ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

ปริญญา

โรคพืช | โรคพืช

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การตรวจสอบและระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* สาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย

Detection and Epidemiology of *Pineapple mealybug wilt-associated viruses* Caused of Mealybug Wilt of Pineapple in Thailand

นามผู้วิจัย นายดนุพล ไชยพงษ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์, วท.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ศรีเมฆ ชาวโพงพาง, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(อาจารย์อนงนุช สาสนรักกิจ, วท.ด.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบและระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส Pineapple mealybug wilt-associated virus สาเหตุโรค เหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย

Detection and Epidemiology of Pineapple mealybug wilt-associated virus Caused of Mealybug Wilt of Pineapple in Thailand

โดย

นายดนุพล ไชยพงษ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)
พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดนุพล ไชยพงษ์ 2556: การตรวจสอบและระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* สาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช) สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์, วท.ด. 113 หน้า

โรคเหี่ยวเป็นโรคที่มีความสำคัญกับการปลูกสับปะรดทั่วโลก ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* และมีเพลี้ยแป้งสับปะรดเป็นแมลงพาหะ (*Dysmicoccus brevipes*.) งานวิจัยในครั้งนี้มีการเก็บตัวอย่างสับปะรดที่แสดงอาการอาการใบแดง (Reddening leaves) อาการใบด่าง (Mottling leaves) อาการลำต้นแคระแกร็น (Dwarf) และอาการเหี่ยว (Wilt) จากทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งการพัฒนาอาการของโรคจะเกี่ยวข้องกับสภาพอากาศและประชากรของเพลี้ยแป้งสับปะรด นำตัวอย่างมาตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีนห่อหุ้มอนุภาคของไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 774 และ 909 คู่เบส ตามลำดับ โดยพันธุ์สับปะรดที่ทำการตรวจสอบได้แก่ พันธุ์ปัตตาเวีย นางแล ห้วยมุ่น และเพชรบุรี พบตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสร้อยละ 26.71 จากตัวอย่างทั้งหมด 595 ตัวอย่าง ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสในประเทศไทยเมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่ามีความเหมือนร้อยละ 97 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีความเหมือนเท่ากับร้อยละ 98 ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน coat protein ของไวรัส PWaV2 มีค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 98 และลำดับ กรดอะมิโนมีค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 99 ตามลำดับ ตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัส PMWaV ผ่านทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่า ไวรัสสามารถถ่ายทอดจากตาที่นำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคิดเป็นร้อยละ 48 จากทั้งหมด 140 ตัวอย่าง หาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ Partial genome ทั้งหมด 6693 คู่เบส จากทั้งหมด 13,100 คู่เบส ในตำแหน่ง ORF1 ประกอบไปด้วยยีน helicase, RNA dependant RNA polymerase genes, partial CDS, unknown protein gene และ heat shock 70-like protein gene, partial CDS เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานใน Genbank accession number AF414119 มีความเหมือนกันร้อยละ 94 ซึ่งเป็นรายงานครั้งที่มีการทำ Partial genome ของ PMWaV1

_____ _____ ___ / ___ / ____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Danupol Chaiyapong 2013: Detection and Epidemiology of *Pineapple mealybug wilt-associated viruses* Caused of Mealybug Wilt of Pineapple in Thailand. Master of Science (Plant Pathology), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Ampaiwan Paradornnuwat, Ph.D. 113 pages.

Surveys for Mealybug wilt of pineapple (MWP) caused by *Pineapple mealybug wilt-associated virus* in Northern, Western, Southern and Eastern of Thailand. The typical disease has revealed the resembling symptoms such as Reddening leaves, Motlling leaves, Dwarf and wilt in each varieties such as “Patavia” “Nang-Lae” “Petchaburi” and “Huay-Moon”. Detection of PMWaV1 and PMWaV2 by using specific primers shown positive results for both of viruses in every part of Thailand. In addition, symptom expression is also variable and apparently linked to factors such as environmental conditions, mealybug populations and pineapple genotype. In addition, the ability of virus transmission throughout tissue culture methods was tested after cultured for 8-12 months and shown positive result for detection by RT-PCR. Analysis of the nucleotides of PMWaV1 and PMWaV2 compared similarities to those of PMWaV from USA strains in Genbank accession number AF414119 and DQ225114, at 97% and 98% identity. The partial genomic (6693 bp) of PMWaV1 was analyzed nucleotide and compared with PMWaV1 (13.1 kb) that reporting similarities to those of USA strain in Genbank accession number AF414119, at 94% identity. The partial genomic ORF1 composed of several genes including helicase, RNA dependent RNA polymerase genes, partial CDS, unknown protein gene and heat shock 70-like protein gene, partial CDS. This is a first report for analyze the partial genomic of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* in Thailand.

_____ _____ ___ / ___ / ____

Student’s signature Thesis Advisor’s signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาวางแผนการศึกษา ให้คำปรึกษา แนะนำ ในการดำเนินงานทดลองวิจัย ตลอดจนการสนับสนุนทุนศึกษาวิจัยวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.ศรีเมฆ ชาวโพงพาง รองกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยให้คำปรึกษาและแนะนำ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่มีส่วนในการสนับสนุนเงินวิจัยโดยผ่านโครงการวิจัย “การวิจัยการบริหารจัดการไม้ผลเศรษฐกิจสู่ชุมชน : การวิจัยและพัฒนาการผลิตสับปะรดและมะม่วงน้ำดอกไม้สีทองเพื่อการส่งออก” ซึ่งมี รองศาสตราจารย์ ดร. อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์ เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย จึงทำให้การทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ บริษัท ทิปโก้ฟูดส์ (ประเทศไทย) จำกัด และ บริษัท อาหารสยาม จำกัด (มหาชน) รวมทั้งเกษตรกรผู้ปลูกสับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดชลบุรีและจังหวัดระยอง ที่กรุณาให้ใช้พื้นที่แปลงปลูกส่วนหนึ่งเพื่อทดลองงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว คุณยาย คุณป้า คุณน้า และทุกคนในครอบครัวที่ให้การศึกษาที่ดีแก่ข้าพเจ้า ขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ ขอขอบคุณ ดร.อารมย์ จันทะสอน คุณกีรติ สินธวาชีวะ คุณธำรงเจต พัฒมุข คุณจิตรยา จารุจิตร และคุณนันทศักดิ์ เกษราพงษ์ สำหรับความช่วยเหลือทั้งในงานห้องปฏิบัติการและการทดลองวิจัยในสภาพแปลงปลูก ประโยชน์และคุณค่าอันพึงมีของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ผู้มีพระคุณในการสนับสนุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้าและบุคคลที่กล่าวมาในข้างต้น ซึ่งมีส่วนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จอีกขั้นหนึ่งของการศึกษา

