase chain reaction (PCR) to study transmission of *banana bunchy top virus* by the banana aphid (*Pentalonia nigronervosa*). **Annals of Applied Biology.** 128: 55-64.

- Iskra, M.L., M.Garnier and J.M. Bove. 1989. Purification of banana bunchy top virus (BBTV). **Fruits**. 44: 63-66.
- Karan, M., R.M. Harding. and J.L. Dale. 1994. Evidence for two groups of *Banana bunchy top virus* isolates. **Journal of General Virology**. 75: 3541-3546.
- Lazarowitz, S.G. 1992. Geminiviruses: genome structure and gene function. **Critical Reviews in Plant Sciences**. 11: 332-349.
- Magee, C.J.P. 1927. Investigation on the bunchy top disease of the banana. Council for Scientific and Industrial Research. **Bulletin**. No 30.
- Magee, C.J.P. 1940. Transmission studies on the *banana bunchy top virus*. **The Journal of the Australian Institute of Agricultural Science**. 6:109-10.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3th ed. Vol 1-3.
- Sanger, F., S. Nicklen. and A.R. Coulson. 1997. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 12(74): 5463-5467.
- Soweha, H.E. 2005. Detection of Banana Bunchy Top Nanovirus using Polymerase Chain Reaction in Different Egyptian Banana Cultivars. **International Journal of Agriculture and Biology**. 5: 698-700.
- Thomas, E.J. and R.G. Dietzgen. 1991. Purification, characterization and serological detection of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Australia. **Journal of General Virology**. 72: 217-224 .

Wanitchakorn, R., R.M. Harding. and J.L. Dale. 1997. *Banana bunchy top virus* DNA-3 encodes the viral coat protein. **Archives of Virology**. 142: 1673-1680.

Wanitchakorn, R., G.J. Hafner., R.M. Harding. and J.L. Dale. 2000. Functional analysis of proteins encoded by *banana bunchy top virus* DNA-4 to 6. **Journal of General Virology**. 81: 299-306.

Wu, R.Y. and H.J. Su. 1990. Purification and characterization of *banana bunchy top virus*. **Journal of Phytopathology**. 128: 153-160.



ภาคผนวก

1. สารละลายและบัฟเฟอร์

1.1 สารละลาย 0.5 M EDTA (pH 8.0)

ชั่ง EDTA 61 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย ปรับ pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.2 สารละลาย 1 M Tris HCl (pH 8.0)

ชั่ง Tris base 12.11 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย ปรับ pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.3 สารละลาย 50X TAE Stock Solution

ชั่ง Tris Base 242 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย จากนั้นตวง Glacial Acetic Acid ปริมาตร 57.1 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.4 สารละลาย 20% SDS

ชั่ง SDS 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย และเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.5 สารละลาย 20x SSC

ชั่ง NaCl 187.66 กรัม และ Sodium citrate 44.12 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อยปรับ pH เท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.6 บัฟเฟอร์ TE (TE buffer), pH 8.0

ตวง 1 M Tris (pH 8.0) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.7 บัฟเฟอร์ Maleic (Maleic buffer)

ชั่ง Malaic acid 11.60 กรัม และ NaCl 8.77 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.8 บัฟเฟอร์ Detection (Detection buffer)

ชั่ง Tris-HCl 7.88 กรัม และ NaCl 2.92 กรัม ละลายในน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²

1.9 บัฟเฟอร์ Hybridization (Hybridization buffer)

ตวง 20x SSC ปริมาตร 25 มิลลิลิตร, 10% N-lauroylsarcosine ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 20% SDS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และชั่ง Blocking reagent 1 กรัม ผสมสารที่กล่าวมาข้างต้นในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งด้วยความดันมาแล้ว จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

1.10 บัฟเฟอร์ 1% Blocking buffer

ชั่ง Blocking reagent 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน

1.11 บัฟเฟอร์ Denature (Denature buffer)

ผสม 20x SSC ปริมาตร 6.25 ไมโครลิตร กับ 6 N NaOH ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 มิลลิลิตร

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม Hybridization buffer, 1% Blocking solution และ Denature buffer ต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อมาก่อน รวมทั้งภาชนะที่ใช้เตรียม

2. สารปฏิชีวนะและอื่นๆ

2.1 สารปฏิชีวนะกานามัยซิน (kanamycin) เข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายกานามัยซิน 0.5 กรัม (500 มิลลิกรัม) ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตร ให้ได้ 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 1% อะกาโรสเจล ในบัฟเฟอร์ TAE

ชั่ง Agarose 1 กรัม ผสมลงใน 0.5x TAE ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นไปให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจน Agarose ละลายจนหมด

2.3 อาหารเหลวและอาหารแข็ง สูตร 2xYT

สำหรับอาหารเหลว ชั่ง Yeast extract 10 กรัม, Thryptone 16 กรัม และ NaCl 15 กรัม ละลายกับน้ำกลั่นเล็กน้อย แล้วจึงเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1 ลิตร ถ้าจะเตรียมอาหารแข็งเตรียม

เช่นเดียวกับอาหารเหลว แต่เติม Agar 5 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งมาเชื่อมด้วยหม้อนึ่ง
ความดัน นาน 15 นาที ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว²



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาวพิกุลแก้ว วงศ์สุวรรณ Miss Pikulkaew Wongsuwan
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 6 เดือน กันยายน พ.ศ. 2527
สถานที่เกิด	อำเภอสองพี่น้อง จังหวัด สุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	- พ.ศ. 2552 – ปัจจุบัน กำลังศึกษาระดับปริญญาโท สาขาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ - พ.ศ. 2546 – 2549 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน (วท.บ (เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร) เกียรตินิยมอันดับสอง)
ผลงานทางวิชาการ	การนำเสนอผลทางวิชาการแบบโปสเตอร์และเรื่องเต็ม เรื่อง รหัสพันธุกรรมและส่วนประกอบจีโนมของเชื้อไวรัสบานานา บันชีทอปในประเทศไทย ในการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50 พ.ศ. 2555
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ระดับบัณฑิตศึกษา ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (พ.ศ. 2554)