



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร)

ปริญญา

วิจัยและพัฒนาการเกษตร

เกษตร กำแพงแสน

สาขา

คณะ

เรื่อง

การจำแนกและวินิจฉัยเชื้อไวรัสของพุทธรักษาและการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรค

Identification and Diagnosis of Canna Viruses and Production of Virus-Free Stocks

นามผู้วิจัย

นางสาวอมิสรา หล้าพรหม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ, Dr.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ศิริวรรณ บุรีคำ, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสกสม อาตมางกูร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การจำแนกและวินิจฉัยเชื้อไวรัสของพุทธรักษาและการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรค

Identification and Diagnosis of Canna Viruses and Production of Virus-Free Stocks

โดย

นางสาวอมิสรา หล้าพรหม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อมิสา หล้าพรหม 2555: การจำแนกและวินิจฉัยเชื้อไวรัสของพุทธรักษาและการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรค ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิจัยและพัฒนาการเกษตร) สาขาวิจัยและพัฒนาการเกษตร คณะเกษตร กำแพงแสน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ, Dr.Agr. 125 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ทำการสำรวจโรคไวรัสของพุทธรักษา จำแนกชนิดไวรัสและพัฒนาเทคนิคสำหรับตรวจสอบไวรัสในพุทธรักษา รวมทั้งศึกษาวิธีการผลิตพุทธรักษาปลอดไวรัสโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เก็บตัวอย่างใบพุทธรักษาที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัสจากพื้นที่สาธารณะภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขนและกำแพงแสน ตลาดต้นไม้สวนจตุจักร แปลงเกษตรกร และพุทธรักษาจากบริษัทเอกชน รวม 88 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA, PCR และ RT-PCR พบว่าตัวอย่างร้อยละ 59.09 มีเชื้อ *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) ร้อยละ 13.63 มีเชื้อ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) และร้อยละ 5.68 พบทั้งสองเชื้อ ตรวจดูลักษณะและขนาดของเชื้อ CaYSV ในใบและดอกพุทธรักษาที่เป็นโรคด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสรูปท่อนยาวคด (Flexuous rod) มีความยาวเฉลี่ย 790 นาโนเมตร สังเคราะห์ยีนของไวรัสด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าดีเอ็นเอขนาด 565 นิวคลีโอไทด์ ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เป็นยีนบางส่วนของ ORF III ของเชื้อ CaYMV และดีเอ็นเอขนาด 864 นิวคลีโอไทด์จากปฏิกิริยา RT-PCR เป็นยีน coat protein (CP) ของเชื้อ CaYSV ทำการสังเคราะห์โปรตีน CP ของเชื้อ CaYSV ในสภาพหลอดทดลอง ได้โปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP น้ำหนักโมเลกุล 34 kDa นำมาใช้ฉีดกระต่ายและผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี ทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการตรวจสอบเชื้อ CaYSV ในใบพุทธรักษาที่เป็นโรค ด้วยเทคนิค ELISA และ NCM-ELISA พบว่ามีความจำเพาะกับเชื้อ CaYSV การใช้เทคนิค PCR และ RT-PCR สามารถตรวจสอบเชื้อ CaYMV และ CaYSV ได้ทั้งในใบ ดอก ปลายยอด รวมทั้งใบของต้นอ่อนที่มาจากเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพุทธรักษาจากปลายยอดเจริญ เพื่อผลิตต้นพุทธรักษาปลอดโรคไวรัส พบว่า การใช้ปลายยอดเจริญขนาด 0.5-1 มิลลิเมตรเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 0.5xMS ที่เติม BA อัตรา 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ได้ต้นอ่อนที่ปลอดเชื้อ CaYMV และ CaYSV ในอัตรา 16.67% และ 73.33% ตามลำดับ

Amisa Laprom 2012: Identification and Diagnosis of Canna Viruses and Production of Virus-Free Stocks. Master of Science (Agricultural Research and Development), Major Field: Agricultural Research and Development, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen. Thesis Advisor: Assistant Professor Pissawan Chiemsombat, Dr. Agr. 125 pages.

A survey on virus diseases of canna plants was conducted and the causal viruses were identified. Virus detection by PCR techniques, and protocol to produce virus free canna stocks were evaluated. Total of 88 canna samples expressing virus-like symptoms, included canna plants collected from public areas at Kasetsart University Bangkhaen and Kamphaeng Saen campuses, commercial canna varieties from Chatuchak market, canna farm, and private company, were used in this study. Virus diagnosis by ELISA, PCR, and RT-PCR indicated that 59.09 and 13.63 % of the samples were infected by *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) and *Canna yellow streak virus* (CaYSV), respectively, while 5.68% of canna samples were doubly infected. By using leaf dip preparation and electron microscopy, flexuous rod-shaped virus particles size of 790 nm was observed. Amplification of viral genes by PCR yielded DNA product size of 565 bp resembled partial sequence of CaYMV-ORFIII, while RT-PCR yielded 864 bp DNA product of complete CaYSV coat protein gene. The cloned CaYSV-CP gene was subsequently expressed *in vitro* by using pQE expression system, yielding 34 kDa recombinant 6xHis-CaYSV-CP polypeptide. The expressed protein was injected into a rabbit and polyclonal antibody (PAb-CaYSV) was obtained. The PAb-CaYSV-CP reacted specifically to CaYSV in sap of infected canna leaf by Indirect-ELISA and NCM ELISA. Evaluation of the developed PCR and RT-PCR protocols indicated their efficiency in CaYSV and CaYMV diagnosis from infected leaf, flower, shoot, as well as canna plantlets derived from meristem culture. The production of virus-free canna plant was achieved by culturing 0.5-1 mm. meristem tip of CaYMV and CaYSV-infected plants on 0.5xMS liquid medium supplemented with 0.2 mg/L BA. Regenerated plantlets were 16.67 and 73.33% free from CaYMV and CaYSV, respectively.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

___/___/___

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ให้โอกาสในการศึกษา ช่วยชี้้นำความรู้ทั้งในรายวิชาเรียนและการทำงานวิจัย รวมทั้งสนับสนุนทุนสำหรับการศึกษาและวิจัย ดร.นงนพพร คุณากร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำแนะนำรวมทั้งเชื้อเพื่อข้อมูลและสถานที่ในการปฏิบัติงานเพื่อให้งานวิจัยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ ผศ.ดร.คณินนิตย์ เจริญวรารกร ประธานการสอบ และ รศ.มานะ กาญจนมณีเสถียร ผู้ทรงคุณวุฒิที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน สำหรับสถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย

ขอบคุณเพื่อนร่วมงานสำหรับแรงกายแรงใจ และกราบขอบพระคุณสมาชิกทุกๆ คนในครอบครัวที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้เสมอมา

อมิส่า หล้าพรหม
พฤษภาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลการทดลองและวิจารณ์	29
สรุป	103
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	105
ภาคผนวก	115
ประวัติการทำงานและการศึกษา	125

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ของไวรัส และขนาดของดีเอ็นเอผลผลิต	20
2 ตัวอย่างพุทธรักษาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และผลการตรวจสอบโรคไวรัส	36
3 ตัวอย่างพุทธรักษาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และผลการตรวจสอบโรคไวรัส	38
4 ตัวอย่างพุทธรักษาจากตลาดนัดจตุจักร จ.กรุงเทพฯ และผลการตรวจสอบโรคไวรัส	39
5 ตัวอย่างพุทธรักษาจากแปลงปลูกเชิงพาณิชย์ จ.นนทบุรี และผลการตรวจสอบโรคไวรัส	40
6 ตัวอย่างพุทธรักษาจากบริษัทเอกชน และผลการตรวจสอบโรคไวรัส	41
7 สรุปผลการสำรวจโรคไวรัสในพุทธรักษา โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจเชื้อ Canna yellow mottle virus (CaYMV) และเทคนิค RT-PCR ตรวจเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV)	46
8 GenBank accession number ของยีน ORFIII ของเชื้อ Canna yellow mottle virus (CaYMV) ที่พบในการทดลองนี้ และที่มีรายงานพบในต่างประเทศ ที่นำมา ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม	50
9 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนจำนวน 188 เรซิดิวส์ จากบางส่วนของยีน ORF III ของ Canna yellow mottle virus (CaYMV) ที่ศึกษาในครั้งนี้กับไอโซเลตจากต่างประเทศ ชื่อไอโซเลตและรหัสข้อมูลอยู่ในตารางที่ 9	52
10 GenBank accession number ของเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) ที่ได้จากพุทธรักษาในการทดลองนี้ กับไวรัส CaYSV ในต่างประเทศ เพื่อใช้ในการ เปรียบเทียบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนกับข้อมูลของ ไวรัสในกลุ่มเดียวกัน	57

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
11	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนยีนขนาด 170 bp ทางด้านปลาย 3' ของ Canna yellow streak virus (CaYSV) กับไวรัส CaYSV ใน ต่างประเทศ
12	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนจากชิ้นส่วนยีนขนาด 864 bp ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของ Canna yellow streak virus (CaYSV) กับ ไวรัส CaYSV ในต่างประเทศ
13	ค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP เมื่อใช้โปรตีน 6xHis- CaYSV-CP บริสุทธิ์ความเข้มข้น 3ug/ml เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA
14	ค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP เมื่อใช้น้ำคั้นใบพุทธรักษา เป็นโรคที่เจือจาง 1: 10 เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA
15	การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ต่อเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) ในน้ำคั้นพืช ด้วยวิธี ELISA ใช้แอนติบอดีจากการ เจาะเลือดครั้งที่ 4 เจือจาง 1: 1000 เท่า
16	การตรวจสอบความไวของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ต่อเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรค และโปรตีน 6xHis- CaYSV-CP บริสุทธิ์ ตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดี จากการ เจาะเลือดครั้งที่ 4 เจือจาง 1: 1000 เท่า เตรียม น้ำคั้นพืชตั้งต้นเจือจาง 1:10 เท่า ใน coating buffer ที่เติม 0.2% sodium diethyldithiocarbamate
17	การใช้แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ตรวจสอบเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) ในน้ำคั้นพืช ด้วยวิธี ELISA เจือจางแอนติบอดี 1: 1000 เท่า

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
18 การทดสอบความไวของวิธี PCR ที่ใช้ตรวจสอบ Canna yellow mottle virus (CaYMV) โดยเชื้อจากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพุทธรักษาเป็นโรค AB01 และใช้เป็น ต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนของไวรัส ตรวจสอบผลจากดีเอ็นเอ ผลผลิตขนาด 565 คู่เบส	86
19 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจสอบไวรัส Canna yellow mottle virus (CaYMV) จากส่วนต่างๆ ของพุทธรักษา โดยใช้วิธี PCR	89
20 การทดสอบความไวของวิธี RT-PCR ที่ใช้ตรวจสอบ Canna yellow streak virus (CaYSV) โดยเชื้อจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบพุทธรักษาเป็นโรค PHC-478 และใช้ เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนของไวรัส ตรวจสอบผล จากดีเอ็นเอผลผลิตขนาด 691 คู่เบส	91
21 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจสอบไวรัส Canna yellow streak virus (CaYSV) จากส่วนต่างๆ ของพุทธรักษา โดยใช้วิธี PCR	94
22 การเจริญของเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของพุทธรักษาในอาหารเหลว สูตร 0.5x MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร นับจำนวน เนื้อเยื่อหลังจาก เพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์	97
23 พุทธรักษาปลอดโรคไวรัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย ยอด เมื่อ ตรวจสอบไวรัส Canna yellow mottle virus (CaYMV) และ Canna yellow streak virus (CaYSV) โดยใช้วิธี PCR และ RT-PCR	100

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะและสีของดอกพุทธรักษาจากต้นที่เก็บมาศึกษาทดลอง โดยแบ่งแยกสายพันธุ์ ตามสีของกลีบดอก	30
2 ลักษณะอาการผิดปกติคล้ายโรคไวรัส ที่พบในพุทธรักษาภายในวิทยาเขตบางเขน	32
3 ลักษณะอาการผิดปกติคล้ายโรคไวรัส ที่พบในพุทธรักษาภายในวิทยาเขตกำแพงแสน ตลาด จตุจักร และแปลงปลูก จ.นนทบุรี	33
4 ลักษณะอาการผิดปกติคล้ายโรคไวรัส ที่พบในพุทธรักษาจากบริษัทเอกชน	34
5 แอบดีเอ็นเอขนาด 565 คู่เบสที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ Canna yellow mottle virus (CaYMV) ในตัวอย่างใบพุทธรักษาจากวิทยาเขตบางเขน กำแพงแสน และแปลงของเกษตรกร วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide	43
6 แอบดีเอ็นเอขนาด 565 คู่เบสที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ Canna yellow mottle virus (CaYMV) ในตัวอย่างใบพุทธรักษาจากบริษัทเอกชนและ ตลาดจตุจักร วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจล ด้วย ethidium bromide	44
7 แอบดีเอ็นเอขนาด 691 คู่เบสที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา RT-PCR จากการใช้ไพรเมอร์ CannaSVF1 และ CannaSVR2 เพื่อตรวจสอบเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) ในตัวอย่างใบพุทธรักษาจากวิทยาเขตกำแพงแสน ตลาดจตุจักรและ บริษัทเอกชน วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจล ด้วย ethidium bromide	45
8 แอบดีเอ็นเอขนาด 1,256 คู่เบส จากการใช้ไพรเมอร์ CannaSVF1 และ 5' UTR เพื่อ ตรวจสอบ Canna yellow streak virus (CaYSV) ที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา RT-PCR วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
9	อนุภาคไวรัสรูปท่อนยาวคด (ลูกศรชี้) ในตัวอย่างพุทธรักษาจากบริษัทเอกชน เมื่อ ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Dip preparation (สเกล เท่ากับ 200 นาโนเมตร)	49
10	ลำดับกรดอะมิโนจากบางส่วนของยีน ORF III จำนวน 188 เรซิดิวส์ ของ Canna yellow mottle virus (CaYMV) ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ (BK1, JJ1, KPS1, BK1nt, PHC) เปรียบเทียบแบบ Multiple alignment กับไอโซเลทในต่างประเทศ วิเคราะห์ ด้วยโปรแกรม CLC Bio (จุดสีดำ หมายถึง ชนิดและตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโน ของแต่ละไอโซเลทที่ตรงกัน)	54
11	Neighbor-joining phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นด้วยค่า Distance ของลำดับกรดอะ มิโนบางส่วนของยีน ORF III ของเชื้อ Canna yellow mottle virus (CaYMV) โดยใช้ โปรแกรม MEGA package version 5.05 และแสดงค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 replications ที่กิ่งของ tree	55
12	ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณที่ไม่แปลรหัสทางปลายสายอาร์เอ็นเอด้าน 3'ขนาด 170 bp ของ Canna yellow streak virus (CaYSV) เปรียบเทียบแบบ Multiple alignment กับไอโซเลทในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLC Bio (จุดสีดำ หมายถึง ชนิดเบสที่ตรงกันของแต่ละไอโซเลท)	59
13	ลำดับกรดอะมิโนของยีน CP จำนวน 287 เรซิดิวส์ ของ Canna yellow streak virus (CaYSV) กับไวรัส CaYSV ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ (K2, PHC478) กับไอโซเลทใน ต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLC Bio (จุดสีดำ หมายถึง ชนิดและตำแหน่ง ของลำดับกรดอะมิโนของแต่ละไอโซเลทที่ตรงกัน)	63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
14	Neighbor-joining phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นด้วยค่า Distance ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) โดยใช้ โปรแกรม MEGA package version 5.05 และแสดงค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 replications ที่กิ่งของ tree 64
15	แถบดีเอ็นเอขนาด 864 คู่เบส จากการใช้ไพรเมอร์ CaYex-F และ CaYex-R เพื่อ สังเคราะห์ชิ้น CP ของ Canna yellow streak virus (CaYSV) จากปฏิกิริยา RT-PCR วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลดด้วย ethidium bromide 67
16	ผลการตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP ด้วยเทคนิค SDS-PAGE 68
17	ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP จากโคลน K2-54 สกัดโปรตีนในสภาวะ denature condition และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA agarose column ตรวจสอบด้วย 12% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis 69
18	Calibration curve ที่สร้างขึ้นจากค่าระยะทาง (cm) การเคลื่อนที่ของโปรตีน และ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (kDa) เมื่อแยกขนาดโปรตีนใน 12% SDS- Polyacrylamide gel พบว่าโปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 2.6 cm ซึ่งประเมินน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 34 kDa 70
19	Standard curve ที่สร้างขึ้นจากค่า Absorbance ที่ 595 nm ของโปรตีน BSA ที่ ทราบความเข้มข้น (ตั้งแต่ 0.032-4 มก./มล.) คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีน ลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP ที่แยกให้บริสุทธิ์ เท่ากับ 1.34 มก./มล. 71

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า	
20	กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี PAb-CaYSV ต่อโปรตีน CP จากการเจาะเลือด 5 ครั้ง ใช้โปรตีน 6xHis- CaYSV-CP ความเข้มข้น 3 µg/ml เป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วย เทคนิค ELISA วัดค่า ELISA ที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที	74
21	กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี PAb-CaYSV ต่อโปรตีน CP จากการเจาะเลือด 5 ครั้ง ใช้ น้ำคั้นใบพุทธรักษาที่เป็นโรคเป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA วัด ค่า ELISA ที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที	76
22	การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรค PHC-478 และพืชปกติ ตรวจสอบด้วย วิธี NCM-ELISA โดยใช้แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 เจือจาง 1: 1000 เท่า	78
23	ผลจากการตรวจสอบความไวของวิธี NCM-ELISA ในการตรวจสอบเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) จากน้ำคั้นพืชเป็นโรคเจือจางเปรียบเทียบกับโปรตีน 6xHis-CaYSV-CP ใช้ PAb-CaYSV-CP เจือจาง 1:1000 เท่า เป็นแอนติบอดี เตรียม น้ำคั้นพืชเจือจาง 1:10 เท่าในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.5	82
24	ผลการตรวจสอบเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) ในชิ้นพืชและน้ำคั้นจาก ส่วนต่างๆ ของพุทธรักษาที่เป็นโรค เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA ใช้ PAb- CaYSV-CP เจือจาง 1:1000 เท่า เป็นแอนติบอดี	85
25	แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ Canna yellow mottle virus (CaYMV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide	88
26	ขนาดของปลายยอดพุทธรักษาที่ใช้ทดสอบความแม่นยำในการตรวจไวรัสทั้งสองชนิด ด้วยวิธี PCR และ RT-PCR	89

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
27 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ Canna yellow mottle virus (CaYMV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide	90
28 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อตรวจสอบ Canna yellow streak virus (CaYSV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gelelectrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide	93
29 ขนาดปลายยอดเจริญ (apical meristem) ของพุทธรักษาที่นำมาทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์	96
30 ต้นอ่อนพุทธรักษาที่พัฒนามาจากปลายยอดเจริญหลังจากทดลองเพาะเลี้ยงใน อาหารเหลวสูตร 0.5xMS นาน 8 สัปดาห์	98
31 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ Canna yellow mottle virus (CaYMV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide	101
32 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ Canna yellow streak virus (CaYSV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide	102

การจำแนกและวินิจฉัยเชื้อไวรัสของพุทธรักษาและการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรค

Identification and Diagnosis of Canna Viruses and Production of Virus-Free Stocks

คำนำ

พุทธรักษาเป็นไม้ประดับที่ได้รับความนิยมในหลายประเทศ การปรับปรุงพันธุ์พุทธรักษาให้ได้พันธุ์ลูกผสมเริ่มขึ้นในปี 1848 และได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย (Gray and Grant, 2003) นอกจากนี้จะมีประโยชน์ด้านความสวยงาม พุทธรักษายังเป็นแหล่งให้สารประกอบประเภทแป้งที่สำคัญ ในบางประเทศมีการเพาะปลูกพุทธรักษาเพื่อป้อนโรงงานผลิตแป้งสำหรับบริโภค เช่น จีน ไต้หวัน เวียดนาม (Chansri *et al.*, 2005) นอกจากนี้จะมีการปรับปรุงพันธุ์เพื่อให้ทนต่อสภาพอากาศแล้ว ในปัจจุบันมีความนิยมปรับปรุงพันธุ์พุทธรักษาเพื่อให้มีลักษณะเป็นพุ่มเตี้ย จำนวนต้นและดอกมาก แต่กลับพบว่าพุทธรักษาสายพันธุ์ต้นเตี้ยส่วนใหญ่ที่นำมาปลูกขยายพันธุ์ติดเชื้อไวรัส (Gray and Grant, 2003) ซึ่งเป็นปัญหาหลักในแหล่งเพาะปลูกพุทธรักษาและไวรัสสามารถแพร่ระบาดไปกับเหง้าที่มีเชื้อไวรัส (PROTA, 2011) อาการของพุทธรักษาที่เกิดจากเชื้อไวรัส ประกอบไปด้วย อาการใบด่างขีด ใบและดอกเสียรูปทรง ต้นแคระแกร็น (PROTA, 2011) ใบด่างขีดและเป็นแผลเนื้อเยื่อตาย (Borroto *et al.*, 2008) ใบด่างประ (Momol *et al.*, 2004) ซึ่งในระหว่างปี ค.ศ. 2005-2007 หลายประเทศที่ผลิตพุทธรักษาเพื่อการค้าต่างประเทศประสบปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส จนต้องเผาทำลายท่อนพันธุ์เป็นจำนวนมาก ในการกำจัดและป้องกันการแพร่ระบาดของไวรัส ด้วยการเตรียมหน่อพันธุ์จากวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดเจริญของต้นที่เป็นโรค (PROTA, 2011) เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถทำให้พืชปราศจากเชื้อไวรัสได้ ซึ่งถือเป็นเทคนิคที่สำคัญและให้ผลดีที่สุดในการผลิตพืชปลอดโรคไวรัส (Kromer and Kukulczanka, 1985; Walkey *et al.* 1980)

ในประเทศไทยเริ่มมีเกษตรกรปลูกและขยายพันธุ์พุทธรักษาออกสู่ตลาดไม้ประดับทั้งในและต่างประเทศ แต่ยังไม่มียางานเกี่ยวกับโรคไวรัสพุทธรักษาในประเทศไทย การตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อติดตามและหลีกเลี่ยงการเพิ่มปริมาณส่วนขยายพันธุ์ที่ติดเชื้อ สามารถช่วยลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและลดการระบาดของโรคได้ (Pappu *et al.*, 2008) ในปี 2552 คลินิกสุขภาพพืช ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ได้รับตัวอย่างเหง้าพุทธรักษาจากบริษัทเอกชน ที่ขอรับบริการตรวจสอบไวรัสและการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรค ซึ่งจากการตรวจเอกสาร

เบื้องต้นไม่พบว่ามีรายงานเกี่ยวกับไวรัสของพุทธรักษาในประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงดำเนินการสำรวจและเก็บตัวอย่างพุทธรักษาเพื่อตรวจสอบไวรัสและจำแนกชนิด พัฒนาวิธีการตรวจเชื้อไวรัสในพุทธรักษาจากส่วนของปลายยอดที่ใช้ส่งออกเพื่อการค้า และพัฒนาวิธีการผลิตพุทธรักษาปลอดโรคไวรัสโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดเพื่อจะได้นำความรู้ไปเผยแพร่และปรับใช้ให้สอดคล้องกับความต้องการของเกษตรกรและผู้ผลิตพันธุ์ไม้ต่อไป



วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. สำรวจและจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพุทธรักษา
2. พัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสจากส่วนต้นและเหง้าของพุทธรักษา
3. ศึกษาวิธีการผลิตพุทธรักษาปลอดไวรัสโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอด
เจริญ

การตรวจเอกสาร

1. แหล่งกำเนิดของพุทธรักษาและการใช้ประโยชน์

พุทธรักษา (*Canna spp.*) เป็นพืชที่จัดอยู่ในสกุล *Cannaceae* มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อนของทวีปอเมริกา ซึ่งสายพันธุ์ส่วนใหญ่มาจากอเมริกาใต้ (Gray and Grant, 2003) ปัจจุบันมีการเพาะปลูกทั้งสายพันธุ์แท้และพันธุ์ลูกผสมมากกว่า 1,000 สายพันธุ์ (Patra *et al.*, 2008) โดยมีแหล่งผลิตท่อนพันธุ์พุทธรักษารายใหญ่ของโลกอยู่ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย อังกฤษ ฝรั่งเศส เยอรมนีและเนเธอร์แลนด์ รองลงมาคืออิสราเอล แอฟริกาใต้ ญี่ปุ่น และประเทศไทย (PROTA, 2011) การขยายพันธุ์พุทธรักษานิยมใช้เหง้าหรือลำต้นใต้ดินซึ่งมีลักษณะเป็นปุ่มปมขนาดความกว้าง 2.5-3.5 เซนติเมตร มีเนื้อมาก เจริญและแตกกอชานานกับพื้นดิน (Kamer and Maas, 2008) ในช่วงกลางคริสต์ศตวรรษที่ 19 พุทธรักษาเริ่มเป็นที่รู้จักในฐานะของพืชอาหารที่ให้แป้ง (*C.edulis*) มีการเพาะปลูกในประเทศเปรูเพื่อนำเหง้ามาบริโภค ในขณะเดียวกันมีผู้นำเมล็ดพุทธรักษา *C.indica* มาใช้ประโยชน์ในการทำเครื่องประดับ (Gray and Grant, 2003) ใช้ใบแทนภาชนะห่อหุ้มอาหาร (PROTA, 2011) บางพันธุ์นำมาแปรรูปเป็นแป้งเพื่อบริโภค (Kamer and Maas, 2008) พุทธรักษาไม้มีเนื้อแป้งขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่น ความยืดหยุ่นสูงแต่ย่อยสลายได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับแป้งข้าวโพด (Tanaka *et al.*, 2006) นอกจากจะใช้เป็นไม้ประดับเพื่อความสวยงามและเป็นพืชอาหารแล้ว ในปัจจุบันมีการพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษจากลำต้นพุทธรักษา การใช้ประโยชน์จากเมล็ดสีในเมล็ดพุทธรักษา ต้นพุทธรักษาสามารถดูดซับโลหะหนักในดินและแหล่งน้ำที่ปลูกพืชชนิดนี้รวมทั้งมีตัวยาที่สามารถใช้ในการรักษาโรค (Lawal *et al.*, 2010; PROTA, 2011) ส่วนเหง้าของพุทธรักษา *C.edulis* ยังนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ซึ่งสามารถใช้เป็นส่วนผสมของก๊าซไฮดรอลิกส์ได้อีกด้วย (Dewi *et al.*, 2010)

ในปี ค.ศ. 2000 ประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นแหล่งผลิตพุทธรักษารายใหญ่ของโลก มีพื้นที่สำหรับใช้เป็นแหล่งปลูกโดยรวมราว 200 เฮกตาร์และสามารถผลิตท่อนพันธุ์พุทธรักษาได้มากถึง 43,000-53,000 เหง้าต่อเฮกตาร์ นอกจากใช้เพื่อการขยายพันธุ์แล้วโดยส่วนใหญ่เหง้าพุทธรักษาที่ผลิตได้กว่า 80% จะส่งออกไปจำหน่าย (PROTA, 2011)

2. โรคของพืชรักษาที่เกิดจากไวรัส

เกษตรกรในประเทศที่ผลิตพืชรักษา เช่น ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา อิสราเอล ออสเตรเลีย ต่างประสบปัญหาโรคระบาดที่เกิดจากเชื้อไวรัสติดไปกับเหง้าและต้นพันธุ์ เป็นอุปสรรคในการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ อาการของพืชรักษาที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้แก่ อาการใบด่างประสีเขียว ด่างขีดยาวขนานไปกับเส้นใบร่วมกับแผลเนื้อเยื่อตาย ซึ่งมีรายงานการจำแนกชนิดของไวรัสที่พบเข้าทำลายพืชรักษาแล้ว 5 ชนิด ได้แก่ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) *Cucumber mosaic virus* (CMV) *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) *Canna yellow streak virus* (CaYSV) และ *Tomato aspermy virus* (TAV) (Gray and Grant, 2003) เชื้อ CaYMV มีรายงานครั้งแรกที่ประเทศญี่ปุ่น (Yamashita *et al.*, 1985) ต่อมาพบระบาดในประเทศสหรัฐอเมริกา (Lockhart, 1988) อังกฤษ (Gray and Grant, 2003) ออสเตรเลีย (Borrito *et al.*, 2008) อิตาลี และเนเธอร์แลนด์ (Marino *et al.*, 2007) โดยพบพืชรักษาที่เป็นโรคแสดงอาการต่างเหลือง ต่างประ เป็นแผลเนื้อเยื่อตายบนใบ (Pappu *et al.*, 2008) ด่างขีดบนลำต้น และดอก (Marino *et al.*, 2007) สร้างความเสียหายต่อผลผลิตมากกว่า 60% ของพื้นที่ปลูกในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา การป้องกันกำจัดเชื้อไวรัสชนิดนี้ทำได้โดยการทำลายต้นที่เป็นโรคและใช้ท่อนพันธุ์ปลอดโรคไวรัส ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ด้วยวิธี PCR (Momol *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อ CMV ในพืชรักษาที่รัฐ Ohio ประเทศสหรัฐอเมริกา (Fisher *et al.*, 1997) และมักพบการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิด ได้แก่ CaYMV, CMV และไวรัสรูปท่อนยาวคดที่ไม่ระบุชนิด (Lockhart, 1988) เชื้อ BYMV มีรายงานการเข้าทำลายพืชรักษาและแพร่ระบาดในหลายมณฑลของประเทศจีน (Qin *et al.*, 2010) เป็นไวรัสสาเหตุโรคของพืชรักษาที่สำคัญเช่นเดียวกับ CaYMV ซึ่งในบางครั้งพบการเข้าทำลายร่วมกันของไวรัสทั้งสองชนิด สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจต่อเกษตรกรผู้ปลูกพืชรักษาในประเทศอังกฤษ (Gray and Grant, 2003)

3. ไวรัสสาเหตุโรคของพืชรักษา

3.1 *Cucumber mosaic virus* (CMV)

จัดอยู่ในจีนนัส *Cucumovirus* แฟมิลี *Bromoviridae* อนุภาครูปทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 26-35 นาโนเมตร สารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ

สายเดี่ยวแบบเส้นบวก (single stranded RNA, positive stranded) จีโนมประกอบด้วย 3 โมเลกุลได้แก่ โมเลกุล RNA1 มีขนาด 3,357 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสให้โปรตีน 1a โมเลกุล RNA2 มีขนาด 3,050 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสให้โปรตีน 2a และ 2b โมเลกุล RNA3 มีขนาด 2,216 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสให้โปรตีน 3a (movement protein; MP) และโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein, CP) (Fauquet *et al.*, 2005) บริเวณปลาย 5' ของ RNA มีโครงสร้างเป็นแบบ 5'-M₇G cap ส่วนทางด้านปลาย 3' มีโครงสร้างเป็นแบบ tRNA-like (O'Reilly *et al.*, 1991)

เชื้อ CMV จัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ subgroup I (IA, IB) และ subgroup II โดยแบ่งตามความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยา แผนที่ peptide ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) การวิเคราะห์เบสคู่สมของกรดนิวคลีอิก และความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ (Roossinck *et al.*, 1999) เชื้อ CMV สามารถถ่ายทอดเข้าสู่พืชอาศัยได้โดยวิธีกล มีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะ และถ่ายทอดทางเมล็ดได้ (Doolittle, 1920) Fisher และคณะ (1997) พบไวรัส CMV เข้าทำลายพุทธรักษาในรัฐ Ohio ประเทศสหรัฐอเมริกา จากการสำรวจในแหล่งเพาะปลูกเชิงการค้า ต้นที่เป็นโรคแสดงอาการต่าง ต้นแคระแกร็น ดอกลดรูป ซึ่งทุกตัวอย่างที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าวนี้ ตรวจวิเคราะห์พบสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสชนิด dsRNA ในแฟมิลี *Cucumovirus* และเมื่อนำตัวอย่างที่ได้มาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีด้วยวิธี direct antibody sandwich ELISA พบไวรัส CMV ในทุกตัวอย่างที่แสดงอาการผิดปกติ ส่วนพุทธรักษาที่ไม่แสดงอาการตรวจไม่พบเชื้อด้วยวิธี ELISA