ดนุพล ไชยพงษ์

มีนาคม 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	14
ผลการทดลอง	28
วิจารณ์ผลการทดลอง	88
สรุปผลการทดลอง	97
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	101
ภาคผนวก	108
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	113

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การสำรวจอาการของโรคเหี่ยวสับปะรดและการระบาดของเพลี้ยแป้งสับปะรดในแปลงปลูกจังหวัดประจวบคีรีขันธ์	31
2	การสำรวจอาการของโรคเหี่ยวสับปะรดและการระบาดของเพลี้ยแป้งสับปะรดในแปลงปลูกจังหวัดชลบุรี	32
3	ผลการตรวจการระบาดของโรคเหี่ยวสับปะรดในแหล่งปลูกที่สำคัญในประเทศไทย	54
4	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย	61
5	การทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดด้วยแมลงเพลี้ยแป้งสับปะรด (*Dysmicoccus Brevipes*.)	62
6	การตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดผ่านทางตาของสับปะรดโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	66
7	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส PMWaV1 แบบ partial genome	70

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงอาการลำต้นแคระแกร็น (dwarf) ในแต่ละระดับของสับปะรดซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus*	15
2	แสดงอาการใบด่าง (mottling leaves) ในแต่ละระดับของสับปะรดซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug Wilt-associated virus*	16
3	แสดงอาการใบแดง (reddening leaf) ในแต่ละระดับของสับปะรดซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt- associated virus*	17
4	รูปแสดงอาการเหี่ยว (wilt) ในแต่ละระดับของสับปะรดซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug Wilt-associated virus*	18
5	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการที่แสดงถึงโรคเหี่ยวของสับปะรดกับอุณหภูมิ และความสัมพันธ์ระหว่างอาการที่แสดงถึงโรคเหี่ยวของสับปะรดกับความชื้น ณ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	33
6	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการที่แสดงถึงโรคเหี่ยวของสับปะรดกับวันที่มีฝนตก และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการที่แสดงถึงโรคเหี่ยวของสับปะรดกับปริมาณแสงต่อวัน ณ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์	34
7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการที่แสดงถึงโรคเหี่ยวของสับปะรดกับอุณหภูมิ และ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการที่แสดงถึงโรคเหี่ยวของสับปะรดกับความชื้น ณ จังหวัดชลบุรี	35
8	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการที่แสดงถึงโรคเหี่ยวของสับปะรดกับความชื้น และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการที่แสดงถึงโรคเหี่ยวของสับปะรดกับความชื้น ณ จังหวัดชลบุรี	36
9	แสดงสภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ห้วยมุ่น ต.น้ำปาด อ.ห้วยมุ่น จ.อุตรดิตถ์ (ก.) สับปะรดพันธุ์ห้วยมุ่นที่แสดงอาการ โรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อไวรัส PMWaV (ข.)	39

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	การระบาดที่พบได้ภายในแปลงปลูกซึ่งการระบาดสามารถพบได้เป็นแบบกลุ่ม (ก.) ลักษณะของต้นสับปะรดที่แสดงอาการแคระแกร็นมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสที่ ต.น้ำปาด อ.ห้วยมุ่น จ.อุตรดิตถ์	40
11	แสดงสภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ต.บ้านเสด็จ อ.เมือง จ.ลำปาง (ก.) อาการเหี่ยวของสับปะรดที่มีการระบาดภายในแปลงปลูก (ข.)	41
12	อาการของใบเกิดจุดจ้ำเขียว (green blotchy) ที่เกิดจากการดูดกินน้ำเลี้ยงของเพลี้ยแป้งสับปะรด (ก.) อาการลำต้นแคระแกร็นที่พบได้ในแปลงปลูกสับปะรดที่มีการระบาดของโรค (ข.)	42
13	สภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์นางแลที่ ต.นางแล อ.นางแล จ.เชียงราย (ก.) และ (ข.)	43
14	อาการของใบเกิดจุดจ้ำเขียว (green blotchy) ที่เกิดจากการดูดกินน้ำเลี้ยงของเพลี้ยแป้งสับปะรดที่เกิดขึ้นกับสับปะรด (ก.) พันธุ์นางแลที่ ต.นางแล อ.นางแล จ. เชียงราย	44
15	สภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์เพชรบุรีที่ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี (ก.) และ (ข.)	45
16	ลักษณะอาการของโรคเหี่ยวของสับปะรดพันธุ์เพชรบุรีที่เกิดจากเชื้อไวรัส PMWaV แสดงอาการที่เห็นได้ชัดเจนที่สุดของสับปะรดพันธุ์นี้คืออาการใบแดงและอาการเหี่ยว (ก.) และ (ข.)	46
17	สภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่พบการระบาดของโรคเหี่ยวแสดงให้เห็นเป็นพื้นที่วงกลมภายในแปลง (ก.) และ (ข.)	47
18	ลักษณะอาการปลายใบไหม้ (tip dieback) ของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่พบได้ภายใน แปลงปลูก (ก.) และอาการใบด่างทีมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส PMWaV (ข.)	48
19	สภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ ต.บ้านบึง อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี (ก.) อาการของสับปะรดที่มีอาการของโรคเหี่ยวอย่างรุนแรง สามารถพบได้ทั่วไปภายในแปลงปลูก (ข.)	49

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	อาการปลายใบไหม้ (tip dieback) ของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ ต.บ้านบึง อ.บ้านบึง จ.ชลบุรีสามารถพบได้เกือบทุกต้นภายในแปลงปลูก (ข.) ใบสับปะรดแสดงอาการใบแดง(reddening leaves) และอาการเหี่ยว (wilt) อย่างรุนแรงหลังจากถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย	50
21	เพลี้ยแป้งสับปะรด (*Dysmicoccus brevipes*.) ที่ตรวจพบภายในแปลงปลูกสับปะรดที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวมีสาเหตุจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* ซึ่งพื้นที่อาศัยของเพลี้ยแป้งจะอยู่บริเวณโคนกาบใบใต้ดินจนไปถึงบริเวณรากของต้นสับปะรด	51
22	ดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Duplex RT-PCR มีขนาด 909 และ 774 คู่เบสตามลำดับ	52
23	การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR จากสับปะรดที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน coat protein ของไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 774 คู่เบส ในช่องที่ 1 และ 909 คู่เบสในช่องที่ 2 เมื่อเทียบกับ 1Kb DNA ladder	57
24	เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1 ในประเทศสหรัฐอเมริกาที่ได้มีการรายงานไว้ใน Genbank กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศไทย พบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับร้อยละ 97	58
25	เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส *Pineapple mealybugWilt-associated virus* 2 ในประเทศสหรัฐอเมริกาที่ได้มีการรายงานไว้ใน Genbank กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศไทย พบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับร้อยละ 98	59
26	ต้นสับปะรดที่ปลูกเชื้อไวรัสจำนวน 1 ตัว (ก.) และ 3 ตัว (ข.) ไม่แสดงลักษณะอาการของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อไวรัสให้พบ จะมีเพียงอาการใบแดงเพียงเล็กน้อยเนื่องจากเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย	63

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

27 ต้นสับปะรดที่แสดงลักษณะอาการของโรคเหี่ยวได้แก่ อาการใบแดง อาการใบด่าง ลำต้นแคระแกร็นและเหี่ยว หลังจากปลูกเชื้อไวรัสผ่านทางแมลงเพลี้ยแป้งสับปะรดจำนวน 5 ตัว (ก.) และ7 ตัว (ข.) เป็นเวลา 108 วัน 64

28 ต้นสับปะรดขนาดประมาณ 1 เซนติเมตรที่เจริญมาจากตาเมื่อนำมาวางบนอาหารแข็งเพื่อชักนำให้เกิดต้น (ก.) บนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน จากนั้นนำไปวางบนอาหารที่มีการเติมฮอร์โมน 3NAA และ 3BAP ต้นสับปะรดมีการแตกแคลลัสซึ่งถูกชักนำโดยฮอร์โมน (ข.) ทำการ subculture เพื่ออแยกต้นสับปะรดและเลี้ยงต่อไปให้ได้ต้นสับปะรดมีขนาดที่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบหาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสต่อไป (ค. และ ง.) 67

29 ลำดับนิวคลีโอไทด์ partial sequence ของ *Pineapple mealybug wilt associated virus* 1ของประเทศไทยซึ่งเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการใบแดง ใบด่าง ลำต้นแคระแกรนและอาการเหี่ยว จากแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 71

30 ลำดับกรดอะมิโน partial sequence ของ *Pineapple mealybug wilt associated virus* 1 ของประเทศไทยซึ่งเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการใบแดง ใบด่าง ลำต้นแคระแกรนและอาการเหี่ยว จากแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 74

ภาพผนวกที่

แสดงโครงสร้างของ **pCR®8/GW/TOPO® cloning vector** และตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ ที่อยู่ vector 112

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจสอบและระบาดวิทยาของเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* สาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย

Detection and Epidemiology of *Pineapple mealybug wilt-associated viruses* Caused of Mealybug Wilt of Pineapple in Thailand