3.2 *Tomato aspermy virus (TAV)*

จัดอยู่ในจีนนัส *Cucumovirus* แฟมิลี *Bromoviridae* อนุภาคเป็นรูปทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอนุภาค 26-35 นาโนเมตร จีโนมมีความยาวประมาณ 8,000 นิวคลีโอไทด์ สารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบเส้นบวก (single stranded RNA, positive stranded) ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ RNA1, RNA2 และ RNA3 (Fauquet *et al.*, 2005) บริเวณปลาย 3' ของ RNA มีโครงสร้างเป็นแบบ tRNA-like (O'Reilly *et al.*, 1991) Blencowe และ Caldwell (1949) รายงานว่าพบเชื้อ TAV ในมะเขือเทศเป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1949 เชื้อ TAV สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกลและมีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะ

3.3 *Canna yellow mottle virus (CaYMV)*

จัดอยู่ในจีนัส *Badnavirus* แฟมิลี *Caulimoviridae* อนุภาคเป็นรูปท่อนสั้น (bacilliform) ขนาด 130 X 30 นาโนเมตร สารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายคู่ (double stranded DNA) ลักษณะเป็นวง จีโนมมีความยาวในช่วง 7,200-8,300 นิวคลีโอไทด์ และโครงสร้างจีโนมประกอบด้วย ORFI, ORFII และ ORFIII ซึ่งแปลรหัสให้โปรตีน 5 ชนิด ได้แก่ CP, aspartic protease, reverse transcriptase (RT), ribonuclease H (RNase H) และ movement protein (MP) (Fauquet *et al.*, 2005)

ไวรัส CaYMV ทำให้พืชรักษาส่งอาการต่างสีที่ชัดเจนไปกับเส้นใบและอาจมีอาการไหม้ร่วมด้วย มีรายงานการพบครั้งแรกโดย Yamashita *et al.*, (1985) ไวรัสนี้ไม่มีรายงานการถ่ายทอดโรคโดยแมลงพาหะ (Lockhart, 1988) การตรวจสอบเชื้อไวรัสสามารถทำได้โดยตรวจดูอนุภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและการใช้วิธี PCR ปัจจุบันยังไม่มีแอนติซีรัมที่สามารถใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส CaYMV (Borroto *et al.*, 2008; Momol *et al.*, 2004)

3.4 *Canna yellow streak virus (CaYSV)*

จัดอยู่ในจีนัส *Potyvirus* แฟมิลี *Potyviridae* อนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคด (long flexuous rod) ความยาว 786 นาโนเมตร จีโนมมีหนึ่งโมเลกุลและเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว แบบเส้นบวก (single stranded RNA, positive stranded) มีขนาด 9,502 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีนชิ้นใหญ่ 1 ชิ้น (polyprotein) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนขนาดเล็ก 10 ชนิด เรียงลำดับจากตำแหน่ง N-terminal ถึง C-terminal ของโปรตีน ได้แก่ P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, Nib และ CP บริเวณปลายสายด้าน 5' และ 3' ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีนจำนวน 153 นิวคลีโอไทด์และ 226 นิวคลีโอไทด์ตามลำดับ (Monger *et al.*, 2007; 2010) เมื่อนำส่วน coat protein gene ซึ่งมีขนาด 864 นิวคลีโอไทด์ มาวิเคราะห์กรดอะมิโนด้วยโปรแกรม DNASTAR พบว่า coat protein ประกอบด้วย 287 กรดอะมิโน มีขนาด 32.416 กิโลดาลตัน

Monger และคณะ (2007) พบเชื้อไวรัสนี้เข้าทำลายพืชรักษาในหลายสายพันธุ์จากประเทศอังกฤษ เบลเยียม เนเธอร์แลนด์ ฝรั่งเศสและอิสราเอล ซึ่งแสดงอาการค่อนข้าง

รุนแรง ได้แก่ ใบขีด (streak) ใบจุดต่างร่วมกับขีด (speckling and streaking) เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA พบว่าตัวอย่างให้ปฏิกิริยาเป็นผลบวกกับแอนติบอดีที่ใช้ตรวจ Potyvirus (generic potyvirus antibody) จึงนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ generic potyvirus primer พบว่าให้แถบดีเอ็นเอขนาด 1,700 คู่เบส ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับบริเวณยีน RNA dependent RNA polymerase, coat protein และ 3'UTR และลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับเชื้อ *Johnson grass mosaic virus* (JGMV) (Acc. No. NP619668) 64% กรดอะมิโน 69% เมื่อนำส่วนของ coat protein gene มาวิเคราะห์ พบว่ามีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อ JGMV 68% จึงจำแนกเป็นไวรัสชนิดใหม่ที่เข้าทำลายพุทธรักษา โดยให้ชื่อไวรัสชนิดนี้ว่า *Canna yellow streak virus* (CaYSV)

3.5 *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)

จัดอยู่ในจีนัส *Potyvirus* แฟมิลี *Potyviridae* มีอนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคด (flexuous rod) ความยาว 650-900 นาโนเมตร สารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบเส้นบวก (single stranded RNA, positive stranded) จีโนมมีขนาดประมาณ 9,700 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีนชิ้นใหญ่ 1 ชิ้น (polyprotein) ส่วนปลายสายด้าน 3' มีโครงสร้างแบบ PolyA tail (Fauquet *et al.*, 2005) แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ subgroup I และ subgroup II ตามความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและนิวคลีโอไทด์ของปลายสายด้าน 3' (Qin *et al.*, 2010) ถ่ายทอดได้โดยวิธีกลและมีเพื่อย่อนเป็นแมลงพาหะ (Bos, 1970)

Qin และคณะ (2010) รายงานการเข้าทำลายพุทธรักษาในประเทศจีนของเชื้อ BYMV โดยการใช้เทคนิค RT-PCR ตรวจสอบพุทธรักษาที่แสดงอาการต่างจากหลายมณฑลของประเทศจีนในระหว่างปี ค.ศ. 2004-2005 เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1,629 คู่เบสที่ได้จากปฏิกิริยา PCR พบว่าเป็นส่วนของยีน Nib, CP และส่วนปลาย 3' ของไวรัส BYMV ซึ่งแปลรหัสได้กรดอะมิโน 273 เรสซิเดวส์ และจัดอยู่ใน subgroup I

Monger และคณะ (2007) พบเชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำลายพุทธรักษาจากประเทศอังกฤษและเบลเยียม โดยพุทธรักษาที่ตรวจพบไวรัสแสดงอาการใบขีด (streak) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่าตัวอย่างให้แถบดีเอ็นเอขนาด 399 คู่เบส ของไวรัส BYMV และพบเข้าทำลายร่วมกับไวรัส CaYSV ด้วย

4. วิธีการตรวจสอบไวรัสในส่วนต่างๆ ของพืช

4.1 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Parakh และคณะ (1995) ศึกษาการตรวจสอบไวรัส *Prune dwarf ilarvirus* (PDV) ที่ติดมากับ germplasm ของพืชจำพวก stone fruit ทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกาและจากการนำเข้า germplasm ของเซอรีและพลัมจำนวน 26 ตัวอย่าง ตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ PDV เปรียบเทียบกับการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าเมื่อใช้เทคนิค ELISA สามารถตรวจพบไวรัสได้ 9 ตัวอย่าง และเทคนิค RT-PCR ตรวจพบ 11 ตัวอย่าง จึงสรุปว่าเทคนิค RT-PCR สามารถใช้ตรวจสอบเชื้อ PDV ที่ติดมากับ germplasm และมีความแม่นยำในการตรวจสอบไวรัสจากเนื้อเยื่อของพืชจำพวก stone fruit มากกว่าการใช้เทคนิค ELISA

Monger และคณะ (2007) ใช้เทคนิค ELISA โดยใช้แอนติซีรั่มทางการค้าในการตรวจสอบเชื้อไวรัส BYMV จากตัวอย่างพุทธรักษาที่แสดงอาการใบด่างซึ่งตรวจพบร่วมกับการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR พบพุทธรักษา 2 ตัวอย่างที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 399 คู่เบสของไวรัส BYMV แต่เมื่อใช้วิธี ELISA ตรวจไม่พบไวรัสดังกล่าว

4.2 การตรวจสอบโดยใช้เทคนิค PCR

Stein และคณะ (1994) ทดลองตรวจสอบเชื้อ BYMV ในหัวพันธุ์เกลดิโอลัสที่ใช้สำหรับเพาะปลูกในเชิงการค้าด้วยวิธี ELISA โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี เปรียบเทียบกับเทคนิค PCR และ Transcription amplification PCR (PCR-TAS) ตรวจไวรัสจากชิ้นส่วนที่เฉือนจากหัวพันธุ์เกลดิโอลัสรวม 7 ตัวอย่าง พบว่าสามารถตรวจสอบไวรัสได้ 2 ตัวอย่างจากวิธี PCR และพบ 5 ตัวอย่าง จากวิธี PCR-TAS แต่ไม่สามารถตรวจพบไวรัสได้ด้วยวิธี ELISA การตรวจสอบไวรัสในส่วนต่างๆ ของพืชโดยเฉพาะส่วนของปลายยอดและเนื้อเยื่อเจริญที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์จึงควรใช้เทคนิค PCR (Lilien-Kipnis *et al.*, 1992) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Parakh และคณะ (1995) ซึ่งได้พัฒนาวิธีการตรวจไวรัส PDV ที่ติดมากับผลไม้จำพวก stone fruit โดยพบว่าวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการตรวจกักกันและรับรอง germplasm และหน่ออ่อนพืชควรใช้เทคนิค RT-PCR เนื่องจากมีความแม่นยำมากกว่าเทคนิค ELISA

Monger และคณะ (2007) ศึกษาการตรวจสอบเชื้อไวรัส 3 ชนิดที่เข้าทำลาย พุทธรักษา ได้แก่ BYMV, CaYMV และ CaYSV โดยใช้เทคนิค RT-PCR ตรวจสอบเชื้อไวรัสจาก ใบพุทธรักษาที่ได้มาจากหลายประเทศ โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด พบว่า ตัวอย่างจากประเทศอังกฤษ เนเธอร์แลนด์และอิสราเอล ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 565 คู่เบส ของ ไวรัส CaYMV ตัวอย่างจากประเทศอังกฤษและเบลเยียม ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 399 คู่เบส ของ ไวรัส BYMV ตัวอย่างจากประเทศอังกฤษ เนเธอร์แลนด์ อิสราเอล ฝรั่งเศสและเบลเยียม ให้แถบ ดีเอ็นเอขนาด 691 คู่เบส ของไวรัส CaYSV

4.3 Probe

Scott และคณะ (1992) ศึกษาการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV) และ *Prune dwarf virus* (PDV) ที่เข้าทำลายพีช (peach) จากมลรัฐแคลิฟอร์เนีย และวอชิงตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้ monoclonal antibody ตรวจสอบเชื้อ PNRSV ด้วย วิธี direct double-antibody sandwich assay และตรวจสอบเชื้อ PDV ด้วยวิธี indirect antigen-coated plate assay เปรียบเทียบกับการใช้ cDNA probe ร่วมกับการใช้เทคนิค dot blot hybridization พบว่าการใช้เทคนิค ELISA สามารถตรวจไวรัส PNRSV และ PDV ได้จำกัด เฉพาะในใบพีชเท่านั้น ส่วนการใช้ cDNA probe สามารถตรวจพบไวรัสทั้งสองชนิดได้ทั้งในใบ กลีบดอกและส่วนต่างๆ ของดอกพีช

Balasingam และคณะ (1988) พัฒนาวิธีการตรวจไวรัสในต้นเนอริน (nerine) โดยการเตรียมสารแขวนลอยไวรัสจากใบเนอรินเพื่อเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยากับ cDNA probe ร่วมกับเทคนิค dot blot hybridization พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ *Nerine virus X* (NeVX) จากสารแขวนลอยไวรัสที่เจือจางได้สูงสุดถึง 1/125 หรือเทียบเท่ากับการตรวจสอบไวรัสในใบ เนอรินที่มีน้ำหนัก 0.3 มิลลิกรัม และสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เจือจางได้สูงสุดถึง 1/25 เมื่อใช้ น้ำคั้นพีชที่เป็นโรคแทนสารแขวนลอยไวรัส โดยสามารถตรวจสอบไวรัส NeVX ได้อย่าง เฉพาะเจาะจงและไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่ใช้ในการทดสอบ

4.4 การตรวจสอบอนุภาคไวรัสในเนื้อเยื่อพืช

Yamashita และคณะ (1985) ศึกษาโครงสร้างจุลภาคของเนื้อเยื่อพุทธรักษาที่แสดง อาการผิดปกติคล้ายโรคที่เกิดจากไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาครูปท่อนสั้น

ขนาด 28x120-130 นาโนเมตร คล้ายไวรัสในแฟมิลี *Badnavirus* อยู่เป็นอนุภาคเดี่ยวหรือจับกันเป็นกลุ่มสะสมอยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ท่ออาหาร เช่นเดียวกับที่พบอนุภาคของ CMV และ TAV อยู่ในไซโทพลาสซึมของพืชอาศัย (Bong *et al.*, 1999) โดยพืชรักษาที่เป็นโรคแสดงอาการเส้นใบเหลืองหรือแผลเนื้อเยื่อตาย ใบด่างประและต้นแคระแกร็น (Yamashita *et al.*, 1985)

Momol และคณะ (2004) ศึกษาสัณฐานของอนุภาคของเชื้อ CaYMV โดยเก็บตัวอย่างพืชรักษาที่แสดงอาการใบด่างประ เป็นแผลเนื้อเยื่อตายที่พบ ในรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา นำมาเตรียมไวรัสบริสุทธิ์และตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาครูปท่อนสั้นคล้ายไวรัสในแฟมิลี *Badnavirus* ซึ่งไม่พบในตัวอย่างพืชรักษาที่ไม่แสดงอาการ

Monger และคณะ (2007) ตรวจสอบไวรัสที่ติดมากับพืชรักษาพันธุ์ Pink Sunburst จากประเทศอังกฤษ โดยเตรียมน้ำคั้นใบพืชรักษาด้วยการบดใน phosphate buffer pH 7.0 และตรวจดูอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสรูปท่อนยาว คดขนาดโดยเฉลี่ย 786 นาโนเมตร ซึ่งเมื่อตรวจด้วยวิธี ELISA พบว่า ตัวอย่างดังกล่าวไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมต่อเชื้อ BYMV แต่เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 691 คู่เบส ของเชื้อ CaYSV

4.5 Microarray

Boonham และคณะ (2002) ทดลองใช้เทคนิค microarray ตรวจสอบเชื้อไวรัสในมันฝรั่ง โดยใช้ต้นยาสูบ *Nicotiana tabacum* เป็นแหล่งของไวรัส *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato virus A* (PVA) และใช้ต้นยาสูบ *N. bentamiana* เป็นแหล่งของไวรัส *Potato virus S* (PVS) ตรวจสอบไวรัสทั้ง 4 ชนิดในเบื้องต้นด้วยเทคนิค sandwich ELISA โดยใช้แอนติซีรัมทางการค้า จากนั้นจึงนำใบยาสูบที่ตรวจพบเชื้อไวรัสมาตรวจสอบด้วย cDNA probe ร่วมกับ microarray วิเคราะห์ผล DNA spot ที่ปรากฏขึ้นด้วย array scanner ที่ 532 นาโนเมตร พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสทุกชนิดที่เข้าทำลายมันฝรั่งได้ในครั้งเดียวอย่างเฉพาะเจาะจง และสามารถตรวจพบการเข้าทำลายร่วมกันของ PVX และ PVY แต่เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายต่อตัวอย่างค่อนข้างสูงและไม่สามารถ re-probe ได้ จึงเป็นข้อจำกัดหนึ่งของการใช้ microarray ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช (Hammond, 2011)

5. การผลิตพืชปลอดไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด (meristem tip)

เนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย (meristem tip) ของพืชประกอบด้วยโครงสร้างที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงและพัฒนา พบอยู่บนตายอด ตาข้างและปลายรากพืช (Fletcher, 2002) มักเป็นส่วนที่พบว่าปลอดเชื้อไวรัส ซึ่งสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตพืชด้วยเทคนิคปลอดเชื้อภายในห้องปฏิบัติการ (Fletcher, 2002) เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญมีการพัฒนาและนำวิธีนี้ไปใช้เป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการผลิตพืชปลอดโรคในพืชหลากหลายชนิด (Walkey, 1980) นอกจากนี้ การใช้สารเคมี (chemotherapy) และการบ่มพืชในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (thermotherapy) ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ ช่วยเพิ่มโอกาสในการกำจัดไวรัสที่ติดมากับพืชและสามารถเพิ่มจำนวนต้นพืชปลอดโรคปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว (Lizarraga *et al.*, 1991)

Sobczykiewicz (1979) ทดลองกำจัดเชื้อ *Strawberry mottle virus* (SM), *Strawberry crinkle virus* (SC) และ *Strawberry latent virus A* (SLA) จากต้นสตรอเบอรี่ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส นาน 5 สัปดาห์ จากนั้นจึงตัดเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดขนาด 0.4-0.8 มิลลิเมตร มาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ พบว่าได้ต้นที่ปลอดโรค 81.6% ซึ่งมีจำนวนมากกว่าต้นที่ได้จากวิธีตัดเนื้อเยื่อเจริญเพียงอย่างเดียวถึง 4 เท่า ในการบ่มพืชเพื่อกำจัดโรคไวรัสโดยทั่วไปนิยมใช้อุณหภูมิ 36-38 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความคงทนของพืชต่ออุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ การบ่มพืชที่อุณหภูมิสูงสลับต่ำเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่สามารถลดความเครียดให้กับพืชได้ (Spiegel, 1996)

การแพร่กระจายของไวรัสเข้าสู่เนื้อเยื่อเจริญมีความผันแปร ขึ้นกับชนิดของเชื้อไวรัสและพืชอาศัย Mori และ Hosokawa (1977) ทดลองตัดเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดที่ขนาด 1.0-3.0 มิลลิเมตร และนำมาเพาะเลี้ยง พบว่าได้ต้นมันฝรั่งปลอดเชื้อไวรัส *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll* (PLRV) แต่ยังคงตรวจพบเชื้อ *Potato virus G* (PVG), *Potato virus S* (PVS) และ *Potato virus X* (PVX) การผลิตพืชปลอดเชื้อไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดจึงต้องคำนึงถึงขนาดของชิ้นเนื้อเยื่อพืชที่ตัดด้วย (Walkey, 1980)

Kumar และคณะ (2009) ทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดขนาด 0.3 มิลลิเมตรของต้นเบญจมาศที่ถูกระบาดด้วย CMV และ *Tobacco mosaic virus* (TMV) เข้าทำลาย จากการ

ตรวจสอบด้วยวิธี PCR ได้ต้นที่ปลอดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดในอัตรา 84% ต้นเบญจมาศเจริญได้ดีบนอาหาร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติม BAP ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัม/ลิตร และ NAA 0.5 มิลลิกรัม/ลิตร

Kromer และ Kukulczanka (1985) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของพุทธรักษา *C.indica* cv. Hercules และ cv. Conrad ในอาหารสังเคราะห์ MS ชนิดแข็งและเหลว ความเข้มข้น 0.5 เท่า ที่อุณหภูมิ 22-24 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 2,500 ลักซ์ โดยเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4-8 สัปดาห์ พบว่าเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของพุทธรักษาสามารถเจริญเติบโตในอาหารเหลวได้ดีกว่าในอาหารแข็ง

Hosoki และ Sasaki (1991) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพุทธรักษา *C.edulis* Ker. ในอาหารสังเคราะห์ MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0, 0.1 และ 1 มิลลิกรัม/ลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน พบว่าอาหารสังเคราะห์ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถชักนำให้พุทธรักษาเกิดยอดและใบได้ดีที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างพืชรักษาที่นำมาตรวจสอบเชื้อไวรัส

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบและหน่ออ่อนของพืชรักษาละพันธุ์แยกตามสีของกลีบดอก โดยเลือกต้นที่แสดงอาการผิดปกติคล้ายโรคที่เกิดจากไวรัส รวมทั้งพืชรักษาที่ไม่แสดงอาการของโรค จากพื้นที่สวนสาธารณะภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน วิทยาเขตกำแพงแสน แปลงปลูกพืชรักษาเชิงพาณิชย์ของเกษตรกร อำเภอบางบัวทอง จังหวัดนนทบุรี จากตลาดจตุจักร กรุงเทพฯ และจากบริษัทเอกชน เก็บตัวอย่างใบพืชรักษาที่ได้ในถุงพลาสติก และแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อไวรัส ปลูกหน่ออ่อนพืชรักษาในแปลงทดลองขนาดเล็กของภาควิชาโรคพืช วิทยาเขตกำแพงแสน เพื่อเพิ่มปริมาณหน่ออ่อนไว้ใช้ตลอดการทดลองและเก็บใบที่เจริญออกมาเพื่อนำไปตรวจสอบเชื้อไวรัส

2. การตรวจหาเชื้อไวรัสในตัวอย่างพืชรักษาด้วยเทคนิค ELISA

ตรวจหาเชื้อไวรัสรวม 3 ชนิด ที่มีรายงานว่าก่อโรคในพืชรักษาและมีการผลิตแอนติบอดีทางการค้า ดังต่อไปนี้

2.1 ตรวจสอบเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (Double antibody sandwich ELISA) โดยใช้แอนติบอดีที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ (Neogen, UK) ตามขั้นตอนที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเติม Coating antibody ที่เจือจางใน coating buffer อัตราส่วน 1: 1,000 (v/v) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST(phosphate buffer saline + Tween 20 0.05%) สามครั้ง จากนั้นเติมน้ำคั้นใบพืชรักษาที่บดใน general extraction buffer อัตราส่วน 1: 10 (w/v) หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยใช้ตัวอย่างที่สั่งซื้อจากต่างประเทศ (BYMV positive, Neogen) เป็นตัวอย่างควบคุม บ่มเพลทในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วล้างด้วย PBST สามครั้ง จากนั้นเติม antibody-enzyme conjugate ที่เจือจางใน conjugate buffer อัตราส่วน 1: 1,000 (v/v) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST สามครั้ง และเติมสารละลาย pNPP(p-nitrophenyl phosphate) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางใน substrate buffer

หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Sunrise™ Microplate Reader (TECAN, Switzerland)

2.2 ตรวจหาลูกศร *Tomato aspermy virus* (TAV) ด้วยเทคนิค DAS-ELISA (Double antibody sandwich ELISA) โดยใช้แอนติบอดีที่สังเคราะห์จากต่างประเทศ (Agdia Co.Ltd., USA) ตามขั้นตอนที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยเติม Capture antibody ที่เจือจางใน coating buffer อัตราส่วน 1: 200 (v/v) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST(phosphate buffer saline + Tween 20 0.05%) สองครั้ง จากนั้นเติมน้ำคั้นใบพุทธรักษาที่บดใน general extraction buffer(GEB3) อัตราส่วน 1: 10 (w/v) หลุมละ 100 ไมโครลิตร โดยใช้ตัวอย่างที่สังเคราะห์จากต่างประเทศ (TAV positive, Agdia) เป็นตัวอย่างควบคุม บ่มเพลทในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน แล้วล้างด้วย PBST เจ็ดครั้ง จากนั้นเติม enzyme conjugate ที่เจือจางใน RUB6 enzyme conjugate diluents buffer อัตราส่วน 1: 200 (v/v) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างด้วย PBST แปดครั้ง และเติมสารละลาย PNP(*p*-nitrophenyl phosphate) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางใน substrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Sunrise™ Microplate Reader

2.3 ตรวจหาลูกศร *Cucumber mosaic virus* (CMV) ด้วยเทคนิค PTA-ELISA (Plate-trap antigen ELISA) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CMV (MAb-CM2) ที่ผลิตได้ภายในประเทศตามวิธีการของมณีรัตน์ และคณะ (2547) โดยเติมน้ำคั้นใบพุทธรักษาที่บดใน coating buffer ที่เติม 0.2% sodium diethyldithiocarbamate ในสัดส่วนบัฟเฟอร์ต่อเนื้อเยื่อพืชเป็น 1: 10 (w/v) ลงใน ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที จากนั้นเติม MAb-CM2 ที่เจือจางใน PBST ที่ผสม 2% skim milk ความเข้มข้นสุดท้ายของแอนติบอดีเท่ากับ 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เติม goat anti-mouse conjugate (GAM) ที่เจือจางใน PBST ที่ผสม 2% skim milk ใน

อัตราส่วน 1: 30,000 (v/v) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 3 นาทีและเติม สารละลาย PNP (*p*-nitrophenyl phosphate) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางใน substrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมงและอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Sunrise™ Microplate Reader

3. การตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค PCR

ใช้เทคนิค PCR ตรวจสอบเชื้อ CaYMV ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอ และเทคนิค RT-PCR ตรวจสอบเชื้อ BYMV, CaYSV, CMV และ TAV ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ

3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากส่วนของใบ ดอก รากและปลายยอดของพุทธรักษาที่ปรับปรุง จากวิธีการของ Colosi and Schaal (1993) โดยนำ CTAB extraction buffer ไปอุ่นที่ 67 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที จากนั้นผสมกับ 0.2 % beta-mercaptoethanol (v/v) ดูดส่วนผสม ปริมาตร 800 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งตัวอย่างพืชให้ได้ 100 มิลลิกรัม แล้วบดในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ย้ายชิ้นส่วนพืชที่บดใส่ในหลอดทดลองที่มี CTAB extraction buffer ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 67 องศาเซลเซียส นาน 25-30 นาที เติมน CIA ปริมาตร 500 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 600 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน isopropanol ปริมาตร 325 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งและล้างตะกอนด้วยการเติม 70 % ethanol ปริมาตร 550 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาทีเท 70 % ethanol ทิ้ง และเติม absolute ethanol ปริมาตร 550 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เท absolute ethanol ทิ้ง และตากตะกอน DNA ให้แห้ง ละลายตะกอน DNA ด้วย 1XTE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

3.2 การสังเคราะห์ยีนของไวรัสด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบ (template) ในการสังเคราะห์ยีนของไวรัส CaYMV โดยใช้ไพรเมอร์ CaYMV-3 Forward primer (5'- GAC TTC CTG GGT GCA ACA AT -3') และไพรเมอร์ CaMYV-4 Reverse primer (5'- TCT GTG CAA TCT TGG CGT AG -3') ซึ่งจะให้ผลผลิตดีเอ็นเอที่มีขนาด 565 คู่เบส (Momol *et al.*, 2004) เตรียมส่วนผสมในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร สังเคราะห์ดีเอ็นเอปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร โดยเติม Nuclease-Free Water 9.5 ไมโครลิตร, 10mM Forward primer (CaYMV-3) 1 ไมโครลิตร, 10mM Reverse primer (CaYMV-4) 1 ไมโครลิตร GoTaq® Green Master Mix (Promega) 12.5 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR โดย preheating ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และทำปฏิกิริยาอีก 35 รอบโดยใช้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ขั้น extension สมบูรณ์ จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ใน 0.5XTBE ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้ UV-transilluminator

3.3 การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) จากส่วนของใบ ดอก รากและปลายยอดของพุทธรักษาตามวิธี CTAB ที่ปรับปรุงจาก Chang *et al.* (1993) โดยนำ CTAB extraction buffer ไปอุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5-10 นาที ดูด CTAB extraction buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมกับ beta mercaptoethanol ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชั่งตัวอย่างพืชให้ได้ 100 มิลลิกรัม แล้วบดในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ย้ายชิ้นส่วนพืชที่บดใส่ในหลอดทดลองที่มี CTAB extraction buffer ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติม Chloroform-Isoamyl alcohol (CHISAM) ปริมาตร 630 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex นาน 1-2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสด้านบนปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 10 M LiCl ปริมาตร ¼ เท่าของสารละลาย กลับหลอดเบาๆ นำไปบ่มที่ -20

องศาเซลเซียส นาน 1-3 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและละลายตะกอนด้วย SSTE ที่อุ่นก่อนใช้ประมาณ 5 นาทีที่ 60 องศาเซลเซียส ปริมาตร 700 ไมโครลิตร อุณหภูมิละลายที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และเติม CHISAM ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนใสด้านบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองใหม่ และเติม absolute ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1-3 ชั่วโมง หรือ -80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เท absolute ethanol ทิ้ง และเติม 70 % ethanol ปริมาตร 1 มิลลิเมตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เท 70 % ethanol ทิ้ง และตากตะกอน RNA ให้แห้ง ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำที่กำจัด RNase (diethylpyrocarbonate-treated distilled water; DEPC-dH₂O) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรวจผลด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจแถบอาร์เอ็นเอโดยใช้ UV-transilluminator

3.4 การสังเคราะห์ยีนของไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR

ทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์ยีนของไวรัสแต่ละชนิดโดยใช้ไพรเมอร์ดังนี้ (ตารางที่ 1) CP F/CP R สังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคบางส่วนของเชื้อ CMV ขนาด 678 คู่เบส (Lin *et al.*, 2004) ไพรเมอร์ BYMV F/BYMV R สังเคราะห์ยีน BYMV ขนาด 399 คู่เบส (Skelton *et al.*, 2007) ไพรเมอร์ CannaSVF1/ CannaSVR2 สังเคราะห์ยีน Nib และโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคบางส่วน of เชื้อ CaYSV ขนาด 691 คู่เบส (Monger *et al.*, 2007) ไพรเมอร์ CannaSVF1 และ 5' UTR สังเคราะห์ยีน Nib ส่วนปลาย 3', โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคและ RNA ส่วนปลาย 3' ของเชื้อ CaYSV และไพรเมอร์ TAV U/TAV D สังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคบางส่วน of เชื้อ TAV ขนาด 660 คู่เบส (Verma *et al.*, 2006)

ในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อโคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์ (pQE expression vector system) สำหรับสังเคราะห์โปรตีนในหลอดทดลอง ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของเชื้อ CaYSV ที่ได้จากการทดลองนี้ และเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction site) *Bam*HI ที่ปลาย 5' ของสายไพรเมอร์ Forward CaYex-F ส่วนสาย

ไพรเมอร์ Reverse CaYex-R ทางด้านปลาย 3' จะเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับตำแหน่งตัดของ เอนไซม์ *HindIII*

เริ่มการสังเคราะห์ cDNA ของเชื้อไวรัสแต่ละชนิดด้วยเทคนิค two-step RT-PCR โดยใช้ชุดสังเคราะห์ RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) เตรียมส่วนผสมในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยเติม DEPC-treated water 2.5 ไมโครลิตร, 10mM Reverse primer 5 ไมโครลิตร และ RNA template 5 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 12.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้ววางบนน้ำแข็งให้เย็น จากนั้นเติม 5X Reaction Buffer 4 ไมโครลิตร, Thermo Scientific RiboLock RNase Inhibitor 0.5 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix 2 ไมโครลิตร และ RevertAid Reverse Transcriptase 1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา

จากนั้นสังเคราะห์ดีเอ็นเอของไวรัสจาก cDNA ที่ได้ ร่วมกับการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิดด้วยเทคนิค PCR เตรียมส่วนผสมในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร โดยเติม Nuclease-Free Water 9.5 ไมโครลิตร, 10mM Forward primer 1 ไมโครลิตร, 10mM Reverse primer 1 ไมโครลิตร GoTaq® Green Master Mix(2X) 12.5 ไมโครลิตรและ cDNA template 1 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร เริ่มการสังเคราะห์โดย preheating ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที และทำปฏิกิริยาอีก 35 รอบโดยใช้ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาขึ้น extension สมบูรณ์ จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1 % agarose gel electrophoresis ใน 0.5XTBE ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นโดยใช้ UV-transilluminator

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ยีนของไวรัส และขนาดของดีเอ็นเอผลผลิต