คำนำ

สับปะรด ชื่อทางวิทยาศาสตร์: *Ananas comosus* เป็นไม้ผลในตระกูลสับปะรด (Bromeliad family) หรือวงศ์ Bromeliaceae เป็นพืชล้มลุกชนิดหนึ่งที่มีต้นกำเนิดมาจากทวีปอเมริกาใต้ ลำต้นมีขนาดสูงประมาณ 80-100 เซนติเมตร การปลูกสามารถปลูกได้ง่ายโดยการใช้หน่อหรือที่เป็นส่วนยอดของผลที่เรียกว่า จุก ฝังกลบดินไว้ และสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นได้ เปลือกของผลสับปะรดภายนอกมีลักษณะคล้ายตาล้อมรอบผล ประเทศไทยเริ่มมีการนำมาปลูกครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2456 สับปะรดที่นำมาปลูกคือพันธุ์ “ปัตตาเวีย” หรือ สับปะรดพันธุ์ศรีราชา พันธุ์ปราณบุรี หรือพันธุ์สามร้อยยอด เข้ามาปลูกที่อำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ต้องการอากาศค่อนข้างร้อนอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 23.9-29.4 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนที่ต้องการอยู่ในช่วง 1,000-1,500 มิลลิเมตรต่อปี แต่ต้องตกกระจายสม่ำเสมอตลอดปี และมีความชื้นในอากาศสูง สับปะรดมีการเจริญเติบโตดีในดินร่วน, ดินร่วนปนทราย, ดินปนลูกรัง และดินทรายชายทะเล สภาพภูมิประเทศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือบริเวณพื้นที่ลาดเชิงเขา สภาพความเป็นกรดด่าง (pH) ของดินควรเป็นกรดเล็กน้อยประมาณ 4.5-5.5 แต่ไม่เกิน 6.0 พื้นที่ในประเทศไทยที่มีการปลูกสับปะรดได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดชลบุรี จังหวัดระยอง จังหวัดฉะเชิงเทรา จังหวัดจันทบุรี จังหวัดตราด สับปะรดเป็นพืชที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมเกษตร นอกจากจะนิยมบริโภคสดแล้วยังสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลายชนิด เช่น สับปะรดกระป๋อง น้ำสับปะรด สับปะรดแช่แข็ง สับปะรดกวน สับปะรดอบแห้ง และอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องและเปลือกยังนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ส่วนใบใช้ทำเส้นใยและกระดาษ (กรมวิชาการเกษตร,2541) ปัญหาของการปลูกสับปะรดที่พบมากคือโรคเหี่ยวของสับปะรด (Mealybug wilt of pineapple) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* มีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Van Regenmortel, 2000; Sether *et al.,* 2001) ทำให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เกิดความ เสียหายแก่พื้นที่ปลูกเป็นจำนวนมาก การควบคุมโดยวิธีกำจัดโรคไวรัสนี้ให้หมดไปทำได้ยาก เนื่องจากโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดมีการถ่ายทอดโรคโดยมีแมลงพวกเพลี้ยแป้งสับปะรด ชนิด *Pseudococcus brevipes.* หรือชนิด *Dysmicoccus brevipes.* (Cockerell) เป็นพาหะ และมีมดหัวโต (*Solenopsis gemnata* และ *Pheidole megacephala*) เป็นตัวนำพาเพลี้ยแป้งสับปะรด (ชำนาญ และคณะ,2542;Beardsley,1993;Ronald,2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาระบาดวิทยาของโรคเหี่ยวสับปะรดที่มีความสัมพันธ์กับการระบาดของเพลี้ยแป้งสับปะรดและสภาพอากาศของแต่ละพื้นที่ปลูก

2. ศึกษาด้านชีวโมเลกุลของเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส PMWaV1 แบบ partial genome และออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบไวรัสและการติดโรค

3. ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* ชนิดสำคัญที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของสับปะรด ผ่านการขยายพันธุ์โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture)

4. เพื่อตรวจสอบความสามารถการถ่ายทอดเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* โดยเพลี้ยแป้งสับปะรด *Dysmicoccus brevipes.*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

พันธุ์สับปะรดที่ปลูกเป็นการค้า

ประเทศไทยมีพันธุ์สับปะรดที่ใช้รับประทานผลสดและมีการปลูกเป็นการค้าแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ Smooth Cayenne, Queen, Red Spanish, Abacaxi และ Pernambuco ใน 5 กลุ่มนี้ 3 กลุ่มแรก คือ Smooth Cayenne, Queen และ Red Spanish มีความแตกต่างกันทางด้าน รูปร่างสัณฐานค่อนข้างชัดเจน และมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่สม่ำเสมอกว่ากลุ่ม Abacaxi และ Pernambuco ซึ่ง 2 กลุ่มหลังนี้ยังมีความแปรปรวนภายในกลุ่มอยู่มาก (จินดารัฐ, 2541; Duval and D' Eeckenbrugge, 1993) สำหรับพันธุ์สับปะรดที่ปลูกในประเทศไทยพบเพียง 3 กลุ่ม คือ

กลุ่ม Smooth Cayenne : เป็นกลุ่มที่นิยมปลูกมากที่สุด ทั้งเพื่อใช้บริโภคผลสด และใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ Smooth Cayenne หรือ ปัตตาเวีย ซึ่งมีลักษณะขอบใบเรียบมีหนามเพียงเล็กน้อยที่ส่วนปลายใบ ใบมีสีเขียวเข้มด้านบนเป็นมัน และมักมีเหลือบสีแดงในฤดูที่มีแสงแดดจัด ผลมีรูปร่างค่อนข้างทรงกระบอก แต่ถ้าผลมีขนาดใหญ่มักจะมีส่วนปลายผลเล็กกว่าส่วนโคน (conical shape) น้ำหนักของผลประมาณ 1.0-2.5 กิโลกรัม เนื้อข้างในมีสีเหลือง มีเส้นใย (fiber) ปานกลาง มีปริมาณกรด 0.3-0.7 เปอร์เซ็นต์และปริมาณน้ำตาล 12-16 บริกซ์ ลักษณะประจำพันธุ์ดั้งเดิมจะมีตะเกียง 1-2 ตะเกียง แต่ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยมักไม่สร้างตะเกียง ตัวอย่างของสับปะรดในกลุ่มนี้ในประเทศไทยได้แก่ พันธุ์ปัตตาเวีย (กัลกัตตา หรือ สมูทแคยีน) หรือสับปะรดศรีราชา และพันธุ์นางแล (จินดารัฐ, 2541)

กลุ่ม Queen: สับปะรดในกลุ่มนี้มีขนาดของต้นและผลเล็กกว่ากลุ่มแรกเล็กน้อย ใบมีสีเขียวอ่อนมีแถบสีเขียวอ่อนมีแถบสีชมพูบริเวณกลางใบ ขอบใบมีหนามเรียงชิดติดกันตลอดความยาวของใบ น้ำหนักผลมีขนาดประมาณ 1.0 กิโลกรัม รูปร่างทรงกระบอก ตาค่อนข้างนูนเปลือกหนา เมื่อผลสุกเปลือกผลจะมีสีเหลือง เนื้อข้างในมีสีเหลืองเข้มรสหวานกรอบ มี fiberน้อย และมีกลิ่นหอม แกนผลอ่อนนุ่มกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย สร้างตะเกียงน้อย แต่สร้างหน่อได้มากทั้งหน่อดินและหน่ออากาศ ตัวอย่างของสับปะรดในกลุ่มนี้ในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ภูเก็ต