ไวรัส	ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด(คู่เบส)
BYMV	BYMV F(Forward)	5' GGTGAATGG ACHATG ATGGATGG 3'	399
	BYMV R(Reverse)	5' CAAGCATGGTGTGCATATGCATATCACG 3'	
CaYMV	CaYMV-3(Forward)	5' GACTTCCTGGGTGCAACAAT 3'	565
	CaMYV-4(Reverse)	5' TCTGTGCAATCTTGCGTAG 3'	
CaYSV	CannaSVF1(Forward)	5' GATCTAACGCAACATATTCGAAAG 3'	691
	CannaSVR2(Reverse)	5' GATCATCCATCATTACCCAATAC3'	
	CaYex-F(Forward)	5' GGATCCGCAACTGAAGATGCGGGAGTT3'	864
	CaYex-R(Reverse)	5' AAGCTTAAGCTGCGCACCGCGATA 3'	
	CannaSVF1(Forward)	5' GATCTAACGCAACATATTCGAAAG 3'	1,256
	5'UTR(Reverse)	5' CTACTAGTAAACACGACC 3'	
CMV	CP F(Forward)	5' TTGAGTCGAGTCATGGACAAATC 3'	678
	CP R(Reverse)	5' AACACGGAATCAGACTGGGAG 3'	
TAV	TAV U(Forward)	5'CGGGATCCATGGCCCCAAACGGTACGGGA 3'	660
	TAV D(Reverse)	5'GGAATTCTCACACCGGGAGCGTTGAAGCG 3'	

หมายเหตุ BYMV *Bean yellow mosaic virus*
 CMV *Cucumber mosaic virus*
 CaYMV *Canna yellow mottle virus*
 CaYSV *Canna yellow streak virus*
 TAV *Tomato aspermy virus*

4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และระบุชนิดไวรัส

โคลนดีเอ็นเอผลผลิตที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา PCR และ RT-PCR โดยแยกดีเอ็นเอออกจากเจลแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ก่อนเชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy (Promega, USA) คัดเลือกโคลนของพลาสมิดสายผสมตามวิธี Blue-white colony selection (Sambrook *et al.*, 2001) ทำการตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิดสายผสมที่สอดแทรกด้วยชิ้นส่วนของยีนเป้าหมาย ด้วยการใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด (Gussow and Clackson, 1989) จากนั้นสกัดพลาสมิดสายผสมด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Fermentas) และละลายตะกอนด้วย Elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบขนาดของพลาสมิดด้วย 1% agarose gel electrophoresis

นำพลาสมิดสายผสมที่คัดเลือกได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ใช้โปรแกรม Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) วิเคราะห์ชนิดยีนจากลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของดีเอ็นเอ จากนั้นเปรียบเทียบกับยีนของไวรัสที่มีความคล้ายคลึงกันด้วยการทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป CLC workbench (CLC Bio) ร่วมกับโปรแกรม ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) และสร้าง phylogenetic tree เพื่อศึกษาสายสัมพันธ์กับไวรัสในพุทธรักษาที่พบในต่างประเทศด้วยโปรแกรม MEGA version 5.05

5. การศึกษาพื้นฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ตรวจดูอนุภาคของเชื้อไวรัสในตัวอย่างพุทธรักษาซึ่งแสดงอาการเส้นใบเหลือง ใบด่าง ประ และดอกพุทธรักษาซึ่งแสดงอาการต่างเป็นขีดสีขาว เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Dip preparation โดยหยดน้ำคั้นพืชที่บดใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ลงบนแผ่นพาราฟิล์ม วางกริดบนหยดของน้ำคั้นให้ด้านที่เคลือบสารฟอรัมวาสัมผัสกับน้ำคั้นใบพืชนาน 1-2 นาที คีบ กริดขึ้นมาล้างด้วยการหยดน้ำกลั่นผ่านแผ่นกริด ชับน้ำออก จากนั้นย้อมด้วย 2% uranyl acetate (UA) นาน 1 นาที ชับน้ำส่วนเกินออก ล้างด้วยการหยดน้ำกลั่นที่สะอาดผ่านแผ่นกริดและชับน้ำให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

6. การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CaYSV

6.1 การสังเคราะห์โปรตีน

6.1.1 การเชื่อมต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของเชื้อไวรัส CaYSV เข้ากับพลาสมิด pQE-80L เพื่อสังเคราะห์โปรตีนในสภาพหลอดทดลอง

โคลนยีน CP ขนาด 864 คู่เบสของเชื้อ CaYSV จากพุทธรักษาที่เป็นโรค โดยใช้พลาสมิดพาหะ pGEM-Teasy (Promega, USA) จากนั้นคัดเลือกโคโลนีสีขาวมาสกัดพลาสมิดสายผสมที่มีดีเอ็นเอสอดแทรกอยู่ ตามวิธี Blue-white colony selection และตรวจสอบชิ้นส่วนยีน CaYSV-CP ด้วยเทคนิค PCR (Sambrook *et al.*, 2001) โดยใช้ไพรเมอร์ CaYex-F: 5' GGATCCGCAACTGAAGATGCGGGAGTT 3' และ CaYex-R: 5' AAGCTTAAGCTGCGCACCGCGATA 3' สกัดพลาสมิดสายผสมจากโคลนที่คัดเลือกได้ด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (The GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) แยกชิ้นส่วนยีน CP จาก pGEM-T easy vector โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนยีนด้วย 1% agarose gel electrophoresis แยกดีเอ็นเอออกจากเจลเพื่อนำไปเชื่อมต่อก้าวเข้าสู่พลาสมิดพาหะสำหรับสังเคราะห์โปรตีน pQE-80L expression vector ในตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III การเชื่อมต่อทำโดยผสมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน CP 3 ไมโครลิตร พลาสมิด pQE-80L 50 นาโนกรัม 1x T4 DNA ligase buffer และ T4 DNA ligase 3 Unit ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E.coli* DH5 α ตามขั้นตอนที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต และเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำส่วนผสม 50 ไมโครลิตร มา spread บนจานอาหารแข็ง LB ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ทำการตรวจสอบโคลนที่มีพลาสมิดสายผสมที่สอดแทรกด้วยชิ้นส่วนของยีนเป้าหมาย ด้วยการใช้เทคนิค PCR และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อพลาสมิดพาหะ pQE-80L คือ 5' pQE-forward (5' GTG AGC GGA TAA CAA TTT CAC AC 3') และ 3' pQE-Reverse 5' (CAA CAG GAG TCC AAG CTC AG 3') สกัดพลาสมิดสายผสมจากโคลนที่คัดเลือกด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (The GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit; http://www.cosmobio.co.jp/product/products_FER_20060307/GeneJETplasmidMiniprep

Kit1.pdf) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน และบริเวณที่เชื่อมต่อนั้นส่วนของยีนกับพลาสมิด พาหะ โดยใช้ไพรเมอร์ 5' pQE-forward และ 3' pQE-Reverse

6.1.2 การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV และแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

คัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนยีน CaYCV-CP มาทดสอบการสังเคราะห์โปรตีน 6xHis-CaYSV-CP ของเชื้อ *Canna yellow streak virus* โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร 2xYT ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin อัตรา 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่า ให้ได้ค่า O.D.600 อยู่ระหว่าง 0.5-0.7 เติม IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เพื่อชักนำการสังเคราะห์โปรตีน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า นาน 5 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและเก็บตะกอนเซลล์ ละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer นำไปวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่สังเคราะห์ได้ด้วย SDS-PAGE จากนั้นเพิ่มปริมาณเซลล์ของโคลนที่มีการสังเคราะห์โปรตีนที่คัดเลือกได้โดยเติมสารละลายเซลล์ลงในอาหาร 2xYT ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในอัตราส่วนสารละลายเซลล์ตั้งต้นต่ออาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 1:20 โดยปริมาตร เลี้ยงเชื้อและเก็บตะกอนเซลล์ตามวิธีการข้างต้น เตรียม clear lysate จากตะกอนเซลล์ด้วยวิธี denature condition โดยละลายตะกอนเซลล์ด้วย lysis buffer ผสมให้เข้ากันเบาๆ นาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยวิธี Affinity chromatography ตามขั้นตอนที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต โดยนำส่วนใสมาเติม 50% Ni-NTA agarose (QIAGEN, Germany) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อส่วนใส 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าที่ความเร็วต่ำนาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาใส่ลงใน column ที่มีฝาปิดส่วนปลายไว้ จากนั้นเปิดฝาปล่อยให้ส่วนใสไหลผ่าน column ออกมาล้าง column ด้วย wash buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วจึงชะล้างโปรตีนออกจาก column ด้วย Elution buffer D ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ Elution buffer E ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เก็บส่วนใสที่ไหลผ่าน column ใส่ในหลอดที่เติม 10 mM Tris-base ปริมาตร 20 ไมโครลิตรไว้ก่อนแล้ว วิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่อยู่ในของเหลวส่วนใสด้วย SDS-PAGE และวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford's method (Bradford, 1976)

6.2 การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี

ผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน 6xHis-CaYSV-CP โดยใช้กระต่าย New Zealand white อายุ 2 เดือน เก็บ normal serum ก่อนการฉีดแอนติเจน โดยเจาะเลือดจากหลังใบหู และแยกซีรัมมาเก็บไว้ทดสอบ เตรียมแอนติเจนเพื่อฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกโดยใช้โปรตีน 6xHis-CaYSV-CP บริสุทธิ์ (1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ที่ผ่านการ dialysis ด้วย 1x PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน) ผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) (ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ฉีดเข้าใต้ผิวหนังกระต่าย (subcutaneous injection, SC) บริเวณต้นคอด้านหลัง 3 จุด เว้นระยะห่าง 14 วัน จึงฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งที่สองด้วยแอนติเจนปริมาณเท่าเดิม แต่เตรียมแอนติเจนใน incomplete Freund's adjuvant (IFA) จากนั้น 14 วัน เจาะเลือดจากใบหูและเก็บแอนติซีรัม ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ นาน 9 สัปดาห์ แต่จะครั้งจะแยกแอนติซีรัมจากเม็ดเลือดโดยวางปิกเกอร์ที่ใส่เลือดไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และนำเลือดมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเก็บแอนติซีรัมซึ่งเป็นส่วนใสด้านบนใสในขวดซีรัมโดยเติม NaN_3 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.2% (v/v) เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรีย เก็บขวดบรรจุแอนติซีรัมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. การตรวจวัดค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี

ใช้เทคนิค Indirect ELISA ตรวจสอบค่าความเจือจางสูงสุด (dilution end point) และค่าไตเตอร์ (titer) ของแอนติบอดี (Ramadass *et al.*, 2008) โดยใช้โปรตีน 6xHis-CaYSV-CP ที่ทำให้บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจน ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีที่จะใช้ตรวจสอบไวรัสในใบพืชที่เป็นโรค ใช้น้ำคั้นพืชเป็นโรคเป็นแอนติเจน เจือจางแอนติบอดีแบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 10^{-2} จนถึง 10^{-6} เพื่อใช้เป็น primary antibody และใช้ Alkaline phosphatase conjugated-Goat anti rabbit IgG (SIGMA, USA) เป็น secondary antibody

8. การทดสอบประสิทธิภาพและความจำเพาะของแอนติบอดี

8.1 วิธี Indirect ELISA

ตรวจสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการตรวจหาเชื้อ CaYSV ในน้ำคั้นจากใบและดอกของพุทธรักษาเป็นโรค บดชิ้นส่วนพืชใน coating buffer ที่เติม 0.2% sodium diethyldithiocarbamate ในสัดส่วน พืช 0.1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ใส่ น้ำคั้นที่ได้ลงในหลุมของ ELISA plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มเพลทในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที จากนั้นเติม PAb-CaYSV-CP (primary antibody) จากการเจือจางครั้งที่ 4 เจือจางอัตราส่วน 1: 1,000 ใน PBST ที่ผสม 1% skim milk หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เติม Alkaline phosphatase conjugated-Goat anti rabbit IgG (secondary antibody) ที่เจือจางใน PBST ที่ผสม 1% skim milk อัตราส่วน 1: 10,000 (v/v) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที และเติมสารละลาย PNP (*p*-nitrophenyl phosphate) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางใน substrate buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง SunriseTM Microplate Reader

ตรวจสอบความไวของแอนติบอดีด้วยวิธี Indirect ELISA จากการทำปฏิกิริยากับ น้ำคั้นใบพุทธรักษาที่ติดเชื้อ CaYSV เจือจางน้ำคั้นใบพืชแบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 1: 10 จนถึง 1: 5,120 และการทำปฏิกิริยากับโปรตีน 6xHis-CaYSV-CP บริสุทธิ์ ที่เจือจางแบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 20 µg/ ml จนถึง 0.156 µg/ ml

ตรวจสอบการทำการทำปฏิกิริยข้ามกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นในจีนัสโพทิวไรรัส โดยใช้น้ำคั้นจากใบพืชที่เจือจาง 1:10 เป็นแอนติเจน ตัวอย่างพืชติดเชื้อที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ลำโพงที่มีเชื้อไวรัส *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) ใบข้าวโพดที่มีเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) และใบเสาวรสที่มีเชื้อไวรัส *Passion fruit woodiness virus* (PWV) รวมทั้งใช้น้ำคั้นจากใบพืชปกติเป็นสิ่งควบคุม

8.2 วิธี NCM-ELISA (Nitrocellulose membrane Enzyme-linked immunosorbent assay)

ใช้เทคนิค NCM-ELISA ที่ปรับปรุงจากวิธีการของกิตติศักดิ์ (2544) โดยนำแผ่นเมมเบรนชนิดไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane; NCM) มาตัดตารางขนาด 1x1 เซนติเมตร แช่แผ่นเมมเบรนใน 1XTBS นาน 5 นาที แล้วคืบขึ้นมาวางลงบนกระดาษกรอง เพื่อซับให้หมด เติรวัดอย่างน้ำคั้นที่ได้จากการบดใบพืชปกติและพืชเป็นโรคไวรัสใน Tris-HCl pH 7.5 อัตราส่วน 1: 10 (w/v) ตัวอย่างที่นำมาทดสอบคือใบพืชที่ติดเชื้อโพทไวรัส 4 ชนิดได้แก่ ใบพุทธรักษาที่ติดเชื้อ CaYSV ใบลำโพงที่มีเชื้อ ChiVMV ใบข้าวโพดที่มีเชื้อ SCMV และใบเสาวรสที่มีเชื้อ PWV หยดน้ำคั้นพืชปริมาณ 15 ไมโครลิตรลงตามช่องตารางบนแผ่นเมมเบรน และผึ่งให้แห้ง จากนั้นแช่แผ่นเมมเบรนลงใน 2% skim milk + 8% triton-100 ที่เจือจางใน 1XTBS นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่านาน 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วล้างด้วย TBST 1 ครั้ง เติม PAb-CaYSV-CP จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 ที่เจือจางใน 2% skim milk + 1XTBS อัตราส่วน 1: 1,000 (v/v) นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่านาน 30 นาที จากนั้นล้างด้วย TBST 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที เติมสารละลาย substrate (1XNBT+1XBCIP; ZYMED) ปุ่มในที่มืดจนเกิดสีม่วงเข้มชัดเจน หยุดปฏิกิริยาด้วยการล้างแผ่นเมมเบรนในน้ำกลั่น ตรวจผลการเกิดปฏิกิริยาโดยดูตะกอนสีม่วงที่เกิดขึ้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ

ตรวจสอบการทำปฏิกิริยาของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ด้วยเทคนิค NCM-ELISA โดยใช้ส่วนของใบ ดอก ก้านใบ ก้านดอกของพุทธรักษาที่มีเชื้อไวรัส CaYSV และเจือจางน้ำคั้นใบพุทธรักษาแบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 1: 10 ถึง 1: 1,280 เปรียบเทียบกับโปรตีน 6xHis-CaYSV บริสุทธิ์ที่เจือจางแบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 20 µg/ ml จนถึง 0.156 µg/ ml

9. ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัสในส่วนต่าง ๆ ของต้นและเหง้าพุทธรักษา

9.1 การประเมินความแม่นยำของเทคนิค PCR และ RT-PCR

ใช้ตัวอย่างพุทธรักษาที่ตรวจพบไวรัสด้วยเทคนิค PCR เป็นสิ่งทดลอง แยกเป็นส่วนปลายยอดขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตรจำนวน 20 ตัวอย่าง และปลายยอดขนาดความยาว 1 เซนติเมตรจำนวน 20 ตัวอย่าง ดอก จำนวน 14 ตัวอย่าง และราก จำนวน 7 ตัวอย่าง และใช้

ชิ้นส่วนพืชจากต้นที่ตรวจไม่พบเชื้อไวรัสส่วนละ 1 ตัวอย่างเป็นสิ่งควบคุมแบบ negative control สกัดกรดนิวคลีอิกจากตัวอย่างดังกล่าวนำมาใช้เป็นต้นแบบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ CaYMV หรือ RT-PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ คำนวณอัตราของการตรวจพบเชื้อในตัวอย่างจากต้นที่เป็นโรคและไม่เป็นโรค เพื่อประเมินความแม่นยำของวิธีการ

9.2 ทดสอบความไวของเทคนิค PCR และ RT-PCR ในการตรวจสอบไวรัสจากใบพืช

เชื้อจากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพุทธรักษาที่ตรวจพบเชื้อไวรัส CaYMV แบบ 10-fold dilution เริ่มจาก 10^{-1} จนถึง 10^{-7} และเชื้อจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบพุทธรักษาที่ตรวจพบเชื้อไวรัส CaYSV จาก 10^{-1} จนถึง 10^{-5} แล้วนำมาใช้เป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR และ RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์และวิธีการตามที่ระบุในข้อ 3 เพื่อทดสอบความไวของวิธีการตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นในการศึกษาครั้งนี้

10. การเพาะเลี้ยงปลายยอดเจริญของพุทธรักษา

นำหน่ออ่อนของต้นพุทธรักษาที่ตรวจพบโรคไวรัสมาปลูกเพิ่มปริมาณต้นในแปลงทดลอง เป็นสายพันธุ์ที่รับมาจากบริษัท และสายพันธุ์ที่มีการเพาะปลูกอยู่ในประเทศไทย รวม 5 พันธุ์ เตรียมตัวอย่างหน่ออ่อนสำหรับการฟอกฆ่าเชื้อ ตามจำนวนที่ปลูกเลี้ยงได้ของแต่ละพันธุ์ ใช้หน่อขนาดความยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร นำมาตัดใบ รากและกาบใบชั้นนอกออก แล้วล้างให้สะอาดในน้ำไหล จากนั้นนำมาฟอกฆ่าเชื้อโดยแช่ในสารละลายคลอรีนความเข้มข้น 20% และ 5% นาน 15 นาทีและ 5 นาทีตามลำดับ แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้ออีก 3 ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอดขนาดประมาณ 0.2-0.5 และ 0.5-1.0 มิลลิเมตร โดยทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอในสภาพปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่ง (0.5xMS) และเติม BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร นำไปวางไว้ในเครื่องเขย่าสารละลายและให้แสงที่มีความเข้มแสง 2,000 ลักซ์ ช่วงแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส บันทึกการเจริญเติบโตและคำนวณหาอัตราปลอดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากการฟอกฆ่าเชื้อ จากนั้นเปลี่ยนอาหารทุกๆ 4-6 สัปดาห์ จนมีใบจริงจึงนำไปตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR

10.1 วิธีตรวจสอบไวรัสจากต้นอ่อนพุทธรักษาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดเจริญ

ตัดชิ้นส่วนของใบพุทธรักษาที่พัฒนาหลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดเจริญเป็นเวลา 2 เดือนในห้องปฏิบัติการที่ภาควิชาโรคพืช กำแพงแสน และใบจากต้นอ่อนอายุประมาณ 3 เดือนที่ได้รับความอนุเคราะห์เพิ่มเติมจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของดร. นงนพพร คุณากร ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยทางวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ใช้ตัวอย่างพืชน้ำหนัก 0.1 กรัม นำมาสกัดกรดนิวคลีอิกและใช้เป็นต้นแบบสำหรับทำปฏิกิริยา PCR หรือ RT-PCR เพื่อตรวจสอบการปลดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดในต้นอ่อนที่เพาะเลี้ยงได้ โดยใช้ไพรเมอร์และวิธีการตามที่ระบุในข้อ 3 คำนวณอัตราการปลดโรคของต้นพุทธรักษาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดเจริญจากต้นที่เป็นโรค โดยคิดเป็นอัตราการปลดโรค 100% เมื่อตรวจไม่พบเชื้อไวรัสจากต้นอ่อนทุกต้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

การสำรวจพุทธรักษาที่เป็นโรคและลักษณะอาการ

ผลการสำรวจพุทธรักษาที่เป็นโรคจากพื้นที่สวนสาธารณะภายในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จำนวน 2 ครั้ง สำรวจครั้งที่ 1 เดือนสิงหาคม พ.ศ.2552 จำนวน 6 ตัวอย่าง สำรวจครั้งที่ 2 เดือนตุลาคม พ.ศ.2552 โดยเลือกเก็บตัวอย่างพุทธรักษาตามสีของกลีบดอกได้ 15 ชนิด (ภาพที่ 1) ชนิดละ 2 ตัวอย่าง รวมตัวอย่างพุทธรักษาจากการสำรวจทั้ง 2 ครั้ง 36 ตัวอย่าง อาการผิดปกติคล้ายโรคไวรัสที่พบ ได้แก่ อาการเส้นใบเหลือง ใบด่างประ เส้นใบด่างมีแถบแผลเนื้อเยื่อตาย เนื้อใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ต้นแคระแกร็น กลีบดอกด่าง (ภาพที่ 2)

ผลการสำรวจโรคของพุทธรักษาที่ปลูกอยู่ในวิทยาเขตกำแพงแสน ส่วนใหญ่ไม่พบใบที่แสดงอาการผิดปกติ จึงสุ่มเก็บตัวอย่างใบที่ไม่แสดงอาการมา 8 ตัวอย่าง และพบใบที่แสดงอาการใบด่างจุดเหลือง 2 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3) สำหรับตัวอย่างพุทธรักษาที่เลือกซื้อมาจากตลาดจตุจักร มีจำนวนรวม 12 ตัวอย่าง พบต้นที่แสดงอาการใบด่างจุดเหลืองเพียง 1 ตัวอย่าง (ภาพที่ 3) และสุ่มเลือกอีก 11 ตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการ มาตรวจสอบไวรัส ตัวอย่างพุทธรักษาที่สำรวจและเก็บมาจากแปลงปลูกของเกษตรกร จ.นนทบุรี แบ่งตามสีดอกได้ 11 พันธุ์ พบว่ามีเพียง 2 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง และเส้นใบด่าง (ภาพที่ 3) จึงสุ่มเลือกต้นที่ไม่แสดงอาการมาอีก 20 ตัวอย่าง รวมเป็น 22 ตัวอย่าง เฝ้าพุทธรักษาที่รับจากบริษัทเอกชนมาตรวจสอบไวรัส มีจำนวน 8 ตัวอย่าง นำมาปลูกเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นและออกดอก พบว่า 6 ตัวอย่าง แสดงอาการรุนแรง เช่น เส้นใบเหลือง ใบด่างประ ใบด่างมีแถบแผลเนื้อเยื่อตายไปตามเส้นใบ กลีบดอกด่าง ดอกมีขนาดเล็กและมีรูปทรงผิดปกติ (ภาพที่ 4) และมี 2 ตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการ รวมตัวอย่างพุทธรักษาจาก 5 แหล่งปลูกทั้งหมด 88 ตัวอย่าง ซึ่งพุทธรักษาที่เก็บจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และจากบริษัทเอกชน แสดงอาการผิดปกติเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับพุทธรักษาจากวิทยาเขตกำแพงแสน หรือ แปลงปลูกของเกษตรกร จ.นนทบุรี หรือจากตลาดจตุจักร ลักษณะอาการแบบต่าง ๆ ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ (เมื่อแบ่งตามสีดอก) หรือแหล่งที่ปลูก เช่นเดียวกับที่พบพุทธรักษาหลายสายพันธุ์ในรัฐวอชิงตัน ที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง และใบด่างประ (Pappu *et al.*, 2008) มีอาการคล้ายกับที่พบในพุทธรักษาจากรัฐฟลอริดา (Momol *et al.*, 2004)

เหลืองเข้มกระแดง



เหลืองกระแดง



เหลืองโคนแดง



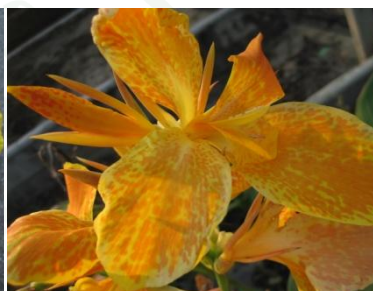
เหลืองเส้นส้ม



เหลืองอ่อนกระแดง



เหลืองกระส้ม



เหลืองอ่อน



เหลืองโคนแดง



เหลืองกระแดงปนกลีบแดง



แดง



แดงเส้นเหลือง



แดงขอบเหลือง



ภาพที่ 1 ลักษณะและสีของดอกพุทธรักษาจากต้นที่เก็บมาศึกษาทดลอง โดยแบ่งแยกสายพันธุ์ตามสีของกลีบดอก

แดงกระเหลือง



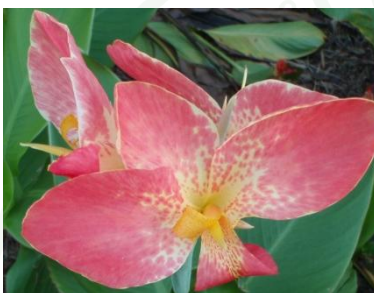
แดงโคนขาว



ขาว



ชมพูกระเหลือง



ชมพูอ่อน



ชมพูอมส้ม



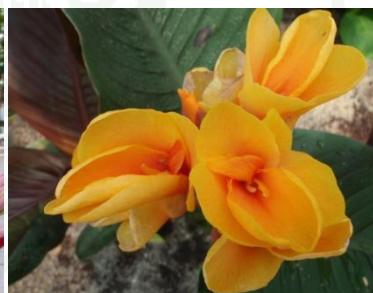
ชมพู



ชมพูเข้ม



ส้มอมเหลือง



ส้มเส้นเหลือง



ส้มอ่อน



ส้มสด

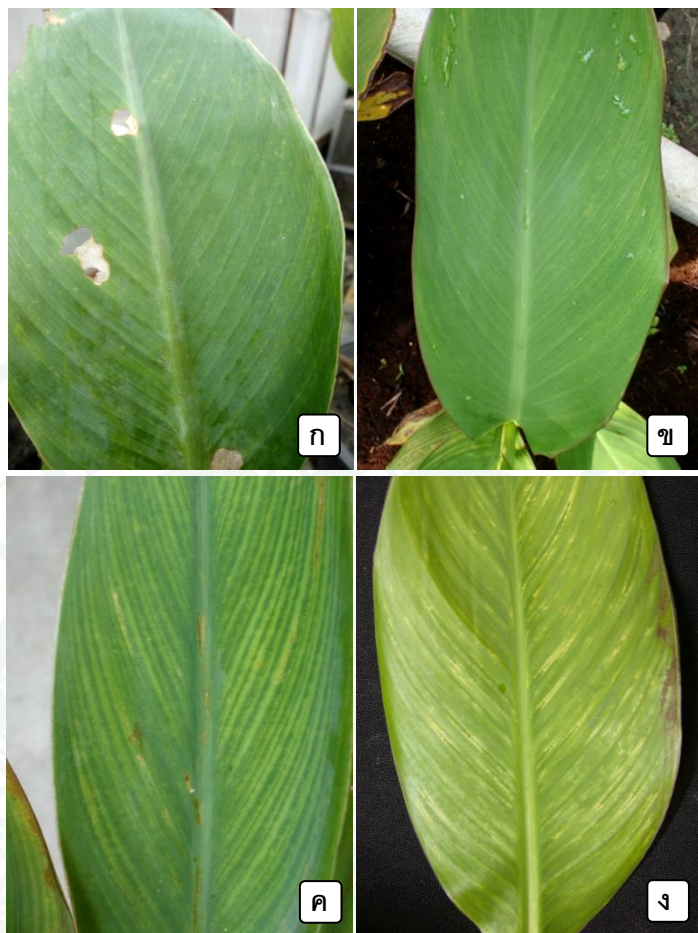


ภาพที่ 1 (ต่อ)



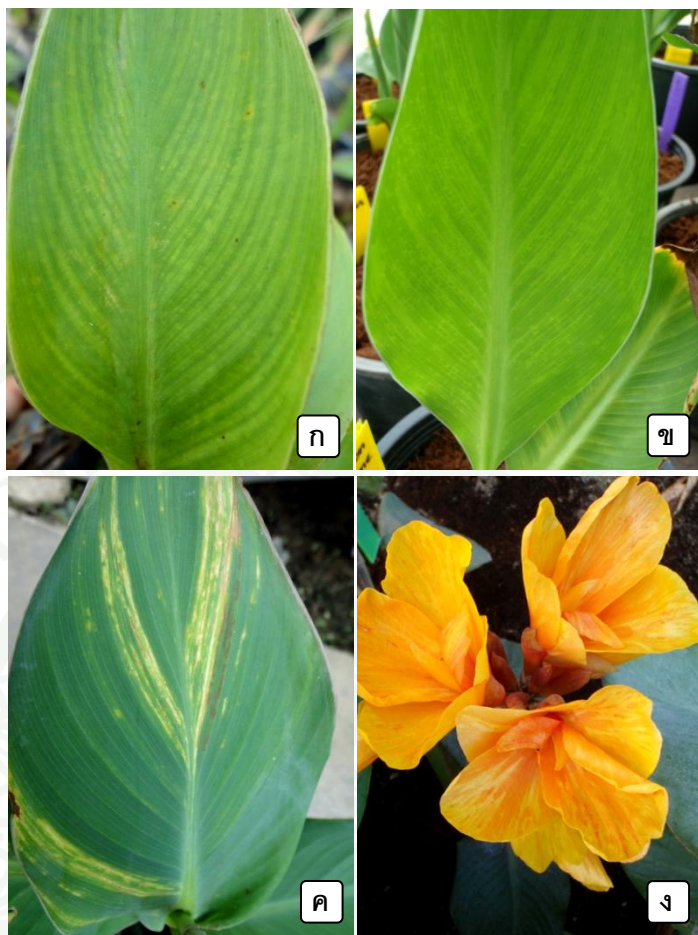
ภาพที่ 2 ลักษณะอาการผิดปกติคล้ายโรคไวรัส ที่พบในพุทธรักษาภายในวิทยาเขตบางเขน

- (ก) เส้นใบเหลือง พันธุ์ดอกสีเหลือง
- (ข) เส้นใบเหลืองและมีแผลเนื้อเยื่อตาย พันธุ์ดอกสีเหลือง
- (ค) ใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน พันธุ์ดอกสีชมพู
- (ง) ใบด่างจุดเหลือง พันธุ์ดอกสีแดงกระเหลือง
- (จ) อาการต้นแคระแกร็น
- (ฉ) อาการกลีบดอกด่าง



ภาพที่ 3 ลักษณะอาการผิดปกติคล้ายโรคไวรัส ที่พบในพุทธรักษาภายในวิทยาเขตกำแพงแสน
ตลาด จตุจักร และแปลงปลูก จ.นนทบุรี

- (ก) ใบต่างจุดเหลือง พันธุ์ดอกสีชมพู (วิทยาเขตกำแพงแสน)
- (ข) ใบต่างจุดเหลือง พันธุ์ดอกสีส้มเส้นเหลือง (ตลาดจตุจักร)
- (ค) เส้นใบเหลือง พันธุ์ดอกสีเหลืองกระแดงปนกลีบแดง (จ.นนทบุรี)
- (ง) เส้นใบต่าง พันธุ์ดอกสีเหลืองกระแดง (จ.นนทบุรี)



ภาพที่ 4 ลักษณะอาการผิดปกติคล้ายโรคไวรัส ที่พบในพุทธรักษาจากบริษัทเอกชน

- (ก) เส้นใบเหลือง พันธุ์ดอกสีเหลืองอ่อน
- (ข) เนื้อใบด่างประ พันธุ์ดอกสีเหลืองอ่อน
- (ค) เส้นใบเหลืองและมีแผลเนื้อเยื่อตาย พันธุ์ดอกสีแดงกระเหลือง
- (ง) ดอกต่างเป็นขีดสีขาว ดอกเล็กลง กลีบดอกเสียรูปทรง

การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA

ผลการตรวจสอบไวรัสจากต้นพุทธรักษา ทั้ง 88 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้แอนติบอดีต่อ CMV, TAV และ BYMV ไม่พบเชื้อทั้งสามชนิดนี้ในทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 2-6) โดยพบว่าตัวอย่างพุทธรักษาที่นำมาตรวจสอบ ให้ค่า ELISA ต่ำสุด – สูงสุดอยู่ในช่วง 0.071-0.084, 0.102-0.149 และ 0.071-0.107 สำหรับปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อ CMV, TAV, และ BYMV ตามลำดับ ในขณะที่ตัวอย่างควบคุมที่เป็น positive control มีค่า ELISA 1.368, 2.237 และ 1.786 ตามลำดับ และ negative control มีค่า ELISA 0.08, 0.107 และ 0.084 ตามลำดับ ดังนั้น เมื่อค่า ELISA ของตัวอย่างพุทธรักษาที่ได้มาจากแหล่งปลูกต่าง ๆ มีค่าน้อยกว่าสองเท่าของค่า ELISA ของตัวอย่างที่เป็น negative control จึงถือว่า ตรวจไม่พบไวรัส

Fisher และคณะ (1997) ตรวจวิเคราะห์พุทธรักษาที่แสดงอาการต่าง ต้นแคระแกร็น ดอกลดรูป จากแหล่งเพาะปลูกเชิงการค้าในรัฐ Ohio ประเทศสหรัฐอเมริกา ด้วยวิธี direct antibody sandwich ELISA พบว่าตัวอย่างทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส CMV

ในประเทศออสเตรเลีย Borroto *et al.*, (2008) ตรวจสอบใบพุทธรักษา *Canna indica* ที่ปลูกไว้ในแหล่งสะสมพันธุ์ ซึ่งแสดงอาการผิดปกติคล้ายโรคที่เกิดจากไวรัส ด้วยเทคนิค DAS-ELISA โดยใช้แอนติบอดีทางการค้าต่อเชื้อ TAV, BYMV และ CMV แต่ก็ไม่พบเชื้อ

ตารางที่ 2 ตัวอย่างพืชรักษาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และผลการตรวจสอบโรคไวรัส

รหัสตัวอย่าง	สีกลีบดอก	อาการที่พบ	ELISA			PCR	RT-PCR			
			BYMV	CMV	TAV	CaYMV	CaYSV	BYMV	CMV	TAV
AB01	เหลืองเข้มกระแดง	เส้นใบเหลือง	-	-	-	+	-	-	-	-
AB02	ชมพูอมส้ม	เส้นใบเหลือง	-	-	-	-	-	-	-	-
AB03	ส้มเส้นเหลือง	เส้นใบเหลือง	-	-	-	+	-	-	-	-
AB04	แดงเส้นเหลือง	เส้นใบเหลือง	-	-	-	-	-	-	-	-
AB05	แดงโคนขาว	เส้นใบเหลือง	-	-	-	-	-	-	-	-
AB06	แดงกระเหลือง	เส้นใบเหลือง ใบต่างจุดเหลือง ต้นแคระแกร็น	-	-	-	+	-	-	-	-
BK01	เหลืองเข้มกระแดง	เส้นใบเหลือง	-	-	-	+	-	-	-	-
BK02	เหลืองกระแดง	เส้นใบต่างมีแถบแผลเนื้อเยื่อตาย ต้นแคระแกร็น	-	-	-	+	-	-	-	-
BK03	ส้มเส้นเหลือง	เส้นใบเหลือง มีแผลเนื้อเยื่อตาย กลีบดอกต่าง	-	-	-	+	-	-	-	-
BK04	แดงเส้นเหลือง	เส้นใบเหลือง	-	-	-	-	-	-	-	-
BK05	เหลืองอ่อนกระแดง	เส้นใบเหลือง	-	-	-	+	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

รหัสตัวอย่าง	สีกลีบดอก	อาการที่พบ	ELISA			PCR	RT-PCR			
			BYMV	CMV	TAV	CaYMV	CaYSV	BYMV	CMV	TAV
BK06	แดงโคนขาว	เส้นใบเหลือง มีแผลเนื้อเยื่อตายตามเส้นใบ	-	-	-	+	-	-	-	-
BK07	ชมพูอมส้ม	เส้นใบเหลือง เนื้อใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน	-	-	-	+	-	-	-	-
BK08	ขาว	เส้นใบเหลือง อาการไม่ชัดเจน	-	-	-	+	-	-	-	-
BK09	ชมพูอ่อน	เส้นใบเหลือง ด่างจุดเหลือง	-	-	-	+	-	-	-	-
BK10	ส้มอมชมพู	เส้นใบเหลือง มีแผลเนื้อเยื่อตาย ใบด่างรุนแรง	-	-	-	+	-	-	-	-
BK11	ส้มอ่อน	เส้นใบเหลือง เนื้อใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน	-	-	-	+	-	-	-	-
BK12	ส้มสด	เส้นใบเหลือง มีแผลเนื้อเยื่อตายรุนแรง	-	-	-	+	-	-	-	-
BK13	ชมพูกระเหลือง	เส้นใบเหลือง	-	-	-	+	-	-	-	-
BK14	แดงขอบเหลือง	เส้นใบเหลือง	-	-	-	+	-	-	-	-
BK15	(ไม่มีดอก)	ใบด่างจุดเหลือง	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ (-) ตรวจไม่พบไวรัส; (+) ตรวจพบไวรัส; BYMV *Bean yellow mosaic virus*; CMV = *Cucumber mosaic virus*; TAV = *Tomato aspermy virus*; CaYMV = *Canna yellow mottle virus*; CaYSV = *Canna yellow streak virus*

ตารางที่ 3 ตัวอย่างพืชรักษาจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และผลการตรวจสอบโรคไวรัส

รหัสตัวอย่าง	สีกลีบดอก	อาการที่พบ	ELISA			PCR		RT-PCR		
			BYMV	CMV	TAV	CaYMV	CaYSV	BYMV	CMV	TAV
AK01	แดงเข้ม	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
AK02	ชมพู	ใบด่างจุดเหลือง	-	-	-	-	+	-	-	-
AK03	แดงขอบเหลือง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-
AK04	แดงเส้นเหลือง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
AK05	ชมพูอ่อน	ใบด่างจุดเหลือง	-	-	-	-	+	-	-	-
AK06	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
AK07	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
AK08	แดง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
AK09	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
AK10	แดงกระเหลือง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-

หมายเหตุ (-) ตรวจไม่พบไวรัส; (+) ตรวจพบไวรัส; BYMV *Bean yellow mosaic virus*; CMV = *Cucumber mosaic virus*; TAV = *Tomato aspermy virus*; CaYMV = *Canna yellow mottle virus*; CaYSV = *Canna yellow streak virus*

ตารางที่ 4 ตัวอย่างพืชรักษาจากตลาดนัดจตุจักร จ.กรุงเทพฯ และผลการตรวจสอบโรคไวรัส

รหัสตัวอย่าง	สีกลีบดอก	อาการที่พบ	ELISA			PCR		RT-PCR		
			BYMV	CMV	TAV	CaYMV	CaYSV	BYMV	CMV	TAV
JJ01	แดง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-
JJ02	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
JJ03	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
JJ04	ส้มอมเหลือง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	+	-	-	-
JJ05	ส้มเส้นเหลือง	ใบต่างจุดเหลือง	-	-	-	-	-	-	-	-
JJ06	ส้มเส้นเหลือง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
JJ07	เหลืองกระส้ม	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	+	-	-	-
JJ08	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
JJ09	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
JJ10	ชมพูกระเหลือง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-
JJ11	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
JJ12	เหลืองเส้นส้ม	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-

หมายเหตุ (-) ตรวจไม่พบไวรัส; (+) ตรวจพบไวรัส; BYMV *Bean yellow mosaic virus*; CMV = *Cucumber mosaic virus*; TAV = *Tomato aspermy virus*; CaYMV = *Canna yellow mottle virus*; CaYSV = *Canna yellow streak virus*

ตารางที่ 5 ตัวอย่างพืชรักษากจากแปลงปลูกเชิงพาณิชย์ จ.นนทบุรี และผลการตรวจสอบโรคไวรัส

รหัสตัวอย่าง	สีกลีบดอก	อาการที่พบ	ELISA			PCR		RT-PCR		
			BYMV	CMV	TAV	CaYMV	CaYSV	BYMV	CMV	TAV
NB01	ชมพูอ่อน	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-
NB02	ขาว	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-
NB03	เหลืองกระแดงปนกลีบแดง	เส้นใบเหลือง	-	-	-	-	-	-	-	-
NB04	ส้มสด	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
NB05	เหลืองกระแดง	เส้นใบด่าง	-	-	-	-	-	-	-	-
NB06	เหลืองโคนแดง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-
NB07	ชมพูกระเหลือง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
NB08	เหลืองเส้นส้ม	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-
NB09	เหลืองโคนแดง	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-
NB10	ชมพูอมส้ม	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	-	-	-	-
NB11	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ (-) ตรวจไม่พบไวรัส; (+) ตรวจพบไวรัส; BYMV *Bean yellow mosaic virus*; CMV = *Cucumber mosaic virus*; TAV = *Tomato aspermy virus*; CaYMV = *Canna yellow mottle virus*; CaYSV = *Canna yellow streak virus*

ตารางที่ 6 ตัวอย่างพืชรักษาจากบริษัทเอกชน และผลการตรวจสอบโรคไวรัส

รหัสตัวอย่าง	สีกลีบดอก	อาการที่พบ	ELISA			PCR	RT-PCR			
			BYMV	CMV	TAV	CaYMV	CaYSV	CaYSV	CMV	TAV
PHC-368	แดงกระเหลือง	เส้นใบด่างมีแถบแผลเนื้อเยื่อตาย	-	-	-	+	+	-	-	-
PHC-478	เหลืองอ่อน	เส้นใบเหลือง ใบด่างประ	-	-	-	+	+	-	-	-
PHC-51	ส้มอ่อน	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	+	+	-	-	-
PHC-BD	(ไม่มีดอก)	ไม่แสดงอาการ	-	-	-	-	+	-	-	-
PHC-CS	ส้มอมเหลือง	กลีบดอกด่าง ดอกเล็ก ใบด่างประ	-	-	-	+	+	-	-	-
PHC-MS	ขาว	ใบด่างประ	-	-	-	+	+	-	-	-
PHC-OC	ส้มสด	ใบด่างประ เส้นใบด่างมีแถบแผลเนื้อเยื่อตาย	-	-	-	-	+	-	-	-
PHC-RS	ชมพูเข้ม	ใบด่างประ	-	-	-	-	+	-	-	-

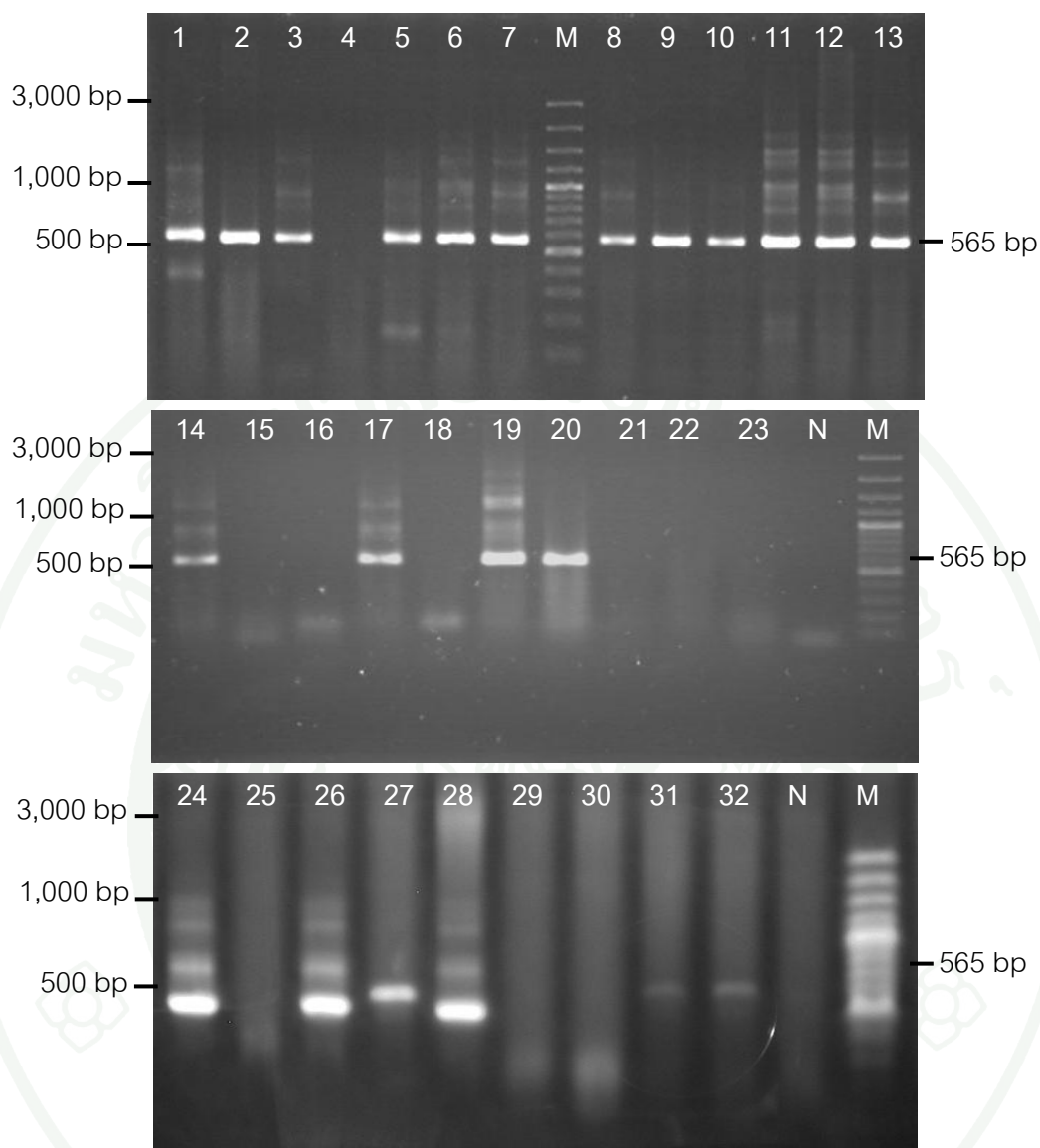
หมายเหตุ (-) ตรวจไม่พบไวรัส; (+) ตรวจพบไวรัส; BYMV *Bean yellow mosaic virus*; CMV = *Cucumber mosaic virus*; TAV = *Tomato aspermy virus*; CaYMV = *Canna yellow mottle virus*; CaYSV = *Canna yellow streak virus*

การสังเคราะห์ยีนของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค PCR และ RT-PCR

ด้วยเทคนิค PCR และไพรเมอร์ CaYMV-3 และ CaYMV-4 ที่นำมาใช้ในการศึกษาค้นคว้า พบว่าตัวอย่างพุทธรักษาที่มีเชื้อ CaYMV จะให้แถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 565 คู่เบสที่เป็นส่วนหนึ่งของยีน ORFIII (ภาพที่ 5-6) และได้ตรวจพบเชื้อนี้ในตัวอย่างพุทธรักษาจากทุกแหล่งที่นำมาศึกษา อัตราสูงสุดที่พบ คือ 88.89% จากวิทยาเขตบางเขน รองลงมาคือ 62.5% จากบริษัทเอกชน 45.45% จากแปลงปลูกของเกษตรกร 25% จากตลาดจตุจักร และต่ำสุดที่ 20% เป็นตัวอย่างจากวิทยาเขตกำแพงแสน โดยคำนวณอัตราการตรวจพบเชื้อได้เท่ากับ 59.1% ของตัวอย่างทั้งหมด 88 ตัวอย่างที่นำมาศึกษา (ตารางที่ 7)

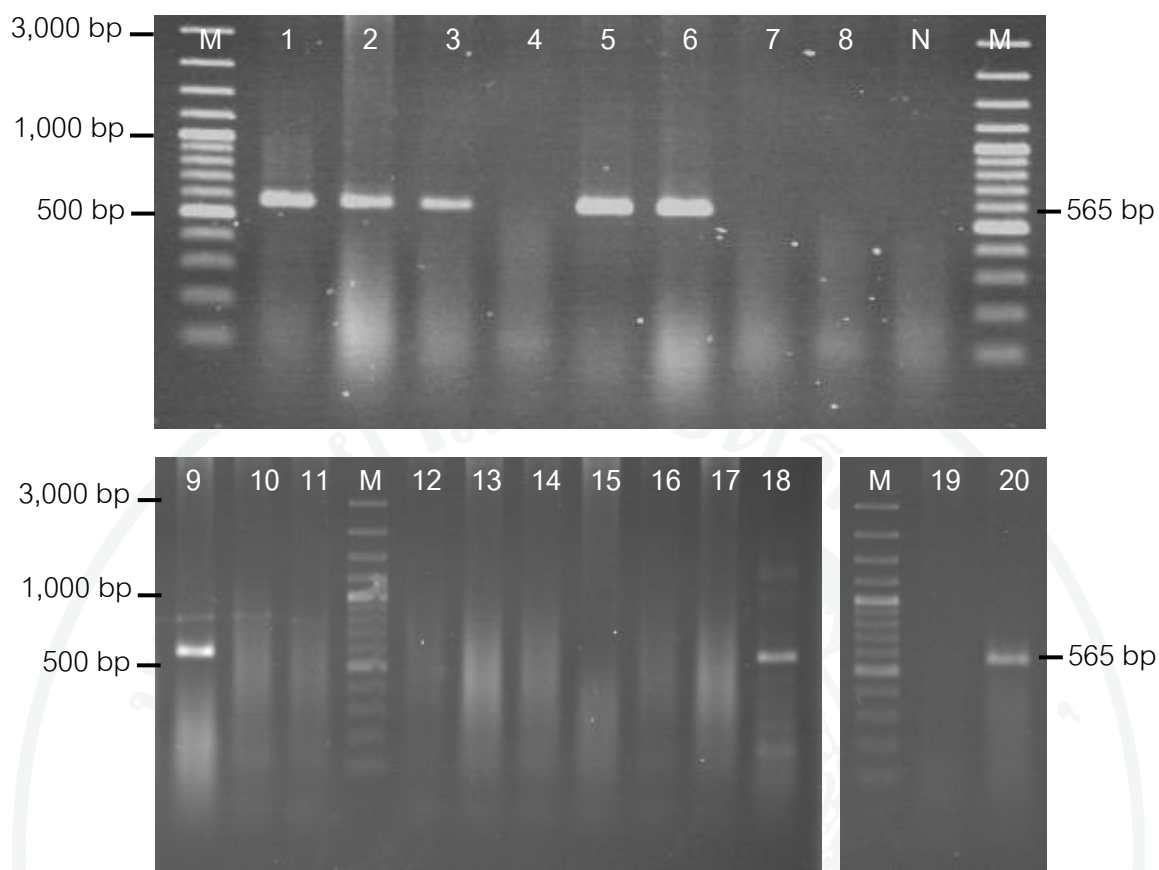
พุทธรักษาที่ตรวจพบเชื้อไวรัส CaYMV แสดงลักษณะผิดปกติอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างรวมกันของอาการใบด่างจุดเหลือง ใบด่างขีดเหลือง ด่างเป็นขีดมีแผลเนื้อเยื่อตาย เนื้อใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน เส้นใบด่าง ดอกด่าง ดอกเล็กและเสียรูปทรง ต้นแคระแกร็น รวมทั้งตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการของโรค ลักษณะอาการแบบต่าง ๆ ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ (เมื่อแบ่งตามสีดอก) หรือแหล่งที่ปลูก

ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัส 4 ชนิดที่มีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอ ด้วยเทคนิค RT-PCR ไม่พบว่ามีตัวอย่างใดที่ติดเชื้อ BYMV, CMV หรือ TAV ในขณะที่สามารถตรวจพบเชื้อ CaYSV ได้จากหลายตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าปฏิกิริยา RT-PCR ที่ใช้ไพรเมอร์ CannaSVF1 และ CannaSVF2 และใช้อาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบพุทธรักษาเป็นต้นแบบ จะให้ผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 691 คู่เบสของยีนโปรตีนห่อหุ้มบางส่วนของเชื้อ CaYSV (ภาพที่ 7) ผลการศึกษพบว่าตัวอย่างจากแหล่งปลูกในประเทศไทย ซึ่งได้แก่ พุทธรักษาจากวิทยาเขตกำแพงแสน 10 ตัวอย่าง และตลาดนัดจตุจักร 12 ตัวอย่าง มีอัตราพบเชื้อ CaYSV ค่อนข้างต่ำ คือ 20% และ 16.67% ตามลำดับ ในขณะที่พบว่าพุทธรักษา 8 ตัวอย่างจากบริษัทเอกชน ติดเชื้อ CaYSV ทั้งหมด สำหรับตัวอย่างจากวิทยาเขตบางเขน และแปลงเกษตรกร รวม 58 ตัวอย่างตรวจไม่พบเชื้อ CaYSV จึงคำนวณเป็นอัตราการพบเชื้อ CaYSV เท่ากับ 13.63% ของตัวอย่างทั้งหมด 88 ตัวอย่างที่นำมาศึกษา (ตารางที่ 7) โดยพุทธรักษาที่ตรวจพบเชื้อไวรัส CaYSV แสดงอาการเนื้อใบด่างจุดเหลือง และไม่แสดงอาการของโรค



ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอขนาด 565 คู่เบสที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ Canna yellow mottle virus (CaYMV) ในตัวอย่างใบพุทธรักษาจากวิทยาเขตบางเขน กำแพงแสน และแปลงของเกษตรกร วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide

ช่อง M	DNA marker (100 bp ladder, Fermentas)
ช่อง N	Negative control (ตัวอย่างพุทธรักษาปกติ)
ช่อง 1-19	ตัวอย่างใบพุทธรักษาจากวิทยาเขตบางเขน
ช่อง 20-23	ตัวอย่างใบพุทธรักษาจากวิทยาเขตกำแพงแสน
ช่อง 24-32	ตัวอย่างใบพุทธรักษาจากแปลงเกษตรกร จังหวัดนนทบุรี



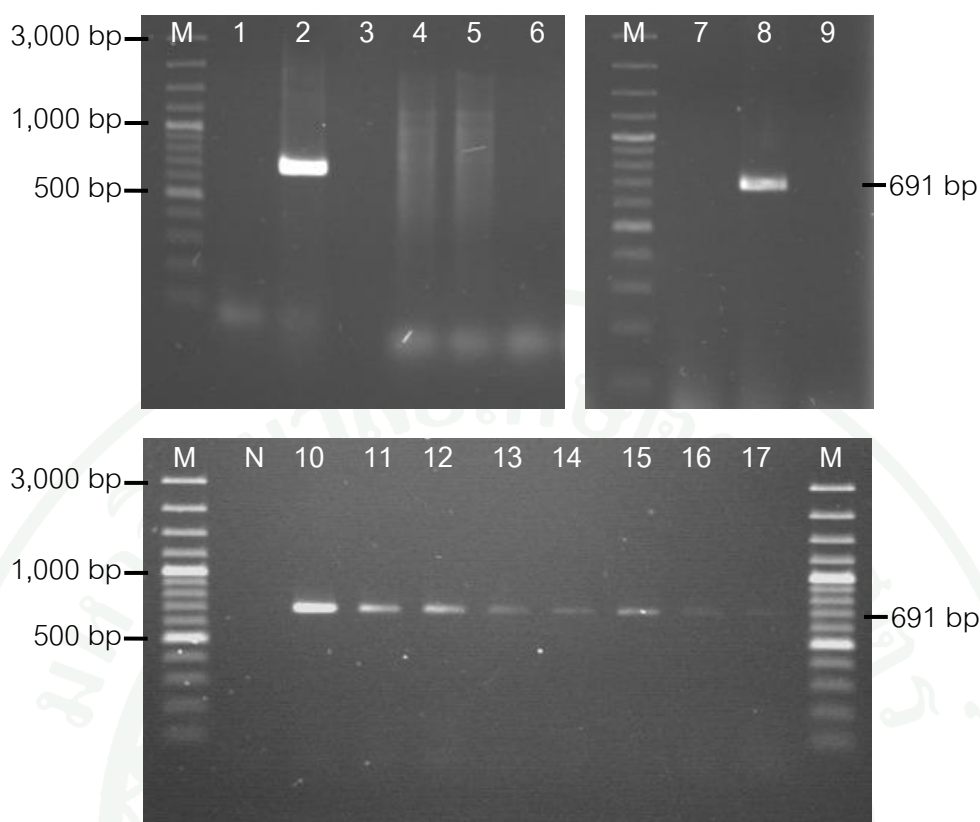
ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอขนาด 565 คู่เบสที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบเชื้อ Canna yellow mottle virus (CaYMV) ในตัวอย่างใบพุทธรักษาจากบริษัทเอกชนและตลาดจตุจักร วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide

ช่อง M DNA marker (100 bp ladder, Fermentas)

ช่อง N Negative control (ตัวอย่างพุทธรักษาปกติ)

ช่อง 1-8 ตัวอย่างพุทธรักษาจากบริษัทเอกชน

ช่อง 9-20 ตัวอย่างพุทธรักษาจากตลาดจตุจักร กรุงเทพฯ



ภาพที่ 7 แถบดีเอ็นเอขนาด 691 คู่เบสที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา RT-PCR จากการใช้ไพรเมอร์ CannaSVF1 และ CannaSVR2 เพื่อตรวจสอบเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV) ในตัวอย่างใบพุทธรักษาจากวิทยาเขตกำแพงแสน ตลาดจตุจักรและบริษัทเอกชน วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลดด้วย ethidium bromide

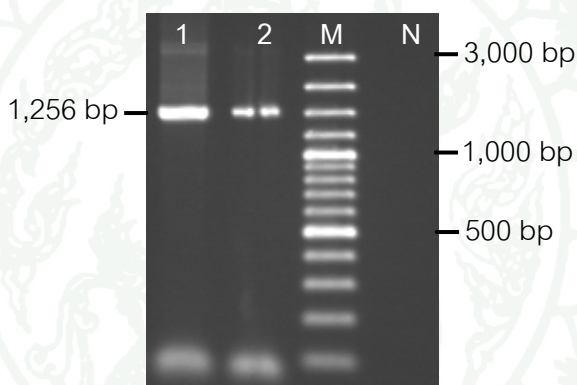
- | | |
|------------|--|
| ช่อง M | DNA marker (100 bp ladder, Fermentas) |
| ช่อง N | Negative control (ตัวอย่างพุทธรักษาปกติ) |
| ช่อง 1-6 | ตัวอย่างพุทธรักษาจากวิทยาเขตกำแพงแสน |
| ช่อง 7-9 | ตัวอย่างพุทธรักษาจากตลาดจตุจักร กรุงเทพฯ |
| ช่อง 10-17 | ตัวอย่างพุทธรักษาจากบริษัทเอกชน |

ผลการสำรวจไวรัสในพุทธรักษาจากทั้ง 4 แหล่งปลูกและบริษัทเอกชน พบตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัส CaYMV เพียงชนิดเดียวจำนวน 47 ตัวอย่าง จาก 88 ตัวอย่าง คิดเป็น 53.41% พบเชื้อไวรัส CaYSV เพียงชนิดเดียวในพุทธรักษา 7 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.95% และพบเชื้อไวรัสสองชนิดร่วมกัน 5 ตัวอย่าง คิดเป็น 5.68%

ตารางที่ 7 สรุปผลการสำรวจโรคไวรัสในพุทธรักษา โดยใช้เทคนิค PCR ตรวจเชื้อ Canna yellow mottle virus (CaYMV) และเทคนิค RT-PCR ตรวจเชื้อ Canna yellow streak virus (CaYSV)

แหล่งปลูก	จำนวนตัวอย่าง ที่ตรวจ	จำนวนเป็นโรค (%)	
		CaYMV	CaYSV
วิทยาเขตบางเขน	36	32(88.89)	0(0)
วิทยาเขตกำแพงแสน	10	2(20)	2(20)
นนทบุรี	22	10(45.45)	0(0)
ตลาดจตุจักร	12	3(25)	2(16.67)
บริษัทเอกชน	8	5(62.5)	8(100)
รวม	88	52(59.09)	12(13.63)

นอกจากทำการตรวจสอบเชื้อ CaYSV แล้ว ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพิ่มเติมในส่วน
ของปลายสายอาร์เอ็นเอด้าน 3' ก่อนถึง polyA tail ของเชื้อ เพื่อช่วยในการระบุสายพันธุ์ของ
CaYSV (Frenkel *et al.*, 1989) โดยใช้สายไพรเมอร์ CannaSVF1/ 5'UTR และใช้อาร์เอ็นเอรวมที่
สกัดจากใบพุทธรักษา PHC-478 จากบริษัทเอกชน ผลการสังเคราะห์ พบว่าดีเอ็นเอผลผลิตมี
ขนาด 1,256 คู่เบส (ภาพที่ 8) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และบันทึกข้อมูลในฐานข้อมูล
GenBank Acc.No.HE774738 (โคลน 6C6) และ Acc.No.HE774739 (โคลน 9C4) พบว่าดีเอ็น
เอที่สังเคราะห์ได้เป็นยีนบางส่วนของ Nib, CP ไปจนถึงส่วนปลาย 3' ของเชื้อ CaYSV แปรรหัส
ให้กรดอะมิโนจำนวน 361 เรซิดิวส์ และส่วนที่ไม่แปรรหัสเป็นโปรตีนบริเวณปลายสายด้าน 3'
จำนวน 170 นิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 8 แถบดีเอ็นเอขนาด 1,256 คู่เบส จากการใช้ไพรเมอร์ CannaSVF1 และ 5' UTR เพื่อ
ตรวจสอบ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) ที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา RT-PCR
วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย
ethidium bromide

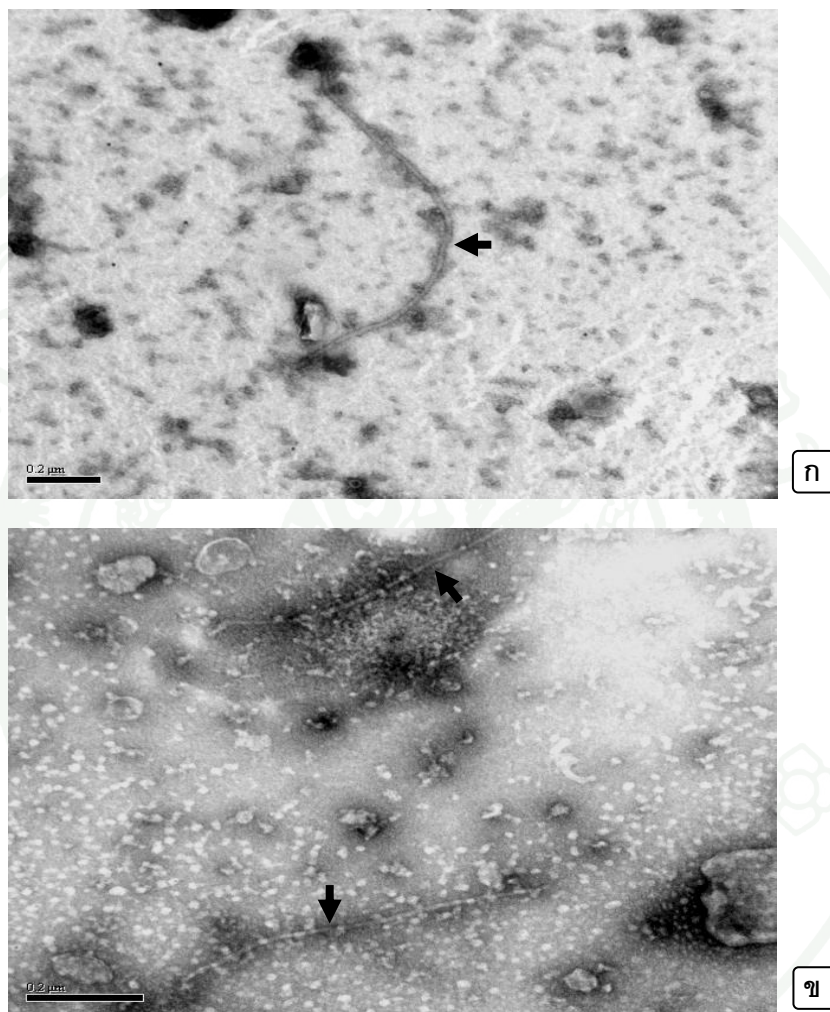
ช่อง M	DNA marker (100 bp ladder, Fermentas)
ช่อง N	Negative control (ตัวอย่างพุทธรักษาปกติ)
ช่อง 1-2	ตัวอย่างพุทธรักษา PHC-478 จากบริษัทเอกชน

การศึกษาสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ตรวจพบอนุภาครูปท่อนยาวคด (long flexuous rod) ในใบพุทธรักษา PHC-478 และในดอกของพุทธรักษา PHC-51 (ภาพที่ 9) ซึ่งเป็นตัวอย่างจากเอกชนและตรวจพบเชื้อ CaYSV ด้วยวิธี RT-PCR เมื่อทำการวัดความยาวของอนุภาคจำนวน 28 อนุภาค จากภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และคำนวณขนาดอนุภาคเฉลี่ย พบว่ามีความยาว 790 นาโนเมตร จากลักษณะรูปร่างและขนาดของอนุภาคไวรัส CaYSV ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ที่พบในตัวอย่างใบและดอกพุทธรักษา PHC พบว่ามีขนาดใกล้เคียงกับอนุภาค CaYSV รูปท่อนยาวคด (long, flexuous filaments) ความยาวเฉลี่ย 786 นาโนเมตร ที่พบในพุทธรักษาสายพันธุ์ *Pink Sunburst* ในประเทศอังกฤษ ซึ่งแสดงอาการใบขีดและต่างประ (Monger *et al.*, 2007) และมีสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกับไฟโตไวรัสบางชนิด เช่น Sugarcane mosaic virus ขนาดประมาณ 750 nm หรือ Johnsongrass mosaic virus ความยาวเฉลี่ย 775 nm หรือ Papaya ringspot virus ความยาวเฉลี่ย 780 nm ดังนั้น เชื้อ CaYSV ที่พบในการศึกษานี้ จึงมีลักษณะและขนาดของอนุภาคสอดคล้องกับลักษณะของ Potyvirus ซึ่งมีความยาวของอนุภาคอยู่ในช่วง 720-850 nm (Hull, 2002)

สำหรับการตรวจดูอนุภาคไวรัสในใบพุทธรักษาที่ตรวจพบไวรัส CaYMV ด้วยวิธี PCR นั้น ผลปรากฏว่าตรวจไม่พบอนุภาครูปท่อนสั้น (bullet shape) ที่เป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อไวรัสซึ่งจัดอยู่ในจีนัส Badnavirus ซึ่งในการศึกษาและตรวจไม่พบอนุภาคครั้งนี้ คาดว่ามีสาเหตุมาจากการเตรียมตัวอย่างแบบ Dip preparation ยังไม่เหมาะสม เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Dip preparation อาจมีปัจจัยบางประการที่ทำให้ไม่พบอนุภาคไวรัส เช่น การมีปริมาณไวรัสน้อยในต้นพืชที่เป็นโรค (Lockhart and Autrey, 1988) หรือการเลือกใช้สีย้อมที่ยังไม่เหมาะสมซึ่งในรายงานที่มีการตรวจหาอนุภาค Badnavirus ในพุทธรักษา กล้วย ส้ม อ้อย ใช้สารละลาย 2% Sodium phosphotungstae pH 7.0 เป็นสีย้อม (Lockhart, 1988; Ahlawat *et al.*, 1996) นอกจากนี้ การเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีการด้วยเทคนิค Immunoelectron microscopy จัดเป็นอีกหนทางหนึ่งที่จะช่วยให้ตรวจพบอนุภาคไวรัสได้ง่ายและมากขึ้นกว่าวิธีการปกติ (Agindotan *et al.*, 2006) ดังนั้นหากปรับปรุงวิธีการและทดลองเพิ่มเติม คาดว่าจะสามารถตรวจพบอนุภาคของ CaYMV ได้ สำหรับในกรณีของ Lockhart และ Autrey (1988) ได้รายงานข้อมูลเพิ่มเติม

ด้วยว่าอนุภาคของเชื้อ CaYMV ในพุทธรักษา ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติซีรั่มต่อเชื้อไวรัสในจีนัส Badnavirus ชนิดอื่น เช่น *Banana streak virus* (BSV) หรือ *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV)



ภาพที่ 9 อนุภาคไวรัสรูปท่อนยาวคด (ลูกศรชี้) ในตัวอย่างพุทธรักษาจากบริษัทเอกชน เมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Dip preparation (สเกล เท่ากับ 200 นาโนเมตร)

(ก) ใบพุทธรักษา PHC-478

(ข) ดอกพุทธรักษา PHC-51

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *Canna yellow mottle virus* (CaYMV)

วิเคราะห์หัตถ์เอ็นเอขนาดประมาณ 565 คู่เบส ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ของเชื้อ CaYMV ในตัวอย่างพืชรักษา ได้แก่ โคลน BK1 และ BK1nt ได้จากตัวอย่าง AB01 วิทยาเขตบางเขน โคลน JJ1 จากตัวอย่าง JJ01 ตลาดจตุจักร โคลน KPS1 จากตัวอย่าง AK10 วิทยาเขตกำแพงแสน โคลน PHC-BD, PHC-CS และ PHC-51 จากบริษัทเอกชน บันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ไว้ใน GenBank รวม 7 Accession No. (ตารางที่ 8) ยีนของเชื้อ CaYSV ที่สังเคราะห์ได้ทุกไอโซเลทมีขนาด 565 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้กรดอะมิโนจำนวน 188 เรซิดิวส์ เมื่อวิเคราะห์ชนิดยีนโดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าเป็นยีนบริเวณอนุรักษซึ่งประกอบด้วย tRNAm^{et} binding site และ reverse transcriptase (RT) ซึ่งอยู่ในส่วน ORFIII ของเชื้อ CaYMV ที่อยู่ในจีนัสแบดนาไวรัส (genus *Badnavirus*) (Momol *et al.*, 2004)

ตารางที่ 8 GenBank accession number ของยีน ORFIII ของเชื้อ *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) ที่พบในการทดลองนี้ และที่มีรายงานพบในต่างประเทศ ที่นำมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

ชื่อไอโซเลท	แหล่งที่มา	ขนาด (bp)	GenBank accession number
JJ1	ตลาดจตุจักร	565 bp	FN994894
BK1nt	วิทยาเขตบางเขน	565 bp	FN994895
BK1	วิทยาเขตบางเขน	565 bp	FN994892
KPS1	วิทยาเขตกำแพงแสน	565 bp	FN994893
PHC-BD	บริษัทเอกชน	565 bp	HE774733
PHC-CS	บริษัทเอกชน	565 bp	HE774734
PHC-51	บริษัทเอกชน	565 bp	HE774735
Lucifer	ออสเตรเลีย	565 bp	EF189147
OperaLaBoheme	ออสเตรเลีย	539 bp	EF189149
V17	ออสเตรเลีย	565 bp	EF189148
1	อิตาลี	526 bp	EF156357
5	อิตาลี	526 bp	EF156361

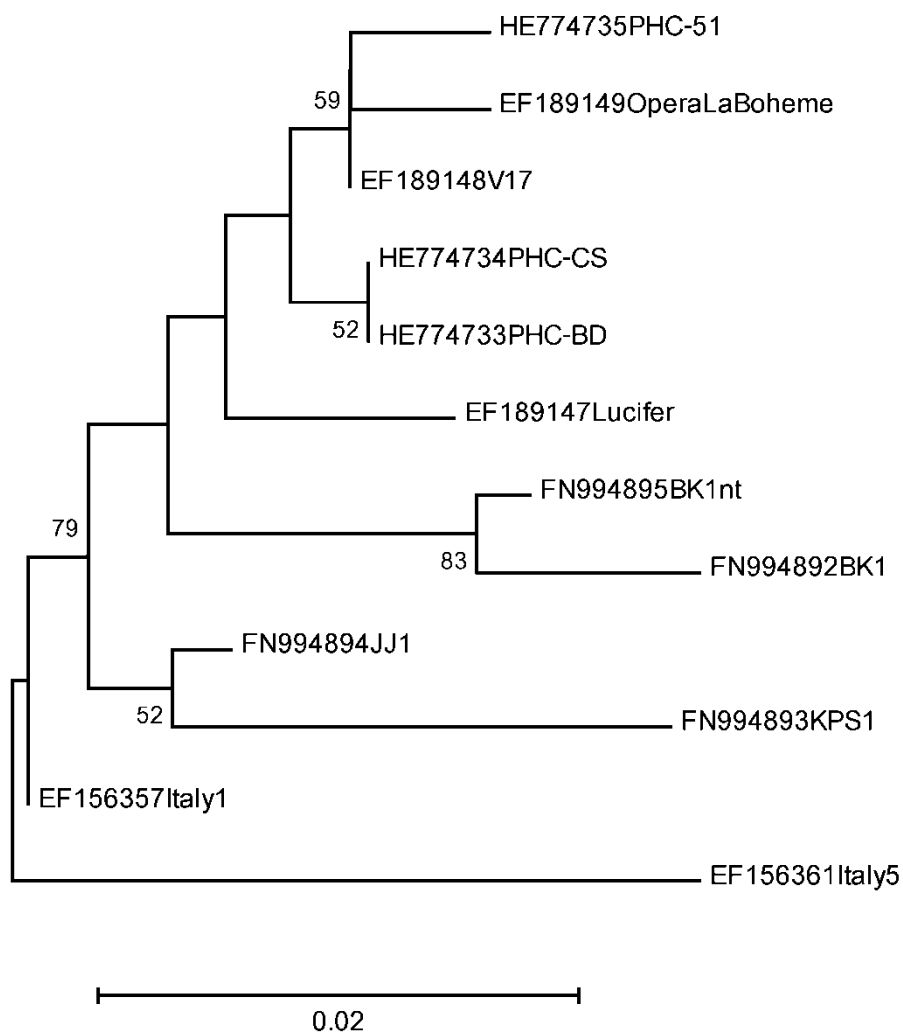
ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน ORFIII จากเชื้อ CaYMV ทั้ง 7 ไอโซเลทที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ และไอโซเลทอื่นของ CaYMV ที่พบในต่างประเทศ (ตารางที่ 9) พบว่า 7 ไอโซเลทที่รายงานในการศึกษาครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกันภายในกลุ่มที่ระดับ 94-99% identity เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับไอโซเลทที่พบในต่างประเทศพบว่า ไอโซเลท BK1, BK1nt, KPS1 และ JJ1 จากพุทธรักษาที่ปลูกอยู่ภายในประเทศไทย คล้ายคลึงกับไอโซเลท Opera La Boheme, V17, Lucifer จากประเทศออสเตรียและไอโซเลท 1 จากประเทศอิตาลี ที่ระดับ 96-98% identity ยกเว้นไอโซเลท 5 จากประเทศอิตาลี คล้ายกันที่ระดับ 94-96% identity สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ของไอโซเลท PHC-BD, PHC-CS และ PHC-51 ซึ่งเป็นพุทธรักษาที่มาจากต่างประเทศของบริษัทเอกชน ที่มีความคล้ายคลึงกับไอโซเลท Opera La Boheme, V17, Lucifer จากประเทศออสเตรียและไอโซเลท 1 จากประเทศอิตาลี ที่ระดับ 97-99% identity ยกเว้นไอโซเลท 5 จากประเทศอิตาลี คล้ายกันที่ระดับ 95% identity ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเชื้อ CaYMV ที่มีรายงานการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้กับที่ศึกษาในครั้งนี้ มีความแตกต่างของโปรตีน CP ที่เป็นบริเวณอนุรักษ์ของแบดนาไวรัส น้อยกว่า 20% จึงสนับสนุนการระบุชนิดของเชื้อแบดนาไวรัสทุกไอโซเลทที่พบในพุทธรักษาที่ทำการสำรวจครั้งนี้ว่าเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน คือ CaYMV (Fauquet *et al.*, 2005) และเชื้อที่คล้ายคลึงกันมากกว่า 95% สามารถจัดให้เป็นสายพันธุ์เดียวกัน

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนจำนวน 188 เรซิดิวส์ จากบางส่วนของยีน ORF III ของ *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) ที่ศึกษาในครั้งนี้กับไอโซเลทจากต่างประเทศ ชื่อไอโซเลทและรหัสข้อมูลอยู่ในตารางที่ 8

	FN994894JJ1	FN994893KPS1	FN994895BK1nt	HE774734PHC-CS	HE774733PHC-BD	HE774735PHC-51	EF189147Lucifer	EF189149OperaLa Boheme	EF189148V17	EF156357Italy1	EF156361Italy5
FN994892BK1	96	95	98	97	97	96	97	96	96	97	94
FN994894JJ1		97	97	98	98	98	97	98	98	98	96
FN994893KPS1			95	96	96	96	96	96	96	97	94
FN994895BK1nt				98	98	97	97	97	97	97	94
HE774734PHC-CS					100	98	98	98	99	98	95
HE774733PHC-BD						98	98	98	99	98	95
HE774735PHC-51							97	98	99	98	95
EF189147Lucifer								97	98	98	95
EF189149OperaLaBoheme									99	98	95
EF189148V17										98	96
EF156357Italy1											97

การวิเคราะห์ด้วย multiple alignment (ภาพที่ 10) แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท BK1 จากบางเขนมีลักษณะเฉพาะของชนิดกรดอะมิโนที่ต่างจากไอโซเลทอื่น ทั้งที่พบในไทยและต่างประเทศ เช่นที่ตำแหน่ง 11(R), 12(N), 26(H), 102(A) และ 103(I) นอกจากนี้ไอโซเลทจากกำแพงแสนมีกรดอะมิโนที่ต่างจากไอโซเลทอื่นทั้งหมดถึง 3 ตำแหน่งได้แก่ 64(T), 70(G) และ 81(H)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จาก Neighbour-joining phylogenetic tree (ภาพที่ 11) แสดงให้เห็นว่า CaYMV ทั้ง 7 ไอโซเลทที่ศึกษา แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยไอโซเลท BK1 และ BK1nt จับกลุ่มแยกออกจากไอโซเลทของประเทศออสเตรเลีย โดยทั้งสองไอโซเลทจับกลุ่มสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลท 1 และ 5 จากประเทศอิตาลี กลุ่มที่สองประกอบด้วยไอโซเลท PHC-BD, PHC-CS และ PHC-51 จากบริษัทเอกชน ซึ่งจับกลุ่มสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไอโซเลทจากประเทศออสเตรเลีย กลุ่มที่สามประกอบด้วยไอโซเลท JJ1 และ KPS1 ซึ่งจับกลุ่มแยกออกจากไอโซเลทของประเทศออสเตรเลียและอิตาลี



ภาพที่ 11 Neighbor-joining phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นด้วยค่า Distance ของลำดับกรดอะมิโนบางส่วนที่ยีน ORF III ของเชื้อ *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) โดยใช้โปรแกรม MEGA package version 5.05 และแสดงค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 replications ที่กิ่งของ tree

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ *Canna yellow streak virus* (CaYSV)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ไม่แปลรหัสส่วนปลายสายอาร์เอ็นเอ ด้าน 3'

ผลการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของส่วนปลาย 3' ของไวรัส CaYSV ไอโซเลท PHC-478 ทั้ง 2 โคลน ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ กับไอโซเลทของ CaYSV ที่พบรายงานในต่างประเทศ (ตารางที่ 10) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความคล้ายคลึงกับยีนทางด้านปลาย 3' ของจีโนมของเชื้อไวรัส CaYSV ที่พบในประเทศอังกฤษและอิสราเอลที่ระดับ 93% และ 94% ตามลำดับ (ตารางที่ 11)

ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนปลาย 3' เพื่อศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อไฟโตไวรัส ซึ่งพบว่าไวรัสชนิดเดียวกัน ต่างสายพันธุ์ มีความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ส่วนปลาย 3' อยู่ในช่วง 82-99% และไวรัสต่างชนิดกันมีความคล้ายคลึงกันอยู่ในช่วง 39-53% (Frenkel *et al.*, 1989) จึงสนับสนุนการระบุชนิดของเชื้อไฟโตไวรัสที่พบในพุทธรักษาที่ทำการสำรวจครั้งนี้ว่าเป็นเชื้อไวรัส CaYSV

ตารางที่ 10 GenBank accession number ของเชื้อ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) ที่ได้จากพุทธรักษาในการทดลองนี้ กับไวรัส CaYSV ในต่างประเทศ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบและวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากข้อมูลลำดับกรดอมิโนกับข้อมูลของไวรัสในกลุ่มเดียวกัน

ชื่อไอซีเลข	แหล่งที่มา	ขนาด (bp)	GenBank accession number
PHC478-6C6	บริษัทเอกชน	1,256 bp	HE774738
PHC478-9C4	บริษัทเอกชน	1,256 bp	HE774739
K2-54	วิทยาเขตกำแพงแสน	864 bp	HE774736
K2-61	วิทยาเขตกำแพงแสน	864 bp	HE774737
ไม่มี	อังกฤษ	1,711 bp	EF466139
ไม่มี	อังกฤษ	9,502 bp	GQ421689
ไม่มี	อิสราเอล	1,709 bp	EF466138
ไม่มี	อังกฤษ	9,502 bp	NC013261

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์จากชิ้นส่วนยีนขนาด 170 bp ทางด้านปลาย 3' ของ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) กับไวรัส CaYSV ในต่างประเทศ

	HE774739PHC478-9C4	EF466139UK	NC013261UK	GQ421689UK	EF466138Israel
HE774738PHC478-6C6	100	93	93	93	94
HE774739PHC478-9C4		93	93	93	94
EF466139UK			100	100	99
NC013261UK				100	99
GQ421689UK					99

ผลการวิเคราะห์ด้วย multiple alignment (ภาพที่ 12) แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ไอโซเลต PHC-478 ของบริษัทเอกชน มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างจากไอโซเลตที่พบในประเทศไทย และอิสราเอล โดยมี deletion ที่ตำแหน่ง 96

HE774738PHC478-6C6	ACTTATCTGT	TTCTCTACGT	AATTAAATAA	ATAAATGCCA	CCAACTGGGA	50
HE774739PHC478-9C4						50
GQ421689-UK	.T.C.CTG..	C.....TAC		C.....		50
EF466139-UK	.T.C.CTG..	C.....TAC		C.....		50
NC013261-UK	.T.C.CTG..	C.....TAC		C.....		50
EF466138-Israel	.T.C.CTG..	C.....TAC		C.....		50
HE774738PHC478-6C6	GGCACTAGTA	ATGTAAGTCG	GTCTGCACCT	TTCTGAGTGA	TGTTT-ACAT	99
HE774739PHC478-9C4						99
GQ421689-UK		.A.....		C.....	T.....	100
EF466139-UK		.A.....		C.....	T.....	100
NC013261-UK		.A.....		C.....	T.....	100
EF466138-Israel				C.....	T.....	100
HE774738PHC478-6C6	CCTGTCATAC	TAGTTGCAAT	GCTGTTCTCA	GTTACCAACT	GGTGCACCTG	149
HE774739PHC478-9C4						149
GQ421689-UK						150
EF466139-UK						150
NC013261-UK						150
EF466138-Israel						150
HE774738PHC478-6C6	AAAGGTCGTG	TTTACTAGTA	G			170
HE774739PHC478-9C4						170
GQ421689-UK						171
EF466139-UK						171
NC013261-UK						171
EF466138-Israel						171

ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์จากบริเวณที่ไม่แปลรหัสทางปลายสายอาร์เอ็นเอด้าน 3' ขนาด 170 bp ของ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) เปรียบเทียบแบบ Multiple alignment กับไอโซเลตในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLC Bio (จุดสีดำ หมายถึง ชนิดเบสที่ตรงกันของแต่ละไอโซเลต)

ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CP ของเชื้อ CaYSV

ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 864 คู่เบสของไวรัส CaYSV ไอโซเลท PHC-478 (โคลน 6C6 และ 9C4) และไอโซเลท AK02 (โคลน K2-61 และ K2-54) พบว่ายีนที่สังเคราะห์ได้จากทั้ง 2 โคลนมีขนาด 864 นิวคลีโอไทด์ แปรรหัสให้กรดอะมิโนจำนวน 287 เรซิดิวส์ เมื่อวิเคราะห์ชนิดยีนโดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่าเป็นยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein; CP) ของเชื้อ CaYSV ในจีนัสโพทิวรัส (genus *Potyvirus*) น้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้จากลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 32.416 กิโลดาลตัน (CLC Main Workbench 6.0.1)

ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีน CP จำนวน 287 เรซิดิวส์จากเชื้อไวรัส CaYSV ไอโซเลท PHC-478 (โคลน 6C6 และ 9C4) และไอโซเลท AK02 (โคลน K2-61 และ K2-54) ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ และไอโซเลทอื่นของ CaYSV ที่พบในต่างประเทศ (ตารางที่ 12) พบว่า ไอโซเลท AK02 จากพืชรักษาที่ปลูกอยู่ภายในประเทศไทย มีความคล้ายคลึงกับยีนของเชื้อไวรัส CaYSV ที่พบในประเทศอังกฤษและอิสราเอลที่ระดับ 88-90% ในขณะที่ผลการวิเคราะห์ของไอโซเลท PHC-478 ซึ่งเป็นพืชรักษาที่มาจากต่างประเทศของบริษัทเอกชน มีความคล้ายคลึงกับไอโซเลทที่พบในประเทศอังกฤษและอิสราเอลที่ระดับ 89-99% identity

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนจากชิ้นส่วนยีนขนาด 864 bp ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) กับ ไวรัส CaYSV ในต่างประเทศ

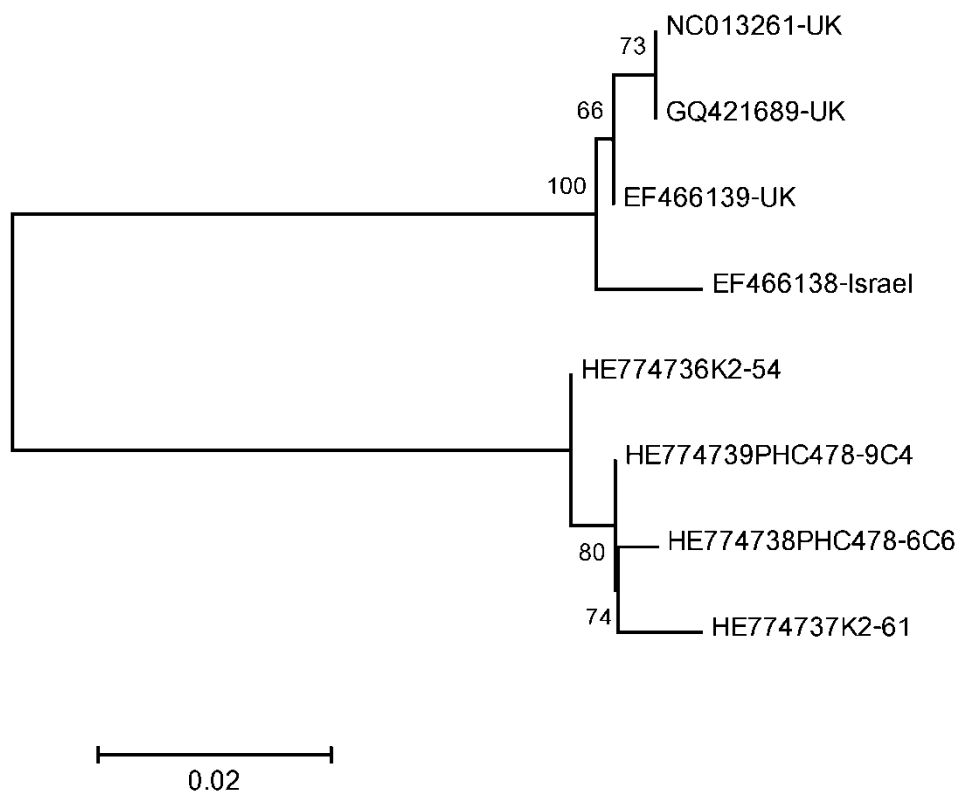
	HE774739PHC478-9C4	HE774736K2-54	HE774737K2-61	EF466139UK	NC013261UK	GQ421689UK	EF466138Israel
HE774738PHC478-6C6	99	99	89	89	98	89	89
HE774739PHC478-9C4		99	89	90	99	89	89
HE774736K2-54			98	90	90	90	89
HE774737K2-61				89	89	89	88
EF466139UK					99	99	98
NC013261UK						100	98
GQ421689UK							98

การวิเคราะห์ด้วย multiple alignment (ภาพที่ 13) แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท AK02 จาก กำแพงแสนและ PHC-478 ของบริษัทเอกชน มีลักษณะเฉพาะของชนิดกรดอะมิโนที่ต่างจากไอโซเลทที่พบในประเทศไทยและอิสราเอล เช่นที่ตำแหน่ง 8(V), 22(S), 26(T), 83(Q), 118(I), 125(D) และ 247(H) นอกจากนี้ไอโซเลท AK02 โคลน K2-61 มีกรดอะมิโนที่ต่างจากไอโซเลทอื่นทั้งหมด 2 ตำแหน่งได้แก่ 184(S) และ 276(T) ในขณะที่ไอโซเลท PHC-478 โคลน 6C6 มีกรดอะมิโนที่ต่างจากไอโซเลทอื่นทั้งหมด 1 ตำแหน่งได้แก่ 163(G)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์จาก Neighbour-joining phylogenetic tree แสดงให้เห็นว่า CaYSV ทั้งสองไอโซเลทที่ศึกษา จับกลุ่มแยกจากเชื้อไวรัสไอโซเลทจากประเทศไทยและอิสราเอล (ภาพที่ 14)

				20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
--	--	--	--	----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

ภาพที่ 13 ลำดับกรดอะมิโนของยีน CP จำนวน 287 เรซิดิวส์ ของ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) กับไวรัส CaYSV ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ (AK02, PHC478) กับไอโซเลทในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLC Bio (จุดสีดำ หมายถึง ชนิดและตำแหน่งของลำดับกรดอะมิโนของแต่ละไอโซเลทที่ตรงกัน)

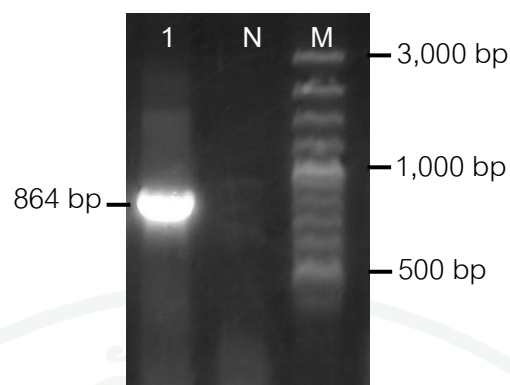


ภาพที่ 14 Neighbor-joining phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นด้วยค่า Distance ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) โดยใช้โปรแกรม MEGA package version 5.05 และแสดงค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 replications ที่กิ่งของ tree

จากการจำแนกเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดที่เข้าทำลายพุทธรักษาพบว่า ไวรัส CaYMV มีการระบาดในแหล่งปลูกพุทธรักษาที่ทำการสำรวจทั้ง 4 แห่ง คือ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน วิทยาเขตกำแพงแสน แปลงปลูกของเกษตรกร ที่ จ.นนทบุรี และตลาดจตุจักร กรุงเทพฯ แต่ในขณะที่พบเชื้อ CaYMV ในอัตราสูงกว่า 50% ในพุทธรักษาที่ปลูกอยู่ภายในวิทยาเขตบางเขน กลับไม่พบเชื้อ CaYSV (0%) ซึ่งจากฐานข้อมูลยื่น CP ของเชื้อ CaYSV พบว่า Monger และคณะ (2007, 2010) รายงานการพบเชื้อชนิดนี้ในพุทธรักษาพันธุ์ Pink Sunburst ที่ปลูกในประเทศสหราชอาณาจักร (United Kingdom) เมื่อตรวจสอบประวัติทางพันธุกรรมของพันธุ์ดังกล่าว พบว่าเป็นสายพันธุ์ลูกผสมกลุ่ม Canna Lily ที่มาจากประเทศอเมริกาใต้ (South Africa) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Canna generalis* มีต้นเตี้ยประมาณ 5-16 นิ้ว ใบมีลักษณะต่างแบบ variegated (บางแห่งเรียก Striped Dwarf Canna หรือ *C. americana* var. *variegata*) ซึ่งพบใบลักษณะนี้ในพันธุ์ Bengal Tiger ของประเทศอินเดีย (Cooke, 2001) สำหรับประเทศไทย ใบแปลงของเกษตรกรที่ จ.นนทบุรี พบว่ามีการปลูกพันธุ์แควะร่วมกับพันธุ์ต้นสูงที่พบทั่วไปในประเทศไทย (สูงได้มากกว่า 2 เมตร) นอกจากนี้ตัวอย่างพุทธรักษาบางพันธุ์ที่ซื้อมาจากตลาดนัดจตุจักรมีลักษณะใบเป็นแบบ variegated แต่พันธุ์พุทธรักษาที่พบอยู่ภายในสองวิทยาเขตที่ศึกษา ไม่ใช่พันธุ์แควะ ต้นเตี้ย (Dwarf Canna) หรือใบต่างแบบ variegated สำหรับพุทธรักษาในวิทยาเขตกำแพงแสนที่พบเชื้อ CaYSV นั้น ไม่แสดงอาการบนใบ จึงอาจเป็นไปได้ที่พันธุ์พุทธรักษาที่ไม่ใช่ลูกผสมของพันธุ์แควะ หรือ variegated เป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะด้านทาน หรือทนทานต่อเชื้อนี้ (Lockhart, 1988)

การโคลนยีน CaYSV-CP เพื่อสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคในสภาพหลอดทดลอง

ใช้อาร์เอ็นเอรวมของเนื้อเยื่อใบพุทธรักษาหัดตัวอย่าง AK02 จากวิทยาเขตกำแพงแสน มาเป็นต้นแบบของไวรัสในการสังเคราะห์ยีน CaYSV-CP ด้วยเทคนิค RT-PCR และใช้สายไพรเมอร์ CaYex-F และ CaYex-R ผลการสังเคราะห์ พบว่า ได้แถบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาดประมาณ 864 คู่เบส (ภาพที่ 15) จากนั้นคัดเลือกโคลน K2-61 และ K2-54 มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตรวจหาข้อผิดพลาดของการแทรกตัวของยีนในพลาสมิดพาหะ โดยใช้ไพรเมอร์ 5' pQE-forward ทำ sequencing พบว่า โคลน K2-61 และ K2-54 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดพาหะส่วนเชื่อมต่อกับยีน CaYSV-CP ถูกต้องตามที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต จึงนำทั้งสองโคลนไปทดสอบการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ *E.coli*

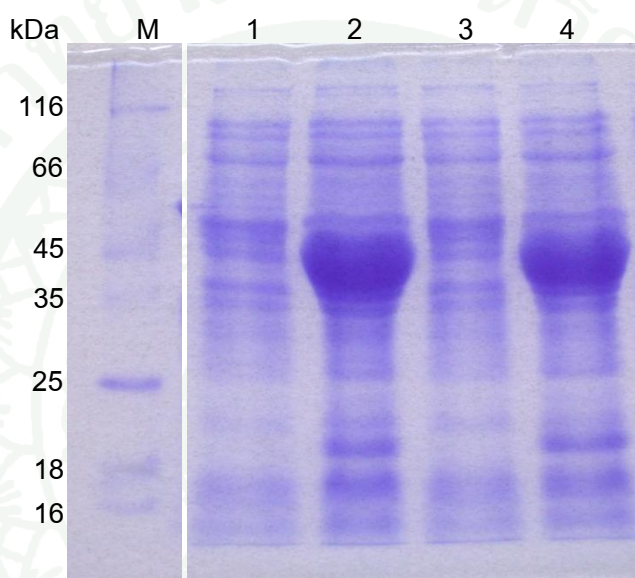


ภาพที่ 15 แถบดีเอ็นเอขนาด 864 คู่เบส จากการใช้ไพรเมอร์ CaYex-F และ CaYex-R เพื่อ
สังเคราะห์ชิ้น CP ของ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) จากปฏิกิริยา RT-PCR
วิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลดด้วย
ethidium bromide

- | | |
|--------|---|
| ช่อง M | DNA marker (100 bp ladder, Fermentas) |
| ช่อง N | Negative control (ตัวอย่างพืชรักษาปกติ) |
| ช่อง 1 | ตัวอย่างพืชรักษา AK02 จากวิทยาเขตกำแพงแสน |