กลุ่ม Red Spanish: สับปะรดในกลุ่มนี้มีขนาดของต้นและผลอยู่ระหว่างกลางของCayenne และ Queen แต่ใบบางกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย ขอบใบมีหนามแหลมรูปโค้งงอ ผลมีรูปร่างกลมน้ำหนัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เฉลี่ยประมาณ 1.0-1.5 กิโลกรัม ตานูนขนาดของตาใหญ่กว่าพวก Cayenne เนื้อข้างในมีสีเหลืองจาง และมีปริมาณ fiber ปานกลาง แกนผลเหนียว กลิ่นและรสแตกต่างออกไปจากสองกลุ่มแรก ตัวอย่างของสับปะรดในกลุ่มนี้ในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์อินทรชิต (เทพรส หรือ อินทรชิตแดง) พันธุ์ขาว (อินทรชิตขาว) (จารุพันธ์, 2526; จินดารัฐ, 2541)

ความสำคัญของสับปะรดในประเทศไทย

ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดในช่วง 5 ปี ที่ผ่านมา (ปี 2545-2549) พบว่าไทยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดประมาณ 1.2 ล้านไร่ มีผลผลิตสับปะรดประมาณ 2.0 – 2.2 ล้านตัน/ปี ผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 3.5 ตัน / ไร่ และมีมูลค่าการส่งออกสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยในปี 2549 มีมูลค่าส่งออกกว่า 13,000 ล้านบาท ไทยครอบครองความเป็นผู้ผลิตและผู้ส่งออกสับปะรดแปรรูป อันดับ 1 ของโลกยาวนานที่สุดกว่า 20 ปี ผลผลิตร้อยละ 80 ใช้เป็นวัตถุดิบ ในการผลิตสับปะรดกระป๋องและผลิตภัณฑ์อื่นๆ ซึ่งประเทศไทยเป็นผู้ผลิตสับปะรดกระป๋องคิดเป็นร้อยละ 50 ของปริมาณการส่งออกทั้งหมดของโลก จังหวัดหนองคายมีพื้นที่ปลูกสับปะรด 17,211 ไร่ ในปี 2549 มีผลผลิตรวม 38,972 ตัน ผลผลิตเฉลี่ย 4,770 กก./ไร่ โดยการผลิตหลักเป็นการผลิตเพื่อขายผลสดในตลาดท้องถิ่นแต่จากสถานการณ์ของตลาดโลกที่ต้องการผลิตภัณฑ์จากสับปะรดเพิ่มมากขึ้น วัตถุดิบไม่เพียงพอต่อความต้องการของโรงงานทำให้โรงงานจากภาคตะวันออก และภาคตะวันตก เข้ามาซื้อผลผลิตจากจังหวัดหนองคาย โดยเฉพาะในช่วงผลผลิตออกสู่ตลาด ในเดือน พฤษภาคม – มิถุนายน ของทุกปี โดยปี 2549 ได้ผลผลิต 38,972 ตัน ดังนั้น ในสถานการณ์จังหวัดหนองคายมีสภาพพื้นที่เหมาะสมต่อการปลูกสับปะรด เนื่องจากสารไนเตรทข้างค่อนข้างต่ำ จึงเป็นโอกาสที่ได้เปรียบในการแข่งขัน และจังหวัดหนองคาย เป็นจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ปลูกสับปะรดมากที่สุด (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์, 2550)

แหล่งเพาะปลูกสับปะรดที่สำคัญของไทย

1. ภาคกลางและภาคตะวันออก มีการปลูกสับปะรดมากในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพชรบุรี ชลบุรี ระยอง จันทบุรี ตราด ฉะเชิงเทรา และอุทัยธานี
2. ภาคเหนือ มีการปลูกสับปะรดมากในจังหวัดลำปาง เชียงใหม่ และเชียงราย
3. ภาคใต้ มีการปลูกสับปะรดมากในจังหวัดชุมพร นครศรีธรรมราช และสุราษฎร์ธานี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีการปลูกสับปะรดในแหล่งที่ตั้งโรงงานสับปะรดกระป๋องในจังหวัดหนองคาย และนครพนม

พันธุ์สับปะรดที่ปลูกมากในประเทศไทย

พันธุ์สับปะรดที่ปลูกในประเทศไทยแบ่งออกได้เป็น 5 พันธุ์ โดยถือตามลักษณะของต้นที่ได้ขนาดโตเต็มที่ และแข็งแรงสมบูรณ์เป็นบรรทัดฐานดังนี้คือ

1. พันธุ์ปัตตาเวีย

พันธุ์นี้รู้จักแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา และชื่ออื่น ๆ เช่น ปราณบุรี, สามร้อยยอด ปลูกกันมากเพื่อโรงงานอุตสาหกรรม แหล่งปลูกที่สำคัญคือประจวบคีรีขันธ์ ชลบุรี เพชรบุรี ลำปาง และการปลูกกันทั่ว ๆ ไป เพื่อขายผลสด เพราะมีรสหวานฉ่ำมีน้ำมาก

ลักษณะทั่วไป

สับปะรดพันธุ์นี้มีใบสีเขียวเข้ม และเป็นร่องตรงกลางผิวใบด้านบนเป็นมันเงา ส่วนใต้ใบจะมีสีออกเทาเงิน ตรงบริเวณกลางใบมักมีสีแดงอมน้ำตาล ขอบใบเรียบมีหนามเล็กน้อยบริเวณปลายใบ กลีบดอกสีม่วงอมน้ำเงิน ผลมีขนาดและรูปทรงต่างกันไป มีน้ำหนักผลอยู่ระหว่าง 2-6 กิโลกรัม แต่โดยปกติทั่วไปประมาณ 2.5 กิโลกรัม เปลือกผลเมื่อดิบสีเขียวคล้ำ เมื่อแก่จัดจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมส้มทางด้านล่างของผลประมาณครึ่งผล ก้านผลสั้นมีไส้ใหญ่เนื้อเหลืองอ่อน แต่จะเปลี่ยนเป็นสีเข้มในฤดูร้อน รสชาติดี