การสังเคราะห์โปรตีน CP และการแยกให้บริสุทธิ์

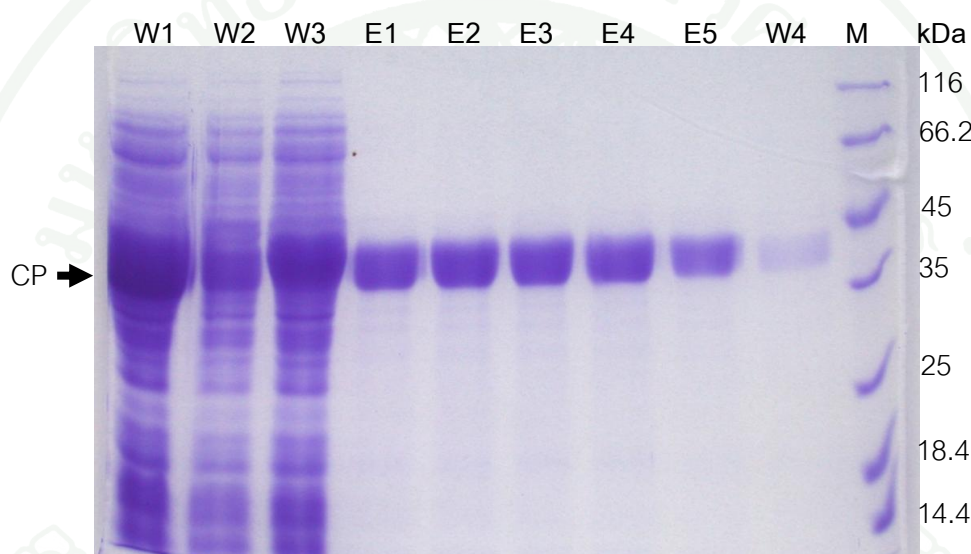
ผลการทดสอบการสังเคราะห์โปรตีน 6xHis-CaYSV-CP ของเชื้อ *Canna yellow streak virus* จากโคลน K2-61 และ K2-54 ที่คัดเลือกได้ พบว่า มีการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ *E.coli* หลังจากถูกชักนำด้วย IPTG นาน 5 ชั่วโมง ตรวจพบแถบโปรตีนขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน ได้อย่างชัดเจน โดยไม่พบการสังเคราะห์โปรตีนในโคลนที่ไม่ถูกชักนำด้วย IPTG (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ผลการตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

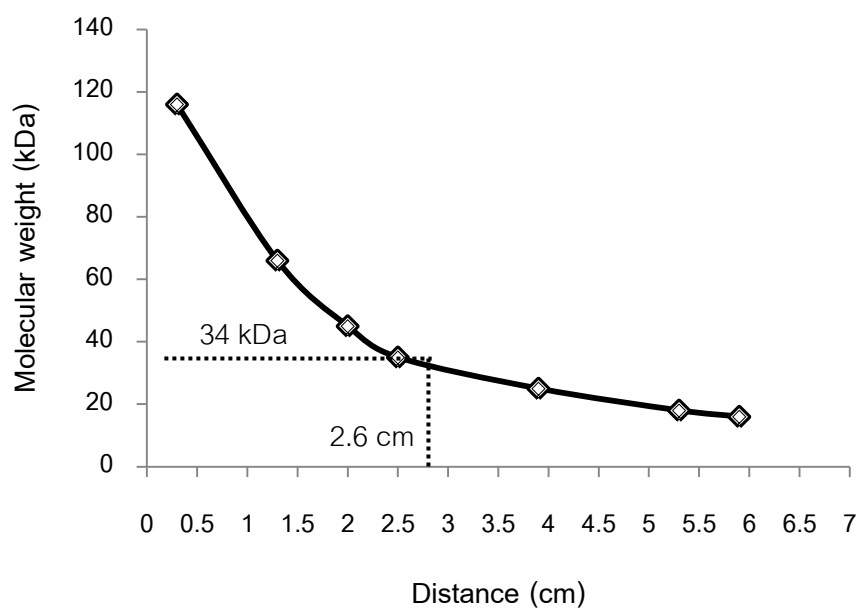
- ช่อง M โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)
- ช่อง 1 โคลนที่ K2-54 ไม่ชักนำด้วย IPTG ย่อยเซลล์ด้วย Lysis buffer
- ช่อง 2 โคลนที่ K2-54 ชักนำด้วย IPTG นาน 5 ชั่วโมง ย่อยเซลล์ด้วย Lysis buffer
- ช่อง 3 โคลนที่ K2-61 ไม่ชักนำด้วย IPTG ย่อยเซลล์ด้วย Lysis buffer
- ช่อง 4 โคลนที่ K2-61 ชักนำด้วย IPTG นาน 5 ชั่วโมง ย่อยเซลล์ด้วย Lysis buffer

สกัดโปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP จากเซลล์แบคทีเรียและทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีโปรตีนปริมาณมากถูกชะล้างออกจาก column ใน fraction ที่ 1, 2, 3 และ 4 (ภาพที่ 17) ตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุล (MW) ของโปรตีนลูกผสมระหว่าง 6xHistidine และ CaYSV-CP พบว่ามีขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 18) โดยที่โปรตีน 6xHis มี MW ประมาณ 1 กิโลดาลตัน รวมกับ CaYSV-CP ประมาณ 33 กิโลดาลตัน โปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP ที่เตรียมให้บริสุทธิ์ มีความเข้มข้น 1.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 19)

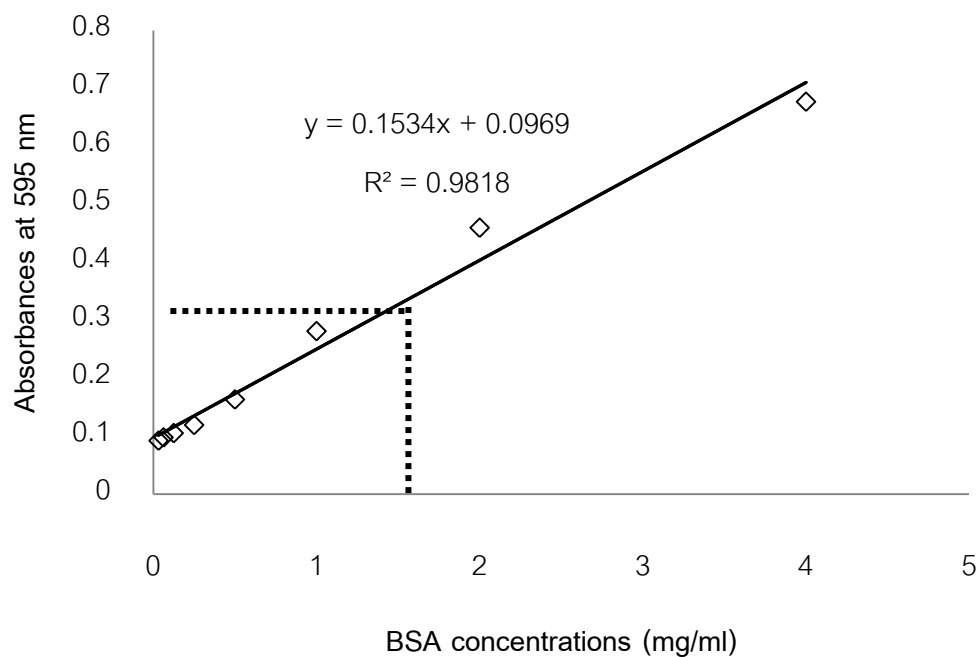


ภาพที่ 17 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP จากโคลน K2-54 สกัดโปรตีนในสภาวะ denature condition และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Ni-NTA agarose column ตรวจสอบด้วย 12% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

ช่อง M	โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)
ช่อง W1-W3	ของเหลวใผ่าน column เมื่อล้างด้วย Washing buffer ก่อนการชะล้างโปรตีน
ช่อง E1-E5	โปรตีนในสารละลายที่ถูกชะล้างออกจาก column ด้วย Elution buffer fraction ที่ 1-5
ช่อง W4	ของเหลวใผ่าน column เมื่อล้างด้วย Washing buffer หลังการชะล้างโปรตีน



ภาพที่ 18 Calibration curve ที่สร้างขึ้นจากค่าระยะทาง (cm) การเคลื่อนที่ของโปรตีน และ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (kDa) เมื่อแยกขนาดโปรตีนใน 12% SDS-Polyacrylamide gel พบว่าโปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 2.6 cm ซึ่งประเมินน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 34 kDa



ภาพที่ 19 Standard curve ที่สร้างขึ้นจากค่า Absorbance ที่ 595 nm ของโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น (ตั้งแต่ 0.032-4 มก./มล.) คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีน ลูกลผสม 6xHis-CaYSV-CP ที่แยกให้บริสุทธิ์ เท่ากับ 1.34 มก./มล.

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีและค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี

ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีน CP ของเชื้อ CaYSV (PAb-CaYSV-CP) ได้ปริมาณรวม 145 มิลลิกรัม จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลอง 9 ครั้ง เมื่อนำแอนติบอดีครั้งที่ 1-5 มาทำปฏิกิริยากับโปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า ค่าการเจือจางสูงสุดของ PAb-CaYSV-CP ที่ยังคงทำปฏิกิริยากับโปรตีนและให้ค่า ELISA (A_{405}) ที่เป็นผลบวก (สูงกว่าค่าจาก normal serum สองเท่าขึ้นไป) เท่ากับ 1: 102,400 เท่า สำหรับแอนติซีรั่มของการเจาะเลือดครั้งที่ 1, 2, 4 และ 5 ยกเว้นของครั้งที่ 3 มีค่าเพียง 1: 51,200 (ตารางที่ 13) ค่าไตเตอร์ของ PAb-CaYSV-CP ซึ่งหาจาก inflection point ของกราฟ (ภาพที่ 20) พบว่าค่าไตเตอร์ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีนโปรตีนลูกผสม 6xHis-CaYSV-CP เท่ากับ 1: 25,600

ผลการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ในการตรวจสอบเชื้อ CaYSV ในน้ำคั้นใบพุทธรักษา AK02 พบว่าค่าความเจือจางสูงสุดของ PAb-CaYSV-CP ครั้งที่ 1, 2 และ 5 มีค่าเท่ากับ 1: 51,200 เท่า ส่วนครั้งที่ 3 และ 4 มีค่าเท่ากับ 1: 25,600 (ตารางที่ 14) ค่าไตเตอร์ซึ่งได้จาก inflection point ของกราฟ (ภาพที่ 21) จากการทำปฏิกิริยากับในน้ำคั้นใบพุทธรักษาเป็นโรค เท่ากับ 1: 6,400

Galal (2005) รายงานผลการศึกษาค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อ *Maize dwarf mosaic potyvirus* (MDMV) ที่ได้จากการฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลองด้วยไวรัสบริสุทธิ์และทดสอบด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่าแอนติบอดีครั้งที่ 1, 2 และ 3 มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 1: 500, 1: 1500 และ 1: 1000 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าแอนติบอดีที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถใช้เป็นแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพและนำไปใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยเชื้อ CaYSV

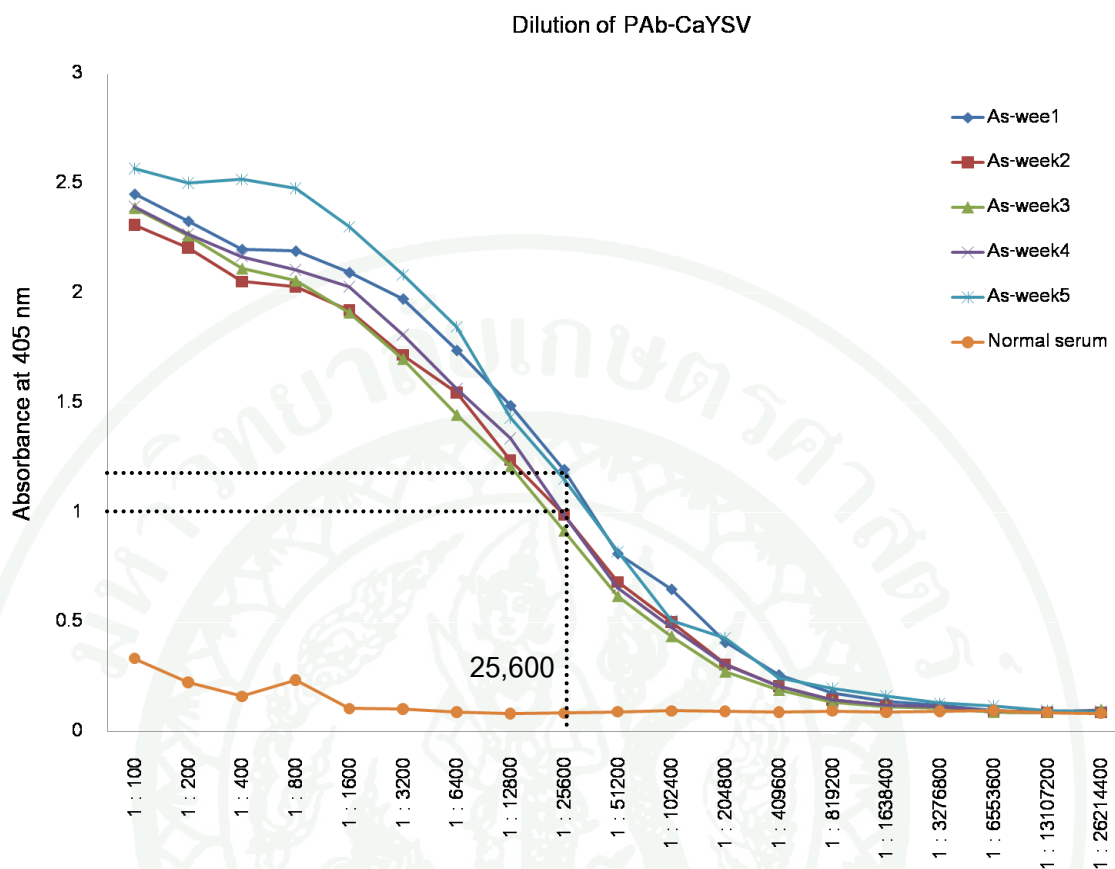
ตารางที่ 13 ค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP เมื่อใช้โปรตีน 6xHis-CaYSV-CP บริสุทธิ์ความเข้มข้น 3 µg/ml เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ค่าความเจือจาง ของแอนติบอดี	ค่า A_{405} เมื่อใช้แอนติบอดีครั้งที่				
	1	2	3	4	5
1 : 100	2.453	2.312	2.389	2.397	2.569
1 : 200	2.330	2.208	2.263	2.270	2.504
1 : 400	2.201	2.053	2.112	2.168	2.520
1 : 800	2.194	2.029	2.057	2.107	2.480
1 : 1600	2.096	1.923	1.911	2.031	2.304
1 : 3200	1.976	1.719	1.700	1.812	2.085
1 : 6400	1.741	1.548	1.445	1.566	1.848
1 : 12800	1.489	1.239	1.210	1.339	1.433
1 : 25600	1.197	0.990	0.916	0.992	1.154
1 : 51200	0.814	0.683	0.618	0.658	0.822
1 : 102400	0.651	0.500	0.435	0.476	0.509
1 : 204800	0.409	0.308	0.273	0.305	0.427
1 : 409600	0.261	0.209	0.189	0.207	0.245
1 : 819200	0.176	0.145	0.136	0.147	0.198
1 : 1638400	0.138	0.120	0.115	0.122	0.163
1 : 3276800	0.120	0.110	0.108	0.114	0.130
1 : 6553600	0.097	0.092	0.090	0.095	0.117
Coating buffer	0.098	0.098	0.098	0.103	0.100

หมายเหตุ ค่า A_{405} เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

Normal serum ที่ความเจือจาง 1:200 วัดค่า A_{405} ได้ 0.224

ค่า A_{405} ของตัวอย่างที่มากกว่า normal serum 2 เท่า ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก



ภาพที่ 20 กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี PAb-CaYSV ต่อโปรตีน CP จากการเจาะเลือด 5 ครั้ง ใช้โปรตีน 6xHis- CaYSV-CP ความเข้มข้น 3 $\mu\text{g/ml}$ เป็นแอนติเจนตรวจสอบ ด้วยเทคนิค ELISA วัดค่า ELISA ที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที

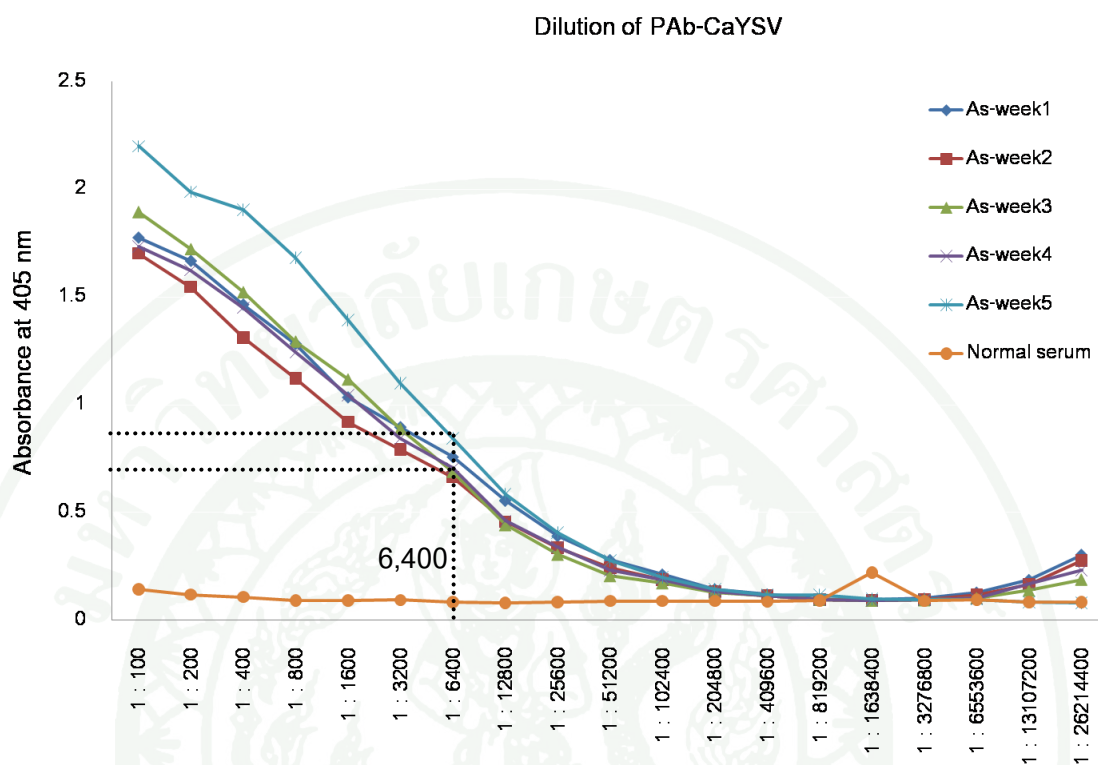
ตารางที่ 14 ค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP เมื่อใช้น้ำคั้นใบพุทธรักษา เป็นโรคที่เจือจาง 1: 10 เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค Indirect ELISA

ค่าความเจือจาง ของแอนติบอดี	ค่า A_{405} เมื่อใช้แอนติบอดีครั้งที่				
	1	2	3	4	5
1 : 100	1.774	1.702	1.895	1.734	2.200
1 : 200	1.666	1.546	1.723	1.624	1.988
1 : 400	1.464	1.312	1.523	1.450	1.906
1 : 800	1.282	1.123	1.294	1.246	1.683
1 : 1600	1.034	0.920	1.118	1.046	1.394
1 : 3200	0.896	0.793	0.889	0.845	1.101
1 : 6400	0.758	0.664	0.690	0.706	0.845
1 : 12800	0.555	0.458	0.443	0.461	0.585
1 : 25600	0.392	0.336	0.306	0.340	0.408
1 : 51200	0.281	0.245	0.207	0.231	0.278
1 : 102400	0.213	0.188	0.173	0.190	0.200
1 : 204800	0.145	0.134	0.131	0.133	0.143
1 : 409600	0.121	0.114	0.113	0.115	0.118
1 : 819200	0.099	0.096	0.097	0.096	0.118
1 : 1638400	0.096	0.093	0.092	0.093	0.099
1 : 3276800	0.102	0.096	0.095	0.096	0.097
1 : 6553600	0.130	0.118	0.104	0.104	0.097
Coating buffer	0.096	0.095	0.093	0.096	0.095

หมายเหตุ ค่า A_{405} เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

Normal serum ที่ความเจือจาง 1:200 วัดค่า A_{405} ได้ 0.119

ค่า A_{405} ของตัวอย่างที่มากกว่า normal serum 2 เท่า ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก



ภาพที่ 21 กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี PAb-CaYSV ต่อโปรตีน CP จากการเจาะเลือด 5 ครั้ง ใช้ น้ำคั้นใบพุทธรักษาที่เป็นโรคเป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA วัดค่า ELISA ที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที

การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีต่อโปรตีน CP

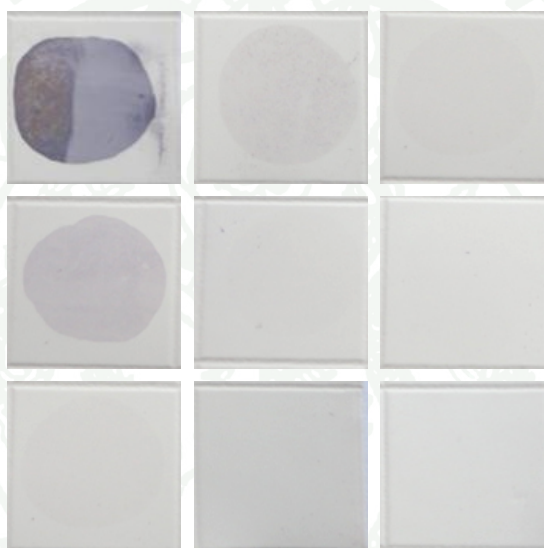
การทดสอบความจำเพาะ

จากการศึกษาความจำเพาะของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ในการตรวจสอบเชื้อ CaYSV ด้วยวิธี Indirect ELISA และ NCM-ELISA พบว่า แอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับน้ำคั้นใบพุทธรักษา PHC-478 ที่ตรวจพบเชื้อไวรัส CaYSV ด้วยวิธี RT-PCR และไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบพุทธรักษาปกติ โดยวัดค่า A_{405} ของตัวอย่างใบพุทธรักษา PHC-478 ได้มากกว่า 2 เท่าของใบพุทธรักษาปกติ เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA และเกิดตะกอนสีม่วงเข้มมองเห็นได้อย่างชัดเจน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA

แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP เกิดปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับลำโพงที่มีเชื้อไวรัส ChiVMV และข้าวโพดที่มีเชื้อไวรัส SCMV ซึ่งอยู่ในจีนัสโพทิวไวรัส เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA โดยมองเห็นตะกอนสีม่วงจางของไวรัส ChiVMV ได้ชัดเจนกว่าไวรัส SCMV และแอนติบอดีไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับตัวอย่างใบเสาวรสที่มีไวรัส PWV (ภาพที่ 22) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP เกิดปฏิกิริยาข้ามกับลำโพงที่มีเชื้อไวรัส ChiVMV ข้าวโพดที่มีเชื้อไวรัส SCMV และเสาวรสที่มีเชื้อไวรัส PWV เมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ โดยค่า A_{405} ที่วัดได้จากการเกิดปฏิกิริยาข้ามของ แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP กับไวรัส ChiVMV มีค่ามากกว่าไวรัส SCMV และ PWV (ตารางที่ 15)

ใบ PHC-478	ข้าวโพด SCMV	เสาวรส PWV
ลำไย ChiVMV	พุทธรักษา ปกติ	ข้าวโพดปกติ
เสาวรสปกติ	ลำไยปกติ	บัพเฟอร์

ก



ข

ภาพที่ 22 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีต่อเชื้อ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรค PHC-478 และพืชปกติ ตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA โดยใช้แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 เจือจาง 1: 1000 เท่า

(ก) แผ่นฝังการหยดน้ำคั้นพืชบนแผ่นเมมเบรน

(ข) ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับตัวอย่าง เกิดตะกอนสีม่วงแสดงว่าเป็นผลบวก

ตารางที่ 15 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ต่อเชื้อ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) ในน้ำคั้นพืช ด้วยวิธี ELISA ใช้แอนติบอดีจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 เจือจาง 1: 1000 เท่า

ตัวอย่างพืช	ค่า A_{405}
ใบพุทธรักษา PHC-478	0.784
ข้าวโพด SCMV	0.34
เสาวรส PWV	0.322
ลำโพง ChiVMV	0.4565
ใบพุทธรักษาปกติ	0.111
ใบข้าวโพดปกติ	0.152
ใบเสาวรสปกติ	0.132
ใบลำโพงปกติ	0.125
Coating buffer	0.096

หมายเหตุ ค่า A_{405} เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate
 ค่า A_{405} ของตัวอย่างที่มากกว่าใบปกติ 2 เท่า ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก
 SCMV Sugarcane mosaic virus
 PWV Passion fruit woodiness virus
 ChiVMV Chilli veinal mottle virus

การทดสอบความไวของการเกิดปฏิกิริยา

จากการตรวจสอบเชื้อ CaYSV ในน้ำคั้นใบพุทธรักษา PHC-478 ที่เจือจางเปรียบเทียบกับโปรตีน 6xHis-CaYSV บริสุทธิ์ด้วยวิธี Indirect-ELISA พบว่า สามารถตรวจสอบไวรัสจากน้ำคั้นใบพุทธรักษาที่เจือจางได้สูงสุดถึง 1: 1,280 โดยค่า A_{405} ที่วัดได้มากกว่า 2 เท่าของใบพุทธรักษาปกติ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีน 6xHis-CaYSV-CP บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าโปรตีนที่มีความเข้มข้น 0.156 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ได้ด้วยวิธี Indirect-ELISA (ตารางที่ 16)

ผลการตรวจสอบเชื้อ CaYSV ในน้ำคั้นใบพุทธรักษา PHC-478 ที่เจือจางเปรียบเทียบกับโปรตีน 6xHis-CaYSV บริสุทธิ์ด้วยวิธี NCM-ELISA พบว่า แอนติบอดีที่ได้สามารถตรวจสอบไวรัสจากน้ำคั้นใบพุทธรักษาที่เจือจางได้สูงสุดถึง 1: 320 โดยสามารถมองเห็นตะกอนสีม่วงเข้มอย่างชัดเจน ค่าความเจือจางของน้ำคั้นที่ 1: 640 สามารถมองเห็นสีม่วงจาง แต่ไม่พบการเกิดตะกอนเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจสอบกับโปรตีน 6xHis-CaYSV-CP บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า โปรตีนที่มีความเข้มข้น 1.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถมองเห็นตะกอนที่เกิดจากปฏิกิริยาได้ (ภาพที่ 23)

จากผลการทดสอบความจำเพาะและความไวของการเกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ต่อเชื้อไวรัส CaYSV ด้วยวิธี Indirect ELISA และ NCM-ELISA เมื่อใช้โปรตีน 6xHis-CaYSV-CP บริสุทธิ์และน้ำคั้นพืชเป็นโรคในการทดสอบ พบว่าวิธี Indirect ELISA สามารถตรวจสอบไวรัสได้ในสารละลายที่มีค่าการเจือจางสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA ปัจจัยที่ทำให้ผลการทดสอบแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากปริมาณไวรัสในชิ้นพืชที่นำไปทดสอบและความไวของการตรวจสอบไวรัสในแต่ละวิธีการมีความแตกต่างกัน

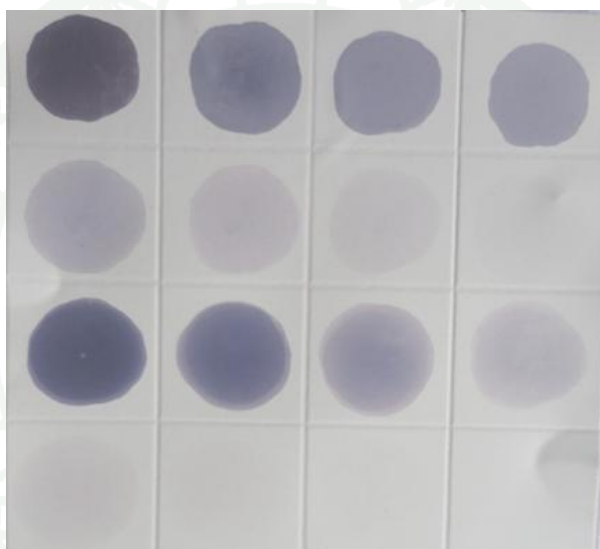
ตารางที่ 16 การตรวจสอบความไวของแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ต่อเชื้อ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรค และโปรตีน 6xHis-CaYSV-CP บริสุทธิ์ ตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA โดยใช้แอนติบอดี จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 เจือจาง 1: 1000 เท่า เตรียมน้ำคั้นพืชตั้งต้นเจือจาง 1:10 เท่า ใน coating buffer ที่เติม 0.2% sodium diethyldithiocarbamate

ความเจือจางของน้ำคั้นพืช	ค่า A_{405}	ความเข้มข้นของโปรตีน ($\mu\text{g/ml}$)	ค่า A_{405}
1: 10	0.7835	20	3.422
1: 20	0.6435	10	2.9115
1: 40	0.577	5	2.139
1: 80	0.5005	2.5	1.9285
1: 160	0.453	1.25	1.34
1: 320	0.443	0.625	0.7975
1: 640	0.3785	0.313	0.501
1: 1,280	0.342	0.156	0.319
1: 2,560	0.151	0.078	0.1395
1: 5,120	0.1095	0.039	0.0915
ไบพุทธรักษาปกติ	0.111	-	-
Coating buffer	0.096	-	-

หมายเหตุ ค่า A_{405} เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate
ค่า A_{405} ของตัวอย่างที่มากกว่าไบปกติ 2 เท่า ให้ผลการตรวจสอบเป็นบวก

PHC-478 1: 10	PHC-478 1: 20	PHC-478 1: 40	PHC-478 1: 80
PHC-478 1: 160	PHC-478 1: 320	PHC-478 1: 640	PHC-478 1: 1,280
Protein 20 µg/ml	Protein 10 µg/ml	Protein 5 µg/ml	Protein 2.5 µg/ml
Protein 1.25 µg/ml	Protein 0.625 µg/ml	Protein 0.313 µg/ml	Protein 0.156 µg/ml

ก



ข

ภาพที่ 23 ผลจากการตรวจสอบความไวของวิธี NCM-ELISA ในการตรวจสอบเชื้อ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) จากน้ำคั้นพืชเป็นโรคเฉื่อยเปรียบเทียบกับโปรตีน 6xHis-CaYSV-CP ใช้ PAb-CaYSV-CP เฉื่อยจาง 1:1000 เท่า เป็นแอนติบอดีเตรียมน้ำคั้นพืชเฉื่อยจาง 1:10 เท่าในบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.5

(ก) แผนผังการหยดน้ำคั้นใบพุทธรักษาเป็นโรค PHC-478 และโปรตีน 6xHis-CaYSV-CP

(ข) ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับตัวอย่าง เกิดตะกอนสีม่วงแสดงว่าเป็นผลบวก

การพัฒนาวิธีตรวจสอบไวรัสในพุทธรักษาโดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี

วิธี Indirect ELISA

แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP เจาะเลือดครั้งที่ 4 (#4) ที่นำมาใช้ ทำปฏิกิริยากับ CaYSV ในน้ำคั้นพืชที่ได้จากดอกพุทธรักษา PHC-51 ที่แสดงอาการต่าง ใบพุทธรักษา AK02, AK05, JJ04, PHC-CS และ PHC-478 วัดจากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร อ่านค่าได้ในช่วง 0.593-2.563 โดยตัวอย่างพุทธรักษา PHC-CS มีค่า ELISA ต่ำที่สุด ($A_{405} = 0.593$) ส่วนน้ำคั้นพืชปกติ ให้ค่า ELISA ในช่วง 0.124-0.137 (ตารางที่ 17)

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การใช้แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ที่ผลิตได้ในการทดลองนี้ร่วมกับวิธี Indirect ELISA สามารถใช้ตรวจสอบไวรัส CaYSV จากส่วนของใบและดอก พุทธรักษาเป็นโรคที่มาจากหลายแหล่งปลูก สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Chen และคณะ (2006) ที่ผลิตแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Calla lily latent virus* (CLLV) ซึ่งเป็นไวรัสในจีนัสไฟโตไวรัส ที่แยกได้จากต้นคาลาลิลลี (*Zantedeschia* spp.) และพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสด้วยวิธี Indirect ELISA พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อ CLLV จากต้นเป็นโรคที่สำรวจจากแหล่งปลูกในประเทศได้ทันทีโดยไม่ต้องทำปฏิกิริยากับพืชปกติ

วิธี NCM-ELISA

แอนติบอดีที่เจือจาง 1: 1,000 สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส CaYSV ได้ทั้งในใบ ก้านใบ ดอกและก้านดอกพุทธรักษาด้วยวิธีนี้ได้ผลดี มองเห็นตะกอนสีม่วงเข้มได้ชัดเจนที่สุด เมื่อทดสอบด้วยก้านใบพุทธรักษา PHC-51 และไม่เกิดปฏิกิริยาพุทธรักษาปกติ (ภาพที่ 24) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้วิธี NCM-ELISA เพื่อตรวจสอบไวรัส CaYSV จากส่วนต่างๆ ของพุทธรักษาเป็นโรคได้เช่นเดียวกับวิธี Indirect ELISA ซึ่ง Lizarraga และ Fernandez-Northcote (1989) ได้รายงานผลศึกษาความไวและประสิทธิภาพของวิธี NCM-ELISA ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Potato virus Y* (PVY) จากสายพันธุ์ไวพบว่าให้ผลเทียบเท่ากับการตรวจสอบด้วยวิธี DAS-ELISA

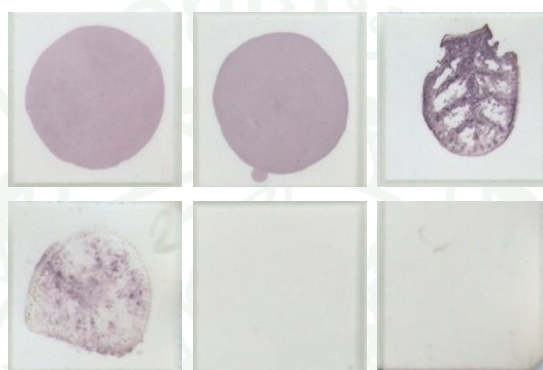
ตารางที่ 17 การใช้แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ตรวจสอบเชื้อ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) ในน้ำคั้นพืช ด้วยวิธี ELISA เจือจางแอนติบอดี 1: 1000 เท่า

ตัวอย่างพืช	ค่า A_{405}
ดอก PHC-51 ไม่ต่าง	0.1365
ดอก PHC-51 ต่าง	1.6235
ใบ PHC-CS	0.5925
ใบ PHC-478	1.7515
ใบ JJ04	1.684
ใบ AK02	2.563
ใบ AK05	2.211
ใบพุทธรักษาปกติ	0.1235
Coating buffer	0.096

หมายเหตุ ค่า A_{405} เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate
 ค่า A_{405} ของตัวอย่างที่มากกว่าใบพุทธรักษาปกติ 2 เท่า ให้ผลการตรวจสอบเป็น
 บวก

ใบ PHC-51	ดอก PHC-51	ก้านใบ PHC-51
ก้านดอก PHC-51	พุทธรักษา ปกติ	บัพเฟอร์

ก



ข

ภาพที่ 24 ผลการตรวจสอบเชื้อ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) ในชิ้นพืชและน้ำคั้นจากส่วนต่างๆ ของพุทธรักษาที่เป็นโรค เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA ใช้ PAb-CaYSV-CP เจือจาง 1:1000 เท่า เป็นแอนติบอดี

(ก) แผ่นผังการหยดน้ำคั้นและส่วนต่างๆ จากพุทธรักษาเป็นโรคบนแผ่นเมมเบรน

(ข) ผลการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับตัวอย่าง เกิดตะกอนสีม่วงแสดงว่าเป็นผลบวก

การพัฒนาวิธีตรวจสอบไวรัสในพุทธรักษาโดยใช้วิธี PCR

1. ความไวของการตรวจสอบไวรัสในพุทธรักษา

ผลการตรวจสอบไวรัสในดีเอ็นเอจากพุทธรักษา AB01 ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CaYMV-3 และ CaYMV-4 พบว่า ดีเอ็นเอพุทธรักษาที่เจือจางถึง 1: 800,000 เท่า ยังสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส CaYMV ได้ โดยพบการสังเคราะห์ยีนของเชื้อไวรัส CaYMV ขนาดประมาณ 565 คู่เบส (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 การทดสอบความไวของวิธี PCR ที่ใช้ตรวจสอบ *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) โดยเจือจางดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพุทธรักษาเป็นโรค AB01 และใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนของไวรัส ตรวจสอบผลจากดีเอ็นเอผลผลิตขนาด 565 คู่เบส

ค่าการเจือจางดีเอ็นเอ	ผลการตรวจด้วย PCR
1 : 10	+
1 : 100	+
1 : 1,000	+
1 : 10,000	+
1 : 100,000	+
1 : 200,000	+
1 : 400,000	+
1 : 800,000	+
1 : 1,000,000	-
1 : 10,000,000	-

หมายเหตุ (-) ตรวจไม่พบไวรัส; (+) ตรวจพบไวรัส

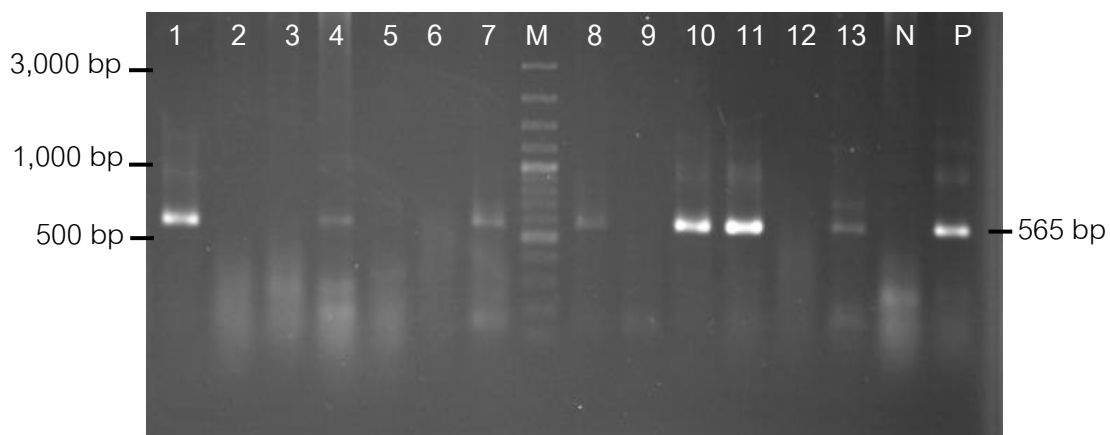
2. ประสิทธิภาพของการตรวจสอบไวรัสจากส่วนต่างๆ ของพืช

ดอกและรากพุทธรักษา

ผลการศึกษาพบว่า วิธีการ PCR ที่พัฒนาขึ้นและสายไพรเมอร์ CaYMV-3 และ CaYMV-4 ให้ดีเอ็นเอผลผลิตขนาด 565 คู่เบส ตรงตามที่คาดหมาย ทั้งในส่วนของดอก และราก (ภาพที่ 25) โดยพบว่าดอกพุทธรักษาจำนวน 5 ใน 8 ตัวอย่าง และรากพุทธรักษาจำนวน 2 ใน 4 ตัวอย่าง มีเชื้อ CaYMV (ตารางที่ 19)

ปลายยอดพุทธรักษา

ผลการทดสอบความแม่นยำในการตรวจไวรัส CaYMV จากปลายยอดพุทธรักษา AB01 ขนาด 0.5 และ 1.0 ซม. (ภาพที่ 26) โดยปลายยอดขนาดความยาว 1 เซนติเมตร (ภาพที่ 26 ก) ตรวจพบไวรัสได้จำนวน 5 หน่อจาก 10 หน่อ และปลายยอดขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตร (ภาพที่ 26 ข) สามารถตรวจพบไวรัสจำนวน 1 หน่อจากทั้งหมด 10 หน่อ (ตารางที่ 19)



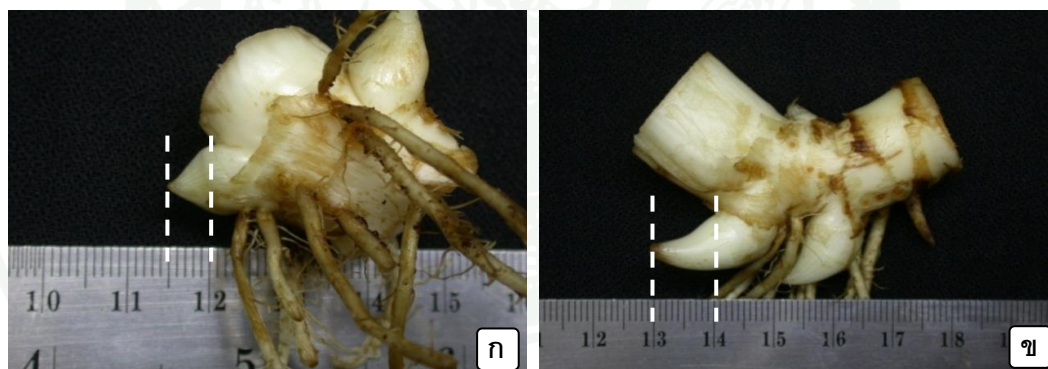
ภาพที่ 25 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide

ช่อง M	DNA marker (100 bp ladder, Fermentas)
ช่อง 1-3	รากพุทธรักษา AB01
ช่อง 4-7	ดอกพุทธรักษา AB01
ช่อง 8-13	ปลายยอดของพุทธรักษา AB01
ช่อง N	ใบพุทธรักษาปกติ
ช่อง P	ใบพุทธรักษาเป็นโรค AB01

ตารางที่ 19 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจสอบไวรัส *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) จากส่วนต่างๆ ของพุทธรักษา โดยใช้วิธี PCR

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนที่ตรวจพบ
ดอก	8	5
ราก	4	2
ปลายยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร	10	1
ปลายยอดขนาด 1 เซนติเมตร	10	5

หมายเหตุ ตัวอย่างดอก รากและปลายยอดของพุทธรักษา ได้จากต้นที่เป็นโรคที่ปลูกขยายพันธุ์ไว้ที่ภาควิชาโรคพืช กำแพงแสน



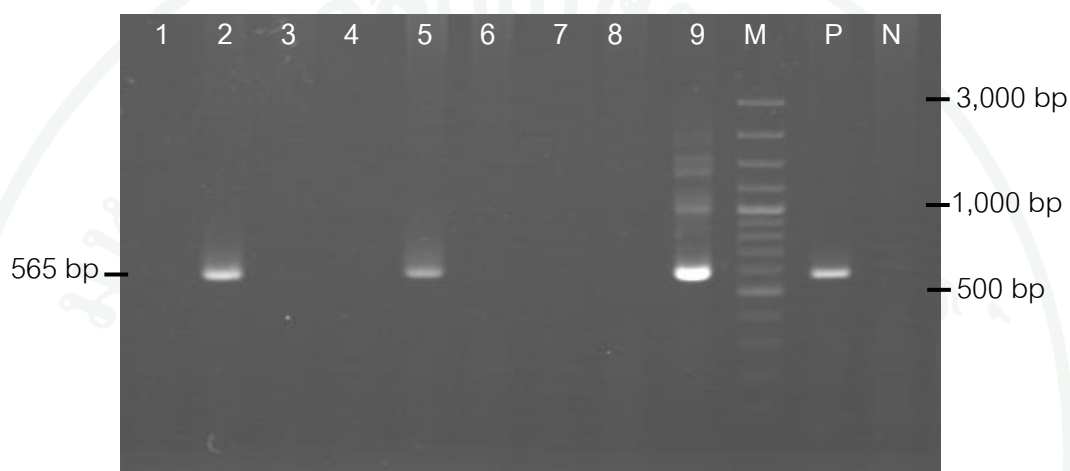
ภาพที่ 26 ขนาดของปลายยอดพุทธรักษาที่ใช้ทดสอบความแม่นยำในการตรวจไวรัสทั้งสองชนิด ด้วยวิธี PCR และ RT-PCR

(ก) ปลายยอดพุทธรักษา PHC-478 ขนาด 0.5 เซนติเมตร

(ข) ปลายยอดพุทธรักษา AB01 ขนาด 1 เซนติเมตร

ใบพุทธรักษาจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดเจริญ

ผลการตรวจเชื้อไวรัส CaYMV จากตัวอย่างใบพุทธรักษาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ปลายยอดเจริญจากต้นที่เป็นโรค พบการสังเคราะห์ดีเอ็นเอขนาด 565 คู่เบส (ภาพที่ 27) จากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบพุทธรักษา 10 ตัวอย่าง จาก 60 ตัวอย่าง



ภาพที่ 27 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide

ช่อง M	DNA marker (100 bp ladder, Fermentas)
ช่อง 1-9	ใบพุทธรักษาจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดเจริญ
ช่อง N	ใบพุทธรักษาปกติ
ช่อง P	ใบพุทธรักษาเป็นโรค AB01

จากการศึกษาการตรวจสอบไวรัส CaYMV สามารถใช้ส่วนของใบ ดอก รากและปลายยอดพุทธรักษา โดยการเลือกปลายยอดที่มีขนาดความยาว 1 เซนติเมตรเป็นต้นไปสามารถเพิ่มความแม่นยำในการตรวจสอบเชื้อไวรัส และวิธี PCR สามารถใช้ในการตรวจสอบไวรัสที่อาจติดมากับใบพุทธรักษาที่มาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดได้

การพัฒนาวิธีตรวจสอบไวรัสในพุทธรักษาโดยใช้วิธี RT-PCR

1. ความไวของวิธี RT-PCR

เมื่อเจือจางอาร์เอ็นเอพุทธรักษา PHC-478 และใช้เป็นต้นแบบสำหรับทำปฏิกิริยา RT-PCR โดย พบการสังเคราะห์ยีนของเชื้อ CaYSV จากอาร์เอ็นเอที่เจือจางได้ถึง 1: 1,000 เท่าของอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบพืช ทุกตัวอย่างให้ดีเอ็นเอผลผลิตขนาด 691 คู่เบส (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 การทดสอบความไวของวิธี RT-PCR ที่ใช้ตรวจสอบ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) โดยเจือจางอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบพุทธรักษาเป็นโรค PHC-478 และใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ยีนของไวรัส ตรวจสอบผลจากดีเอ็นเอผลผลิตขนาด 691 คู่เบส

ค่าความเจือจางอาร์เอ็นเอพุทธรักษา PHC-478	ผล RT-PCR (CaYSV)
1 : 10	+
1 : 100	+
1 : 1,000	+
1 : 2,000	-
1 : 4,000	-
1 : 8,000	-
1 : 10,000	-
1 : 100,000	-

หมายเหตุ (-) ตรวจไม่พบไวรัส; (+) ตรวจพบไวรัส

2. การตรวจสอบไวรัสในส่วนต่างๆ ของพืช

ดอกและรากพุทธรักษา

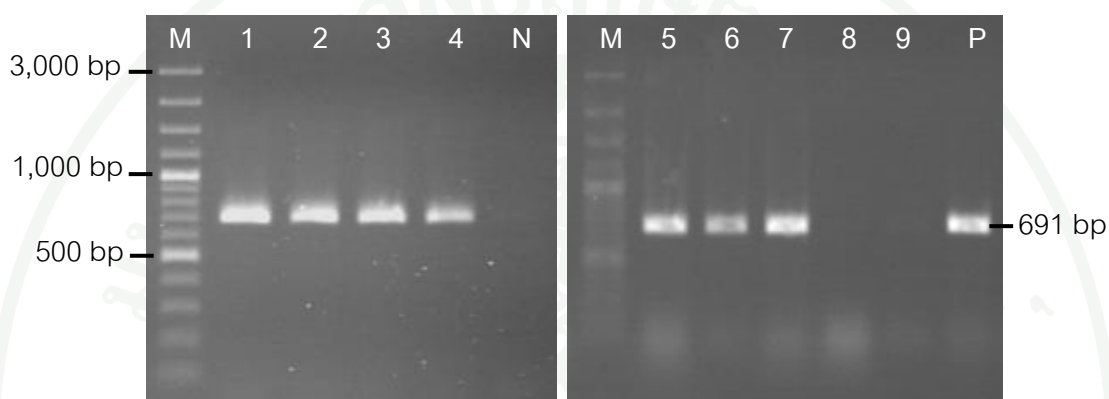
พบว่ามีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 691 คู่เบส (ภาพที่ 28) จากตัวอย่างดอกพุทธรักษา 6 ตัวอย่าง รวมทั้ง ส่วนปลายยอดขนาด 0.5 และ 1 เซนติเมตรทุกตัวอย่าง แต่ตรวจไม่พบเชื้อเมื่อใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากรากเป็นต้นแบบในการทำปฏิกิริยา (ตารางที่ 21) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าวิธีการ RT-PCR ที่นำมาใช้ มีความเหมาะสมกับส่วนดอก และปลายยอด แต่การตรวจจากรากไม่ประสบความสำเร็จ

ปัจจัยประการหนึ่งที่น่าจะมีผลต่อประสิทธิภาพของวิธีการตรวจไวรัส ได้แก่ แหล่งสะสมในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ และปริมาณของไวรัสภายในต้นพืช ซึ่งไม่มีความสม่ำเสมอกันทั่วทั้งต้นขึ้นกับชนิดของพืชอาศัยและระยะการเจริญเติบโตของพืช (Leisner *et al.*, 1993) กับช่วงที่ไวรัสจำลองสายอาร์เอ็นเอ หรือ ประกอบอนุภาค (Hull, 2007) Lunello และคณะ (2007) ได้ทดลองปลูกเชื้อ *Turnip mosaic virus* (TuMV) ในจี้นัส *Potyvirus* ให้ต้นอะราบิโดพซิส (*Arabidopsis thaliana*) เพื่อตรวจสอบปริมาณและการสะสมของอาร์เอ็นเอ โปรตีนห่อหุ้ม และอนุภาคไวรัส ภายในต้นพืช ผลปรากฏว่า การสะสมไวรัสผันแปรตามระยะการจำลองสายอาร์เอ็นเอ และการประกอบอนุภาค ในขณะที่ปริมาณไวรัสขึ้นกับระยะการพัฒนาของต้นพืชจากใบ เป็น ตา ยอด ดอก และการร่วงของใบและดอก และแนะนำว่าการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัส ควรรวบรวมส่วนต่างๆ ของพืชมาใช้เป็นตัวอย่าง มากกว่าจะใช้เพียงบางส่วน

ปลายยอดพุทธรักษา

การทดสอบความแม่นยำในการตรวจไวรัส CaYSV จากปลายยอดพุทธรักษา PHC-478 ด้วยวิธี RT-PCR พบว่า สามารถตรวจเชื้อไวรัสในปลายยอดทั้งสองขนาดได้อย่างแม่นยำ โดยตรวจพบไวรัสจากปลายยอดขนาดความยาว 0.5 เซนติเมตร จำนวน 10 จาก 10 ตัวอย่าง และจากปลายยอดขนาดความยาว 1 เซนติเมตร จำนวน 10 จาก 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 21)

จากการศึกษาการตรวจสอบไวรัส CaYSV จากส่วนต่างๆ ของพุทธรักษาด้วยวิธี RT-PCR พบว่า การใช้ส่วนของใบ ดอก และปลายยอดพุทธรักษาที่มีความยาวตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรเป็น ต้นไป สามารถให้ผลการตรวจสอบได้อย่างแม่นยำ แต่มีข้อจำกัดในการตรวจไวรัสจากราก พุทธรักษาเนื่องจากอาจมีการสะสมไวรัสอยู่ในปริมาณที่ไม่สามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค RT-PCR



ภาพที่ 28 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อตรวจสอบ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลดด้วย ethidium bromide

ช่อง M	DNA marker (100 bp ladder, Fermentas)
ช่อง 1-4	ดอกของพุทธรักษา PHC-478
ช่อง 5-7	ปลายยอดของพุทธรักษา PHC-478
ช่อง 8-9	รากของพุทธรักษา PHC-478
ช่อง N	ใบพุทธรักษาปกติ
ช่อง P	ใบพุทธรักษาเป็นโรค PHC-478

ตารางที่ 21 ผลการทดสอบประสิทธิภาพของการตรวจสอบไวรัส *Canna yellow streak virus* (CaYSV) จากส่วนต่างๆ ของพุทธรักษา โดยใช้วิธี PCR

ตัวอย่าง	จำนวนที่ตรวจ	จำนวนที่พบเชื้อ
ดอก	6	6
ราก	3	0
ปลายยอดขนาด 0.5 เซนติเมตร	10	10
ปลายยอดขนาด 1 เซนติเมตร	10	10

การผลิตพุทรักษาปลอดไวรัสโดยใช้เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากปลายยอดเจริญ

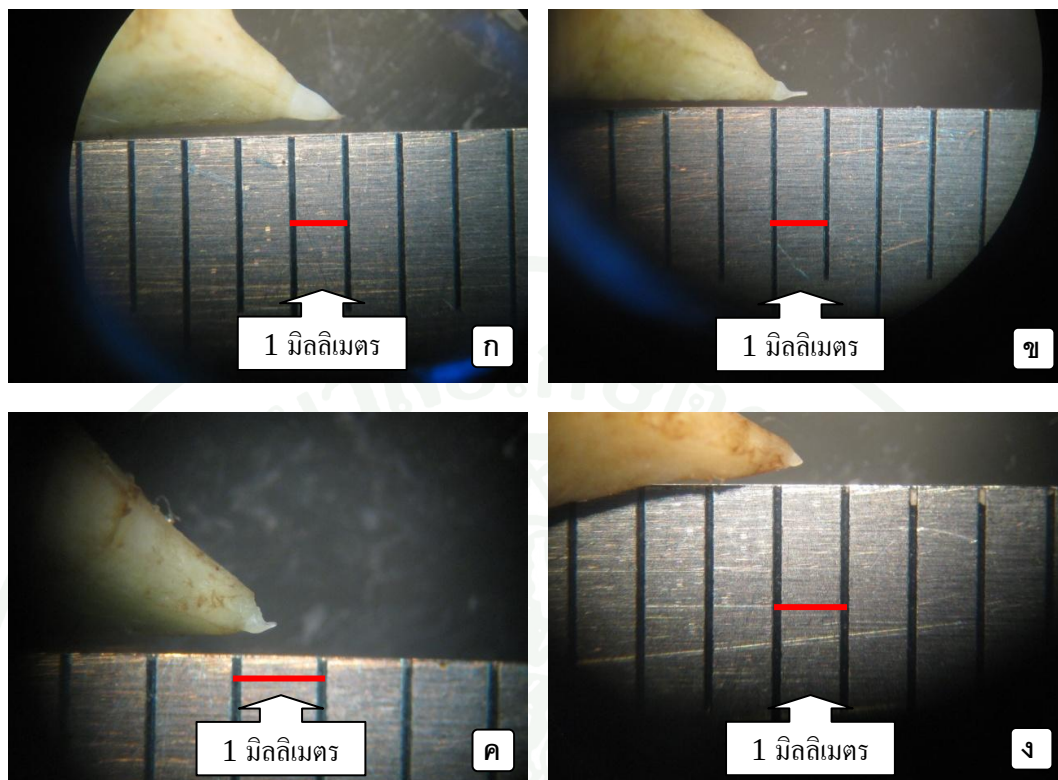
การฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนพุทรักษา

เทคนิคการฟอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนที่ได้มาจากแปลงปลูก ยังให้ผลไม่ดีเท่าที่ควร โดยพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียเมื่อนำมาเพาะเลี้ยง โดยได้ขึ้นส่วนเนื้อเยื่อ AB01 ปลอดเชื้อ 8 ชิ้น, AB03 14 ชิ้น, PHC-CS 7 ชิ้น, PHC-OC 12 ชิ้น, และ PHC-478 16 ชิ้น รวมเป็น 57 ชิ้น จาก 79 หน่อ คิดเป็นประสิทธิภาพของการฟอกฆ่าเชื้อ 72.15%

อาหารและสภาวะในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดเจริญ

ผลการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าเนื้อเยื่อเจริญที่ตัดให้มีขนาดน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร หรือ 0.5-1 มิลลิเมตร (ภาพที่ 29) มีอัตราการรอดชีวิตได้ถึง 100% เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตร 0.5xMS ที่เติม BA อัตรา 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร อีกทั้งสามารถชักนำให้เนื้อเยื่อเจริญของพุทรักษาที่มาจากการตัดขนาด 0.5-1 มิลลิเมตรมีการพัฒนาเป็นต้นได้ 24 ต้น จาก 31 ยอด คิดเป็น 77.42% ของจำนวนปลายยอดตั้งต้น ส่วนเนื้อเยื่อเจริญขนาดน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร มีการพัฒนาเป็นต้นได้ 9 ต้นจาก 26 ยอด คิดเป็น 34.62% (ตารางที่ 22) ลักษณะต้นอ่อนของพุทรักษาหลังจากการเพาะเลี้ยงปลายยอดเจริญนาน 8 สัปดาห์ ประกอบด้วยใบอ่อน 2-4 ใบ และมีความยาวจากโคนต้นจนถึงปลายใบอยู่ระหว่าง 5-9 เซนติเมตร (ภาพที่ 30)

เนื้อเยื่อเจริญของพุทรักษาที่มาจากการตัดขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร มีการเจริญเติบโตและพัฒนาได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดยอดสูงกว่าเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่อเจริญพุทรักษาที่มาจากการตัดขนาดน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร ซึ่งส่วนใหญ่ยังไม่สามารถนำมาตรวจสอบหาเชื้อไวรัสได้ด้วยวิธี PCR เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kromer และ Kukulczanka (1985) พบว่าเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของพุทรักษา *C.indica* ที่มีส่วนของ leaf primordia จำนวน 3-4 ชิ้น สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสังเคราะห์ MS ชนิดเหลว ความเข้มข้น 0.5 เท่า และมีการพัฒนาของใบและยอดดีกว่าเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดที่มีขนาดเล็กกว่า



ภาพที่ 29 ขนาดปลายยอดเจริญ(apical meristem) ของพุทธรักษาที่นำมาทดลองเพาะเลี้ยง
ในอาหารสังเคราะห์

(ก) และ (ข) ปลายยอดเจริญขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร

(ค) และ (ง) ปลายยอดเจริญขนาดน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร

ตารางที่ 22 การเจริญของเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของพุทธรักษาในอาหารเหลวสูตร 0.5x MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร นับจำนวนเนื้อเยื่อหลังจากเพาะเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์

รหัสตัวอย่าง	ขนาดปลายยอด (มิลลิเมตร)	การพัฒนาของเนื้อเยื่อเจริญ		
		จำนวนเริ่มต้น	จำนวนรอด	จำนวนการเกิดยอด
AB01	0.5-1	12	9	9
AB01	<0.5	8	5	3
AB03	0.5-1	5	5	5
AB03	<0.5	3	3	1
PHC-478	0.5-1	12	8	4
PHC-478	<0.5	10	8	0
PHC-CS	0.5-1	4	2	0
PHC-CS	<0.5	8	5	0
PHC-OC	0.5-1	10	7	6
PHC-OC	<0.5	7	5	5



ภาพที่ 30 ต้นอ่อนพุทธรักษาที่พัฒนามาจากปลายยอดเจริญหลังจากทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร 0.5xMS นาน 8 สัปดาห์
 (ก) เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อปลายยอดเจริญขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร
 (ข) และ (ค) เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อปลายยอดเจริญขนาดน้อยกว่า 0.5 มิลลิเมตร

ตรวจสอบการปลอดโรคของพุทธรักษา

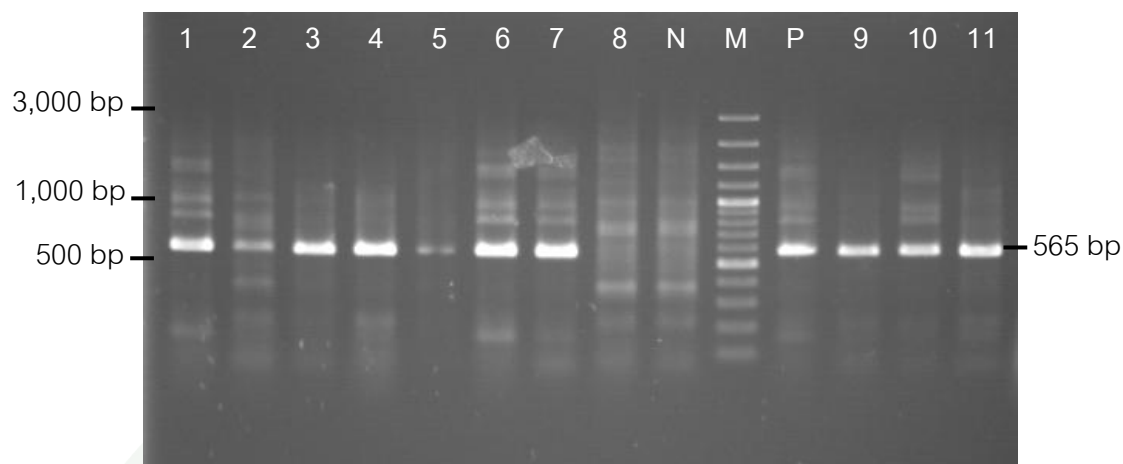
ผลการตรวจหาเชื้อ CaYMV ในใบพุทธรักษา AB01 และ AB03 จากวิทยาเขตบางเขน ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดด้วยวิธี PCR จาก 18 ตัวอย่าง พบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 565 คู่เบส ในพุทธรักษา 15 ตัวอย่าง (ภาพที่ 31) ได้จำนวนต้นปลอดเชื้อ 3 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราปลอดโรค 16.67% (ตารางที่ 23) ผลการใช้เทคนิค RT-PCR ตรวจหาเชื้อ CaYSV ในใบพุทธรักษาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดตัวอย่าง PHC-478 และ PHC-OC จากบริษัทเอกชน รวม 15 ตัวอย่าง ด้วยไพรเมอร์ CannaSVF1 และ CannaSVF2 พบการสังเคราะห์แถบดีเอ็นเอขนาด 691 คู่เบส ในพุทธรักษา 4 ตัวอย่าง (ภาพที่ 32) ได้จำนวนต้นปลอดเชื้อ 11 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตราปลอดโรค 73.33% (ตารางที่ 23)

การตรวจสอบไวรัส CaYMV และ CaYSV จากใบพุทธรักษาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดสามารถใช้วิธี PCR และ RT-PCR เนื่องจากมีความแม่นยำในการตรวจสอบการคงอยู่ของไวรัสได้

ตารางที่ 23 พุทธรักษาปลอดโรคไวรัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด เมื่อ
ตรวจสอบไวรัส *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) และ *Canna yellow*
streak virus (CaYSV) โดยใช้วิธี PCR และ RT-PCR

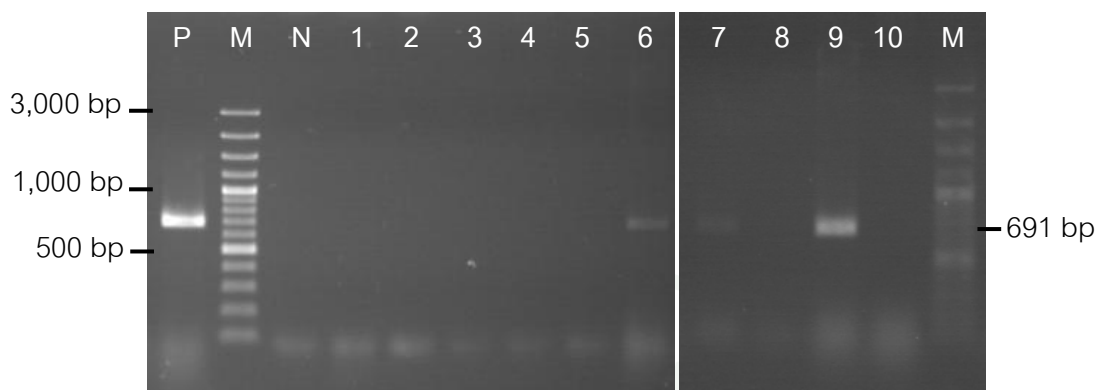
CaYMV			
ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนที่ปลอดเชื้อ	อัตราปลอดเชื้อ (%)
AB01	12	1	8.33
AB03	6	2	33.33
CaYSV			
PHC-478	4	2	50
PHC-OC	11	9	81.81

หมายเหตุ AB01, AB03; พุทธรักษาจากวิทยาเขตบางเขนที่ตรวจพบไวรัส CaYMV
PHC-478, PHC-OC; พุทธรักษาจากบริษัทเอกชนที่ตรวจพบไวรัส CaYSV



ภาพที่ 31 แอปดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide

- | | |
|-----------|--|
| ช่อง M | DNA marker (100 bp ladder, Fermentas) |
| ช่อง N | ตัวอย่างใบพุทธรักษาปกติ |
| ช่อง P | ตัวอย่างใบพุทธรักษาเป็นโรค |
| ช่อง 1-6 | ใบพุทธรักษาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตัวอย่าง AB01 |
| ช่อง 7-11 | ใบพุทธรักษาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตัวอย่าง AB03 |



ภาพที่ 32 แถบดีเอ็นเอผลผลิตที่สังเคราะห์ขึ้นในปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจสอบ *Canna yellow streak virus* (CaYSV) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide

ช่อง M DNA marker (100 bp ladder, Fermentas)

ช่อง N ตัวอย่างใบพุทธรักษาปกติ

ช่อง P ตัวอย่างใบพุทธรักษาเป็นโรค

ช่อง 1-6 ใบพุทธรักษาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตัวอย่าง PHC-OC

ช่อง 7-10 ใบพุทธรักษาจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อตัวอย่าง PHC-478

สรุป

พบการระบาดของโรคไวรัสในพุทธรักษาที่เก็บจากแหล่งปลูกต่าง ๆ ในประเทศไทย โดยจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนนทบุรี ตลาดจตุจักร และจากบริษัทเอกชน พบเชื้อ CaYMV ในอัตรา 59.09 % จากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ตลาดจตุจักร และบริษัทเอกชน พบเชื้อ CaYSV ในอัตรา 13.63 % พุทธรักษาที่ถูกไวรัส CaYMV เข้าทำลายแสดงอาการใบต่างจุดเหลือง ใบต่างขีดเหลือง ต่างเป็นขีดมีแผลเนื้อเยื่อตาย เนื้อใบต่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ดอกต่าง ดอกเล็กและเสียรูปทรง ต้นแคระแกร็น และไม่แสดงอาการของโรค ตัวอย่างที่พบเชื้อ CaYSV แสดงอาการเนื้อใบต่างจุดเหลืองมองเห็นไม่ชัดเจนและไม่แสดงอาการของโรค อนุภาคของเชื้อไวรัส CaYSV ที่พบในพุทธรักษา PHC-478 และ PHC-51 เป็นแบบท่อนยาวคด ความยาวอนุภาคโดยเฉลี่ย 650 นาโนเมตร

จำแนกดีเอ็นเอขนาด 565 นิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CaYMV จากพุทธรักษา AB01(วิทยาเขตบางเขน), JJ01(ตลาดจตุจักร), AK10(วิทยาเขตกำแพงแสน), PHC-BD, PHC-CS และ PHC-51(บริษัทเอกชน) เป็นยีนบางส่วนของ ORFIII แปลรหัสให้กรดอะมิโนจำนวน 188 เรซิดิวส์ เป็นไอโซเลทที่คล้ายคลึงกับ CaYMV ที่พบในประเทศออสเตรเลียและอิตาลีที่ระดับ 97% identity เมื่อเปรียบเทียบจากสายสัมพันธ์และลำดับกรดอะมิโน แบ่งกลุ่มของไอโซเลทที่พบได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มของไอโซเลท AB01, JJ01 และ AK10 มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่ระดับ 95-98% identity กลุ่มที่สองประกอบด้วยไอโซเลท PHC-BD, PHC-CS และ PHC-51 มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนที่ระดับ 98-100% identity

จำแนกดีเอ็นเอขนาด 864 นิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CaYSV จากพุทธรักษา AK02 เป็นยีน CP แปลรหัสให้กรดอะมิโนจำนวน 287 เรซิดิวส์ตามลำดับ เป็นไอโซเลทที่คล้ายคลึงกับ CaYSV ที่พบในประเทศอังกฤษและอิสราเอลที่ระดับ 95-98% identity และยีนขนาด 1,256 นิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CaYSV จากพุทธรักษา PHC-478 แปลรหัสให้กรดอะมิโนจำนวน 361 เรซิดิวส์ เป็นไอโซเลทที่คล้ายคลึงกับ CaYSV ที่พบในประเทศอังกฤษและอิสราเอลที่ระดับ 87-91% identity

ผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีน 6xHis-CaYSV ของเชื้อ CaYSV น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 34 กิโลดาลตัน ความเข้มข้น 1.34 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อแอนติบอดี PAb-CaYSV-CP พบว่าค่าความเจือจางสูงสุดที่ยังคงให้ผลบวกจากการเจาะเลือดครั้งที่ 1-5 มีค่าใกล้เคียงกันที่ 1: 204,800 และมีค่า 1: 51,200 เมื่อใช้น้ำคั้นใบพุทธรักษาเป็นแอนติเจน แอนติบอดี PAb-CaYSV-CP ที่ผลิตได้มีความจำเพาะในการตรวจสอบเชื้อ CaYSV ในน้ำคั้นจากใบ ดอก ก้านใบ ก้านดอกพุทธรักษาที่ติดเชื้อ สามารถตรวจสอบไวรัสจากน้ำคั้นใบพุทธรักษาเป็นโรคที่เจือจางได้สูงสุด 1: 320 และเกิดปฏิกิริยากับโปรตีนที่ความเข้มข้นต่ำสุด 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นใบพุทธรักษาปกติเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี Indirect ELISA และ NCM ELISA

เทคนิค PCR สามารถตรวจสอบไวรัส CaYMV ได้อย่างแม่นยำในใบ ดอก ราก ปลายยอดของพุทธรักษาที่เป็นโรคขนาดความยาว 1 เซนติเมตรเป็นต้นไปและใบพุทธรักษาที่มาจาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด และสามารถตรวจสอบไวรัส CaYMV จากดีเอ็นเอ พุทธรักษาที่เจือจางได้สูงสุดถึง 1: 800,000 เท่า

เทคนิค RT-PCR สามารถตรวจสอบไวรัส CaYSV ในใบ ดอกและปลายยอดขนาดความยาวตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรของพุทธรักษาที่เป็นโรคและใบพุทธรักษาที่มาจาก การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอด และสามารถตรวจสอบไวรัส CaYSV จากอาร์เอ็นเอพุทธรักษาที่เจือจางได้สูงสุดถึง 1: 1,000 เท่า

การพอกฆ่าเชื้อหน่ออ่อนของพุทธรักษาที่ความเข้มข้นของสารละลายคลอรีน 20% นาน 15 นาที สามารถลดอัตราการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้ 72.15% และเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายยอดของพุทธรักษาที่ตัดขนาด 0.5-1 มิลลิเมตร สามารถผลิตต้นพันธุ์พุทธรักษาปลอดโรคไวรัส CaYMV ได้ 16.67% เมื่อตรวจด้วยวิธี PCR และปลอดไวรัส CaYSV ได้ 73.33% เมื่อตรวจด้วยวิธี RT-PCR โดยพุทธรักษาสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเหลวสูตร MS ที่ลดความเข้มข้นลงครึ่งหนึ่งและเติม BA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกู. 2544. การตรวจสอบเชื้อ PVY ด้วยวิธี NCM-ELISA และจัดทำเป็นชุดตรวจสอบ, น. 139-146. ใน เทคโนโลยีชีวภาพกับงานวิจัยด้านการเกษตร. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ ฯ.
- มณีรัตน์ คุณาพิทักษ์ธรรม และรัชนี ฮงประยูร. 2547. ความผันแปรของลักษณะอาการบนพืชอาศัยที่เกิดจากเชื้อไวรัสใบด่างแตงในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร 35 (5-6)(พิเศษ): 207-214.
- Ahlawat, Y.S., A. Varma, R.P. Pant, A. Shukla and B.E. Lockhart. 1996. Partial characterization of a badnavirus associated with citrus yellow mosaic disease in India, pp. 208–217. *In Thirteenth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. University of California Press, California.
- Agindotan B.O., S. Winter, D. Lesemann, A. Uwaifo, H.D. Mignouna, J.d'A. Hughes and G. Thottappilly. 2006. Diversity of banana streak-inducing viruses in Nigeria and Ghana: twice as many sources detected by immunoelectron microscopy (IEM) than by TAS-ELISA or IC-PCR. *African Journal of Biotechnology* 5: 1194–1203.
- Balasingam, G., N. Ellison, K. S. Milne and R.L.S. Forster. 1988. Sensitive and specific detection of two filamentous viruses from nerines using cloned cDNA probes. *Acta Horticulturae* (ISHS) 234:267-274.
- Blencowe, J. W. and J. Caldwell. 1949. Aspermy, a new virus disease of the tomato. *Annals of Applied Biology* 36:320-326.

- Bong, N. C., G. S. Choi and Y. M. Choi. 1999. Identification of *Tomato Aspermy Virus* (TAV) and *Chrysanthemum Virus B* (CVB) from *Dendranthema indicum* in Korea. **Plant Pathology Journal** 15(2): 119-123.
- Boonham, N., K. Walsh, P. Smith, K. Madagan, I. Graham and I. Barker. 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: towards a generic method for plant viral disease diagnosis. **Journal of Virological Methods** 108:181-187.
- Borroto -Fernandez, E.G., F. Maghuly and M. Laimer. 2008. Determination of viral infections in an Austrian collection of *Canna indica*. **Journal of Plant Diseases and Protection** 115(3): 102-103.
- Bos L. 1970. Bean yellow mosaic virus. AAB Descriptions of Plant Viruses No. 40. Available Source: <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=040>, August 20, 2012.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.
- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine. **Plant Molecular Biology Reporter** 11: 113-116.
- Charnsri, R., C. Puttanlek, V. Rungsardthong and D. Uttapap. 2005. Characteristics of clear noodles prepared from edible canna starches. **Journal of Food Science** 70(5): 337-342.

- Chen, C.C., H.T. Hsu, Y.H. Cheng, C.H. Huang, J.Y. Liao, H.T. Tsai and C.A. Chang. 2006. Molecular and serological characterization of a distinct potyvirus causing latent infection in calla lilies. **Botanical Studies** 47: 369–378.
- Colosi, J. C. and B. A. Schaal. 1993. Tissue grinding with ball bearing and vortex mixer for DNA extraction. **Nucleic Acids Research** 21: 1051-1052.
- Cooke I. 2001. **The Gardener's Guide to Growing Cannas**. Timber Press, USA.
- Dewi, K., W. Trisunaryanti and E.S. Soetarto. 2010. Development of bioethanol production from canna (*Canna edulis* Ker.) rhizome. **International Conference on Biology, Environment and Chemistry** 1(2011): 237-240.
- Doolittle, S.P. 1920. The mosaic disease of cucurbits. **United States Department of Agriculture Bulletin** 879: 1-69.
- Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L. A. Ball. 2005. **Virus Taxonomy**. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- Fisher, J. R., M.-C. Sanchez-Cuevas, S. T. Nameth, V. L. Woods and C. W. Ellett. 1997. First Report of *Cucumber Mosaic Virus* in *Eryngium amethystinum*, *Canna* spp., and *Aquilegia* hybrids in Ohio. **Plant Disease** 81(11): 1,331.3- 1,331.3.
- Fletcher, J. C. 2002. Shoot and floral meristem maintenance in Arabidopsis. **Annual Review of Plant Biology** 53: 45-66.

- Frenkel, M. J., C.W. Ward and D.D. Shukla. 1989. The use of 3' noncoding nucleotide sequences in the taxonomy of potyviruses: Applications to watermelon mosaic virus 2 and soybean mosaic virus-N. **Journal of General Virology** 70:2775-2783.
- Galal, A.M.M. 2005. Biological and serological studies on an isolate of dwarf mosaic potyvirus infecting maize plant. **International Journal of Agriculture & Biology** 7: 701-704.
- Gray J. and M. Grant. 2003. **RHS Plant Trials and Awards; Canna**. Royal Horticultural Society. UK.
- Gussow, D. and T. Clackson. 1989. Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. **Nucleic Acids Research** 17, 4000.
- Hammond, J. 2011. Universal plant virus microarrays, broad spectrum PCR assays, and other tools for virus detection and identification. **Acta Horticulturae**. (ISHS) 901:49-60.
- Harrison, B.D. 2002. Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. **Euphytica** 124: 181–192.
- Hosoki, T. and H. Sasaki. 1991. *In vitro* propagation of *Canna edulis* Ker. by longitudinal shoot-split method. **Plant Tissue Culture Letter** 8(3): 175-178.
- Hull, R. 2002. **Matthews's Plant Virology**. 4th ed. Academic Press, San Diego.

- Kamer, H. M. D. and P.J.M. Maas. 2008. The Cannaceae of the world. **BLUMEA** 53: 247-318.
- Kromer, K. and K. Kukulczanka. 1985. In vitro cultures of meristem tips of *Canna indica*, L. **Acta Horticulturae** 167: 279-285.
- Kumar, S., M.S. Khan, S.K. Raj and A.K. Sharma. 2009. Elimination of mixed infection of *Cucumber mosaic* and *Tomato aspermy virus* from *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Pooja by shoot meristem culture. **Scientia Horticulturae** 119(2): 108-112.
- Lawal, I. O., N. E. Uzokwe, A. B. I. Igboanugo, A. F. Adio¹, E. A. Awosan, J. O.Nwogwugwu, B. Faloye, B. P. Olatunji and A. A. Adesoga. 2010. Ethno medicinal information on collation and identification of some medicinal plants in Research Institutes of South-west Nigeria. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology** 4(1): 001-007.
- Leisner, S. M., R. Turgeon and S.H. Howell. 1993. Effects of host plant development and genetic determinants on the long distance movement of Cauliflower mosaic virus in Arabidopsis. **Plant Cell** 5:191-202.
- Lilien-Kipnis, H., A. Stein and S. Levy. 1992. The course of *Bean yellow mosaic virus* elimination from Gladiolus by meristem tip culture. **Acta Horticulturae** 325.2: 709-717.
- Lin H., L. Rubio, A. Smythe and B. Falk. 2004. Molecular population genetics of *Cucumber mosaic virus* in California: evidence for founder effects and reassortment. **Journal of Virology** 78: 6666–6675.

- Lizarraga, C. and E.N. Fernandez-Northcote. 1989. Detection of potato viruses X and Y in sap extracts by a modified indirect enzymelinked immunosorbent assay on nitrocellulose membranes (NCM-ELISA). **Plant Disease** 73:11-14.
- Lizarraga, R., A. Panta, U. Jayasinghe and J. H. Dodds. 1991. Tissue culture for elimination of pathogens. **CIP Research Guide 3**. International Potato Center (CP), Lima, Peru.
- Lockhart, B. E. L. 1988. Occurrence of *Canna yellow mottle virus* in North America. **Acta Horticulturae** 234: 69-72.
- Lockhart, B. E. L. and L.J.C. Autrey. 1988. Occurrence in sugarcane of a bacilliform virus related serologically to banana streak virus. **Plant Disease** 72: 230-233.
- Lunello, P., M. Carmen, S. Flora and F. Ponz. 2007. A Developmentally Linked, Dramatic, and Transient Loss of Virus from Roots of *Arabidopsis thaliana* Plants Infected by Either of Two RNA Viruses. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 20 (12):1589-1595.
- Marino, MT., E. Ragozzino, B. E. L. Lockhart, R. Miglino and D. Alioto. 2007. **First report of *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) in Italy and in The Netherlands.** New Disease Report. Available: <http://www.bspp.org.uk/publications/new-disease-reports/july2007/2007-08.asp>, February 28, 2009.
- Momol, M. T., B. E. L. Lockhart, H. Dankers and S. Adkins. 2004. ***Canna yellow mottle virus* detected in canna in Florida.** Plant Health Progress. Available: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/brief/2004/canna/>,

February 28, 2009.

- Monger, W. A., I. P. Adams, R. H. Glover and B. Barrett. 2010. The complete genome sequence of *Canna yellow streak virus*. **Archives of Virology** 155: 1515–1518.
- Monger, W.A., V. Harju, A. Skelton, S. E. Seal and R. A. Mumford. 2007. *Canna yellow streak virus*: a new potyvirus associated with severe streaking symptoms in canna. **Archives of Virology** 152: 1527-1530.
- Mori, K. and D. Hosokawa. 1977. Localization of viruses in apical meristem and production of virus-free plants by means of meristem and tissue culture. **Acta Horticulturae** 78: 38- 396.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology of Plants** 15: 473-497.
- O'Reilly, D., C. J. R. Thomas and R. H. A. Coutts. 1991. *Tomato aspermy virus* has an evolutionary relationship with other tripartite RNA plant viruses. **Journal of General Virology** 72: 1-7.
- Pappu, H. R., K. B. Druffel and K. C. Eastwell. 2008. *Canna yellow mottle virus* in *Canna* spp. in Washington State. **Plant Disease** 92(7): 1,136.3-1,136.3.
- Parakh, D.R., A.M. Shamloul, A. Hadidi, H. E. Waterworth, S. W. Scott, H. E. Howell and G. I. Mink. 1995. Detection of prune dwarf ilarvirus from infected stone

fruits using reverse transcription-polymerase chain reaction. **Acta Horticulturae** (ISHS) 386:421-430.

Patra, B., L. Acharya, A. K. Mukherjee, M. K. Panda and P. C. Panda. 2008.

Molecular characterization of ten cultivars of Canna lilies (*Canna* Linn.) using PCR based molecular markers (RAPDs and ISSRs). **International Journal of Integrative Biology** 2(2): 129-137.

PROTA. 2011. **African ornamentals**; Proposals and examples. Plant Resources of Tropical Africa. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands. 56 pp.

Qin, Z. D., Q. Z. Mao, A. P. Ding, L. L. Jin, W. J. Peng, Z. Y. Du, S. S. Shentu and J. S. Chen. 2010. Sequence characterization and molecular detection of the 3'-terminal region of *Bean yellow mosaic virus* infecting Canna. **4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering** 3: 3015-3018.

Ramadass, P., M. Parthiban, V. Thiagarajan, M. Chandrasekar, N.M. Vidhya and G.D. Raj. 2008. Development of single serum dilution ELISA for detection of infectious bursal disease virus antibodies. **Veterinarski Arhiv** 78: 23-30.

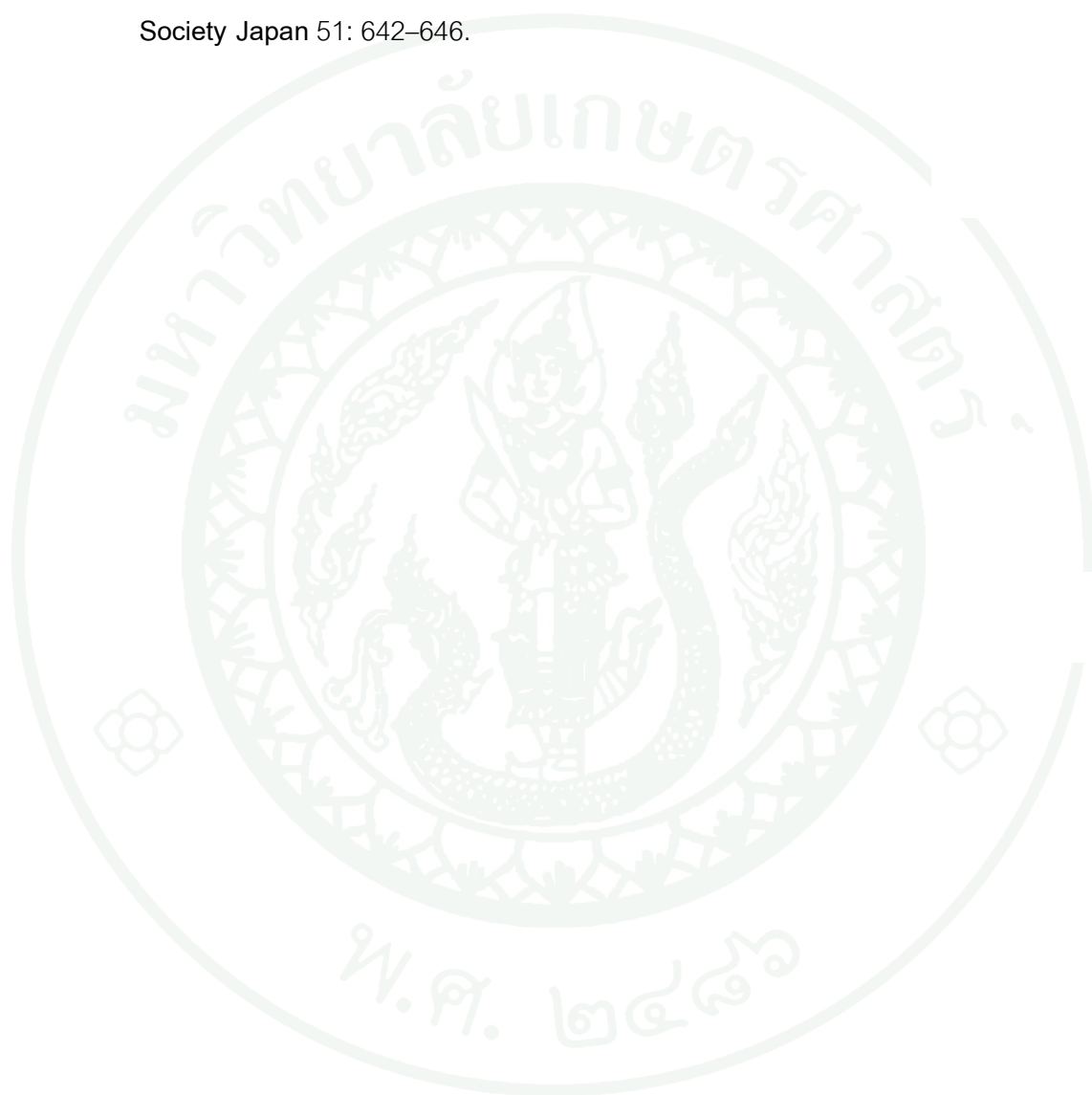
Roossinck, M.J., L. Zhang and K. Hellward. 1999. Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of Cucumber mosaic virus RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. **Journal of Virology** 76: 6752-6758.

Sambrook, J. and D. W. Russel. 2001. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Sanjuan, R., P. Agudelo-Romero and S. F. Elena. 2009. Upper limit mutation rate estimation for a plant RNA virus. **Biology Letter** 5:394–396.
- Scott, S.W., V. Bowman-Vance and E. J. Bachman. 1992. The use of nucleic acid probes for the detection of *Prunus necrotic ringspot virus* and *Prune dwarf virus*. **Acta Horticulturae** (ISHS) 309:79-84.
- Skelton, A., M. Daly, T. Nixon, V. Harju and R. A. Mumford. 2007. First record of *Bean yellow mosaic virus* infecting a member of the orchid genus *Dactylorhiza*. **Plant Pathology** 56(2): 344.
- Sobczykiewicz, D. 1979. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free strawberry plants. **Acta Horticulturae** 95: 79-82.
- Spiegel, S. 1996. Control of virus diseases in vegetatively propagated ornamental crops. **Acta Horticulturae** 432: 156-164.
- Stein, A., A. Rosner and J. Hammond. 1994. Detection of *Bean yellow mosaic virus* in gladioli corms. **Acta Horticulturae** 377: 209-220.
- Tanaka N., N. Inouchi and T. Koyama. 2006. Edible canna and its starch: an under-exploited starch-producing plant resource. **Foods Food Ingredients J. Jpn.** 221.
- Verma, N., K. Kumar, S. Kulshrestha, G. Raikhy, V. Hallan, R. Ram, A.A. Zaidi and I.D. Garg. 2006. Detection and molecular characterization of a Tomato aspermy virus isolate infecting chrysanthemums in India. **Acta Horticulturae** 722: 41-53.

Walkey, D. G. A. 1980. Production of virus-free plants. *Acta Horticulturae* 88: 23-31.

Yamashita S., T. Natsuaki, Y. Doi and K. Yora. 1985. Canna yellow mottle virus, a non-enveloped small-bacilliform virus in *Canna* sp. *Annual Phytopathology Society Japan* 51: 642-646.





การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในเทคนิค ELISA และ DIBA

1. General extraction buffer (GEB3; Agdia)

Sodium sulfite(anhydrous)	1.3 กรัม
Polyvinylpyrrolidone(PVP)	20 กรัม
Sodium azide	0.2 กรัม
Powdered egg(chicken) albumin	2.0 กรัม
Tween-20	20 มิลลิลิตร
ละลายใน 1XPBST ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 เก็บไว้ที่	

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. General extraction buffer (Neogen)

Polyvinylpyrrolidone(PVP)	20 กรัม
Ovalbumin	2 กรัม
Sodium sulphite (anhydrous)	1.3 กรัม
Sodium azide	0.2 กรัม
Tween 20	20 มิลลิลิตร
Sodium chloride	8 กรัม
Potassium diHydrogen orthophosphate	0.2 กรัม
diSodium Hydrogen orthophosphate	1.15 กรัม
Potassium chloride	0.2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร

3. Coating buffer

Na_2CO_3	1.59 กรัม
NaHCO_3	2.93 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 9.6 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส

4. Phosphate buffer saline (PBS buffer)

NaCl	8.0 กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 กรัม
KH_2PO_4	0.2 กรัม
KCl	0.2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4

5. PBST buffer

PBS buffer	1,000 มิลลิลิตร
Tween-20	0.5 มิลลิลิตร

6. RUB6 enzyme conjugate diluents buffer (Agdia)

Bovine serum albumin	2 กรัม
Polyvinylpyrrolidone(PVP)	20 กรัม
Sodium azide	0.2 กรัม

ละลายใน 1XPBST ปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.4 เก็บไว้ที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. Conjugate buffer (Neogen)

Bovine serum albumin	0.2 กรัม
PBST	100 มิลลิลิตร

8. Diethanolamine buffer

Diethanolamine	97 มิลลิลิตร
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.1 กรัม
NaN_3	0.2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้าย 1,000 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ to 9.8 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในขวดสีชาหรือในที่มืด

9. Substrate buffer

<i>p</i> -nitrophenyl phosphate	1 มิลลิกรัม
Diethanolamine buffer	1 มิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสกัดกรดนิวคลีอิก

1. DNA extraction buffer (CTAB buffer)

CTAB	2%
NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM
Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM

2. TE buffer

Tris-HCl (pH 8.0)	10 mM
EDTA (pH 8.0)	1 mM

3. CIA (CHISAM)

chloroform: isoamylalcohol	24: 1 (v/v)
----------------------------	-------------

4. RNA extraction buffer (CTAB buffer)

CTAB	2%
PVP (polyvinylpyrrolidone 40T)	2%
Tris-HCl, pH 8.0	100 mM
EDTA	25 mM

NaCl 2 M

ละลายในน้ำที่กำจัด RNase (DEPC-dH₂O) ปริมาตรสุดท้าย 500 มิลลิลิตร

5. SSTE

NaCl 11.7 กรัม

SDS 0.5 %

Tris-HCl, pH 8.0 10 mM

EDTA 1mM

ละลายในน้ำที่กำจัด RNase (DEPC-dH₂O) ปริมาตรสุดท้าย 200 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

Thyptone 10 กรัม

Yeast extract 10 กรัม

NaCl 5 กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สำหรับ LB agar ให้เติม agar 15 กรัมต่อลิตร

2. 2xYT broth

Thyptone 16 กรัม

Yeast extract 10 กรัม

NaCl 5 กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การเตรียมสารเคมีในการตรวจสอบโปรตีน

1. Bradford's reagent

0.01% Coomassie brilliant blue G250	0.1 กรัม
10% Phosphoric acid	100 มิลลิลิตร

ซึ่ง Coomassie brilliant blue G250 และละลายด้วย 95% ethanol ปริมาตรเล็กน้อย ก่อนและตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นกรองผ่านกระดาษ Whatman No.1 และห่อด้วย aluminium foil เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 2X SDS-PAGE sample buffer

0.2 M Tris, pH 6.8	6.25 มิลลิลิตร
10% SDS	40 มิลลิลิตร
0.02% Bromophenol blue	0.02 กรัม
16% Glycerol	16 มิลลิลิตร
5% 2-Mercapto ethanol	5 มิลลิลิตร

ซึ่งและตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3. 5X SDS-PAGE running buffer

Tris base	15.1 กรัม
Glycine	94 กรัม
10% (w/v) SDS	50 มิลลิลิตร

ซึ่งและตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. Tris-glycine SDS-PAGE 5% Stacking

H ₂ O	2.7 มิลลิลิตร
1 M Tris, pH 6.8	0.5 มิลลิลิตร
30% Polyacrylamide	0.67 มิลลิลิตร
10% SDS	0.04 มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.04 มิลลิลิตร
TEMED	0.004 มิลลิลิตร

ตวงส่วนผสมตามปริมาตรข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 4 มิลลิลิตร

5. Tris-glycine SDS-PAGE 12% Separating

H ₂ O	3.3 มิลลิลิตร
1 M Tris, pH 8.8	2.5 มิลลิลิตร
30% Polyacrylamide	4.0 มิลลิลิตร
10% SDS	0.1 มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.1 มิลลิลิตร
TEMED	0.004 มิลลิลิตร

ตวงส่วนผสมตามปริมาตรข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

6. Protein staining solution

0.2% Coomassie brilliant blue R250	2 กรัม
45% Methanol	450 มิลลิลิตร
45% Distilled water	450 มิลลิลิตร
10% Gracial acetic acid	100 มิลลิลิตร

ชั่งและตวงส่วนผสมตามปริมาตรข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

7. Destaining solution

25% Methanol	250 มิลลิลิตร
--------------	---------------

68% Distilled water 680 มิลลิลิตร

7% Gracial acetic acid 70 มิลลิลิตร

ตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

8. Lysis buffer (Buffer A)

NaH_2PO_4 100 mM

Tris-Cl 10 mM

GuHCl 6 M

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

9. Lysis buffer (Buffer B)

NaH_2PO_4 100 mM

Tris-Cl 10 mM

Urea 8 M

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

10. Wash buffer (Buffer C)

NaH_2PO_4 100 mM

Tris-Cl 10 mM

Urea 8 M

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 6.3 ด้วย HCl และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

11. Elution buffer (Buffer D)

NaH_2PO_4 100 mM

Tris-Cl 10 mM

Urea 8 M

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 5.9 ด้วย HCl และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

12. Elution buffer (Buffer E)

NaH₂PO₄ 100 mM

Tris-Cl 10 mM

Urea 8 M

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 4.5 ด้วย HCl และเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

13. Protein staining solution

0.2% Coomassie brilliant blue R250 2 กรัม

45% Methanol 450 มิลลิลิตร

45% Distilled water 450 มิลลิลิตร

10% Gracial acetic acid 100 มิลลิลิตร

ซึ่ง และตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

14. Destaining solution

25% Methanol 250 มิลลิลิตร

68% Distilled water 680 มิลลิลิตร

7% Gracial acetic acid 70 มิลลิลิตร

ตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

การเตรียมอาหารสังเคราะห์ (MS) สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ลำดับที่	สูตรเคมี	มิลลิกรัม/ ลิตร
1	NH_4NO_3	1,650
2	KNO_3	1,900
3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440
4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
5	KH_2PO_4	170
6	H_3BO_3	6.2
7	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
8	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
9	KI	0.83
10	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
11	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
12	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
13	Na_2EDTA	37.25
14	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85
15	Glycine	2
16	Nicotinic acid	0.5
17	Pyridoxine HCl	0.5
18	Thiamine HCL	0.1
19	Myo-inositol	100
20	Sucrose	30 กรัม

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวอมิสรา หล้าพรม
เกิดวันที่	22 มิถุนายน 2524
สถานที่เกิด	จังหวัดนครพนม
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนโครงการ Biodiversity, Agriculture and Culture of Taiwan Summer Program, College of Bioresources and Agriculture, National Taiwan University (2011)