2. พันธุ์อินทรชิต

เป็นพันธุ์พื้นเมืองที่เก่าแก่ที่สุดในประเทศไทย ปลูกกันกระจัดกระจายทั่วไป แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่จังหวัดฉะเชิงเทรา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะทั่วไป

พันธุ์นี้มีขอบใบจะมีหนามแหลมร่างโค้งงอสีน้ำตาลอมแดง ใบสีเขียวอ่อนไม่เป็นมัน ขอบใบทั้ง 2 ข้างมีแถบสีแดงอมน้ำตาลตามแนวยาว ใต้ใบจะมีสีเขียวออกขาวและมีวาวออกสีน้ำเงินกลีบดอกสีม่วงเข้ม ผลมีขนาดเล็กกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย รสหวานอ่อน มีตะเกียงติดอยู่ ที่ก้านผล เปลือกผลเหนียวแน่นทนทานต่อการขนส่ง เหมาะสำหรับบริโภคสด

3.พันธุ์ขาว

เป็นพันธุ์พื้นเมือง เกษตรนิยมปลูกพันธุ์นี้ร่วมกับพันธุ์อินทรชิต เข้าใจว่าจะกลายพันธุ์มาจากพันธุ์อินทรชิตแหล่งปลูกที่สำคัญคือ ฉะเชิงเทรา

ลักษณะทั่วไป

มีใบสีเขียวอมเหลืองหรือเขียวใบไม้ ทรงพุ่มเตี้ยใบแคบและสั้นกว่าพันธุ์อินทรชิต ขอบใบมีหนามโค้งงอเข้าสู่ปลายใบ โคนกลีบดอกสีม่วงอ่อน ปลายกลีบสีม่วงอมชมพู เนื้อผลสีเหลืองทอง รสหวานอ่อน ผลมักมีหลายจุก คุณภาพของเนื้อไม่ค่อยดีนัก ผลมีขนาดปานกลาง น้ำหนักเฉลี่ย 0.85 กิโลกรัม มีลักษณะเป็นทรงกระบอก มีตาลึกทำให้ผลฟ่ามง่าย

4. พันธุ์ภูเก็ตหรือสวี

ปลูกกันมากในสวนยางจังหวัดภูเก็ต ชุมพร นครศรีธรรมราช และตราด โดยปลูกระหว่างแถวยางรุ่นที่ยังมีอายุน้อยเพื่อเก็บผลขายก่อนกรีดยาง มีชื่ออื่น ๆ อีกเช่น พันธุ์ชุมพร พันธุ์สวี พันธุ์ตราดสีทอง

ลักษณะทั่วไป

พันธุ์นี้ใบสีเขียวอ่อนและมีแถบสีแดงในตอนกลางและปลายในขอบใบมีหนามสีแดงแคบและยาวกว่าพันธุ์อินทรชิตและ พันธุ์ขาวกลีบดอก สีม่วงอ่อน ผลมีขนาดเล็กกว่าทุกพันธุ์ที่กล่าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มาตาลึกเปลือกหนา เนื้อหวานกรอบสีเหลืองเข้ม เยื่อใยน้อย มีกลิ่นหอม เหมาะสำหรับบริโภคสด เป็นที่นิยมมากในภาคใต้

5. พันธุ์นางแลหรือน้ำผึ้ง

ลักษณะทั่วไป

พันธุ์นี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับพันธุ์ปัตตาเวีย แต่มีรูปร่างของผลทรงกลมกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย ตานูน เปลือกบางกว่าและรสหวานจัดกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย ผลแก่มีเนื้อในสีเหลืองเข้ม มีเยื่อใยน้อยเหมาะสำหรับบริโภคสด เป็นที่นิยมมากในภาคเหนือ ผลมีเปลือกบางมาก ขนส่งทางไกลไม่ดีนัก (สำนักงานเกษตรและสหกรณ์, 2550)

โรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากเชื้อไวรัส

ไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคของสับปะรด ได้แก่ Badnavirus และ *Tomato spotted wilt virus* ในแหล่งผลิตสับปะรดปัตตาเวียพันธุ์ ส่งโรงงานในเขตจังหวัดชลบุรี จังหวัดเพชรบุรี และ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์นั้น โรคที่สำคัญและทำความเสียหายแก่สับปะรดอย่างหนึ่ง คือ โรคเหี่ยวของสับปะรด (Mealybug Wilt of Pineapple (MWP)) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Pineapple mealybug wiltassociated viruses* (PMWaVs) จากรายงานการค้นพบโรคเหี่ยว (MWP) ครั้งแรกในฮาวาย ประมาณปี ค.ศ. 1910 โดย Larsen (Carter , 1933; Carter,1951) ซึ่งมีสมมุติฐานว่าลักษณะอาการของโรคเหี่ยวของสับปะรด น่าจะเกิดจากการดูดน้ำเลี้ยงของแมลงพวกเพลี้ยแป้งสับปะรด (*Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) ในช่วงอายุพืชที่มีความแตกต่างกัน ต่อมาพบโรคนี้ในเม็กซิโก เปอร์โตริโก ศรีลังกา และอีกหลายประเทศทั่วโลก และนอกจากนี้ยังพบว่าการที่สับปะรด ได้รับปุ๋ยไนโตรเจนมาก จะทำให้เพลี้ยแป้งสับปะรดมาดูดกินน้ำเลี้ยงที่ต้นพืชมาก ทำให้สับปะรดปรากฏลักษณะอาการของโรคเหี่ยวเพิ่มขึ้น หรืออาจเกิดจากมีเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดเข้าทำลาย (Hu *et al.*, 1997) ต่อมาเมื่อ Carter (1932, 1944a, 1944b, and 1951) ได้ศึกษาอาการ ของโรคเหี่ยวและโรคใบจุดเขียวของสับปะรดและศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะอาการดังกล่าวอีก พบว่าเพลี้ยแป้งสับปะรด (*Dysmicoccus* sp.) และไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (Pineapple wilt virus: PiWV; *Pineapple mealybug wilt-associated viruses*: PMWaVs) เป็นสาเหตุของอาการเหี่ยว (mealybug wilt) และอาการจุดเขียว (green spot) ของสับปะรด โดยสร้างความเสียหายให้กับการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพาะปลูกสับปะรดที่รัฐฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นอย่างมาก โรคเหี่ยวที่เกิดจากการทำลายของเพลี้ยแป้งสับปะรดนี้เป็นโรคที่ร้ายแรง และมีการระบาดแพร่หลายในแหล่งปลูกสับปะรดใหญ่ๆ หลายแห่ง เช่น ฮาวาย เม็กซิโก เปอร์โตริโก (Carter 1944a, 1944b, and 1951) คิวบา (Borroto,1998) ออสเตรเลีย (Wakman,1995) รวมทั้งในประเทศไทย สุวรรณาและคณะ, (2536) ได้สำรวจและบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี พบว่าในแปลงที่เพาะปลูกสับปะรดที่อายุ 1 ปีที่ผ่านการบังคับให้ต้นสับปะรดออกดอกด้วยสารเคมีนั้นพืชจะแสดงอาการของโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากเชื้อไวรัส PMWaV ให้เห็นชัดเจน และปริมาณของต้นเป็นโรคมีจำนวนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ยังไม่บังคับให้ออกดอกหรือต้นที่มีอายุน้อย

ลักษณะอาการของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อไวรัส

ลักษณะอาการโดยทั่วไปแล้วหลังจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสจะพบอากาใบแห้งเหี่ยวและม้วนงอจากปลายใบเข้ามา ที่พบต่อมาคืออาการใบมีสีแดง มีอาการด่างเป็นจ้ำและอาการใบเหลือง ซึ่งอาการที่กล่าวมาในภายหลังนี้จะพบน้อยกว่าสองอาการแรก (Singh and Sastry,1974). และอาการของโรคเหี่ยวแบ่งได้ตามระยะดังนี้คือ ระยะที่ 1 ใบสับปะรดจะเริ่มเปลี่ยนจากสีเขียวมาเป็นสีแดง ระยะนี้ใบสับปะรดยังไม่มีอาการม้วนงอและยังไม่มีผลกระทบมากนักกับต้นสับปะรด ระยะที่ 2 ใบสับปะรดจะเริ่มกลายเป็นสีชมพูและเริ่มเหลือง ระยะนี้ใบเริ่มเสียแรงตึงผิว เนื่องจากเชื้อไวรัส ใบจะเริ่มม้วนงอและเริ่มเกิดอาการไหม้ (necrotic) ที่บริเวณปลายใบระยะที่ 3 ใบสับปะรดที่อยู่รอบนอกของต้นจะเริ่มเหี่ยวและโน้มลงสู่พื้นและปลายใบเริ่มแห้งตาย ระยะนี้สับปะรดจะเริ่มมีขนาดเล็กกว่าสับปะรดต้นที่ปกติระยะที่ 4 ใบสับปะรดจะเกิดอาการเหี่ยวทุกใบและเริ่มแห้งตายใบม้วนงอ ปลายใบแห้งตาย ระบบรากของสับปะรดจะถูกทำลายและทำให้การดูดน้ำของรากนั้นลดลงจนทำให้สับปะรดตายในที่สุด

ความรุนแรงของโรคจะเกิดกับสับปะรดในกลุ่ม Cayenne ได้แก่พันธุ์ปัตตาเวีย และกลุ่มพันธุ์ Monte Lirio ส่วนกลุ่มสับปะรด Red Spanish กลุ่ม Queen และพันธุ์ลูกผสมจะต้านทานโรคนี้ได้ดีกว่าจึงไม่ค่อยแสดงอาการของโรคให้เห็นมากนัก (Carter,1948)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การถ่ายทอดโรคโดยแมลง

การถ่ายทอดโรคของเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associates virus* จะประสบความสำเร็จได้ก็ต่อเมื่อมีแมลงพาหะ คือ เพลี้ยแป้งสับปะรด *Dysmicoccus brevipes.* และเพลี้ยแป้งสีเทา *Dysmicoccus neobrevipes*.(Singh and Sastry, 1972, 1974; Sether *et al.,* 1998). ซึ่งอยู่ในวงศ์อยู่ในวงศ์ *Pseudococcidae* เชื้อสาเหตุมีความสัมพันธ์กับแมลงในลักษณะ semi-persistent ระยะก่อนวางไข่ (prior starvation period) เพลี้ยแป้ง 1 ตัว มีช่วงระยะเวลารับเชื้อ (acquisition feeding period) นาน 5 - 7 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลาฟักตัวของเชื้อ นาน 48-72 ชั่วโมง (2 ถึง 3 วัน) (Sether and Hu , 2002a, 2002b) และช่วงระยะเวลาถ่ายทอดเชื้อ นาน 15 วินาที หรือน้อยกว่านั้น ถ้าเพิ่มระยะเวลาเป็น 3-4 ชั่วโมง ก็จะเพิ่มความสามารถในการเกิดโรคได้ดีขึ้น (ศิริพรรณ, 2538; Walkey, 1991) รวมมีระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อไวรัส 3 ถึง 4 วัน เพลี้ยแป้งตัวอ่อน (nymphs) ถ่ายทอดโรคไวรัสได้ดีกว่าตัวเต็มวัย(adults) การถ่ายทอดไวรัสนั้นต้องการเพลี้ยแป้งอย่างน้อย 20 ตัวต่อพืช 1 ต้นจึงจะสามารถถ่ายทอดโรคได้ และพืชจะแสดงอาการของโรคหลังจากติดเชื้อแล้ว 50-60 วัน (Bird,1954) ลักษณะอาการที่คาดว่าเป็นไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากมีแมลงพวกเพลี้ยแป้งเป็นพาหะนำโรคไวรัส อาการที่พบคือ สับปะรดแสดงอาการความแต่งของใบลดลง ปลายใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือมีรอยแผลแห้ง และม้วนเข้า ปลายใบแห้ง ลุกลามมาสู่โคนใบ (mealybug wilt และ edge-wilt) อาการโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากมีเพลี้ยแป้งดูดน้ำเลี้ยงของต้นสับปะรดเป็นระยะเวลานาน และไม่ถ่ายทอดเชื้อไวรัส คือ สับปะรดแสดงอาการใบด่าง ใบมีจุดประสีเหลืองอ่อนสลับสีเขียว อาการที่เกิดจากประชากรของเพลี้ยแป้งจำนวนมากมาดูดน้ำเลี้ยงของสับปะรด ทั้งที่พบกลุ่มของเพลี้ยแป้งดูดน้ำเลี้ยงบริเวณฐานใบสีขาวที่อยู่ติดกับราก แสดงอาการแผลจุดแห้งตาย แผลยุบตัวอ่อนนิ่มมีสีน้ำตาล และถ้าพบกลุ่มประชากรของเพลี้ยแป้งจำนวนมากทำลายที่ผลสับปะรดแสดงอาการผลมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ (rotting หรืออาการ leaking of fruits) อาการ mealybug stripe เป็นอาการเฉพาะจุด คือ อาการที่เกิดจากเพลี้ยแป้งจำนวน 3-4 ตัว มาดูดน้ำเลี้ยงของสับปะรด และไม่ถ่ายทอดเชื้อไวรัส สับปะรดแสดงอาการใบเปลี่ยนจากสีเขียวซีดเป็นสีเหลืองอ่อน เกิดอาการใบด่างขีด (streak) เกิดแผลยุบตัวระหว่างรอย streak (อัจฉราพร ศรีจุดานุ, 2541)

การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) ของเพลี้ยแป้ง เริ่มจากไข่(eggs) ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนในระยะแรก (first larval instar) เป็นเพศเมีย (female) ทั้งหมดให้กำเนิดเพศเมีย (female) โดยปราศจากการผสมพันธุ์กับเพศผู้ (male) เรียกว่า “crawlers”ประมาณ 1,000 ตัว และถ้า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในประชากรที่ฟักออกมาใหม่นั้น เกิดทั้งเป็นเพศผู้ (male) และเพศเมีย (female) ก็จะพบการขยายพันธุ์ของเพลี้ยแป้งทั้งสองแบบ และให้กำเนิดลูกที่เป็นทั้งสองเพศคือ มีการขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศ และแบบไม่อาศัยเพศได้ และ ปรากฏการณ์แบบนี้ มีรายงานพบในประเทศบราซิล ดังกล่าว อาจจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการแพร่ระบาดของโรค กลุ่มของ “crawlers” อาจอาศัยมดหัวโต (big headed ants) และมดคันไฟ (fire ants) (ชำนาญ, 2542;Beardsley, 1993; Ronald, 2005) หรืออาจถูกลมพัดแพร่กระจาย (wind-borne mealybugs) พาไปสู่พืชอาหารใหม่ภายในแปลง (ศิริพรรณ, 2538; ชำนาญ, 2542; Beardsley, 1993) หากมีการระบาดของเพลี้ยแป้งในแปลงปลูกสับปะรดโรคไวรัสนี้ก็มักจะระบาดไปด้วย

ตำแหน่งที่อยู่ของเพลี้ยแป้งแต่ละชนิดนั้น จากการสำรวจพบว่าเพลี้ยแป้งสับปะรดอาศัยอยู่บริเวณลำต้นส่วนล่างที่อยู่ติดกับผิวดิน ตรงบริเวณฐานใบสีขาวของสับปะรด (white portion) พืชอาหารของเพลี้ยแป้งสับปะรดที่พบอีก ได้แก่ น้อยหน่า กล้วย ผักขึ้นฉ่าย ส้ม กาแฟ ฝ้าย Euphorbia Gliricidia ชบา (Hibiscus) Hilo grass ต้นหม่อน หญ้า natal sour sop หญ้า nut grass กล้วยไม้สับปะรด และ Straussia (Ronald, 2005) และเพลี้ยแป้งมักจะอาศัยอยู่บริเวณส่วนจุกและผลของสับปะรด ในขณะที่ longtail mealybug ไม่อาจระบุพืชและตำแหน่งอาศัยได้ ในประเทศไทย longtail mealybug ไม่ระบุว่ามีมดพาเคลื่อนย้ายอีกด้วย (ชำนาญ,2542; Ronald, 2005) จึงอาจไม่ใช่แมลงพาหะที่สำคัญของโรค

ลักษณะของเชื้อไวรัส

เชื้อไวรัสในวงศ์ Closteroviridae มีจีโนมเป็น single-stranded RNA ชนิด positive ที่เป็นแบบ monopartite รูปร่างท่อนยาวคด (long flexuous) ขนาดของอนุภาคประมาณ 12 x 700-2,000 นาโนเมตร (Maloy and Murry, 2001) และจีโนมยาวประมาณ 20 กิโลเบส (Kb) (Bos, 1999; Hull, 2002) มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประมาณ 8,350 กิโลดาลตัน (Melzer *et al.*,2001) ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิก 5 เปอร์เซ็นต์โปรตีน 95 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีลิปิดเป็นองค์ประกอบหลัก

เชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (PMWaVs) จัดอยู่ในจีนัส Closterovirus มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวเส้นบวก (single stranded, positive sense RNA) แบบ monopartite มีขนาดประมาณ 14,861 นิวคลีโอไทด์ มีปลาย 5′ ของอาร์เอ็นเอเชื่อมติดอยู่กับโปรตีน VPg (genome-linked protein) ต่อจากนั้นเป็นยีนเรียงต่อกันประกอบด้วย open reading frame (ORF) 10 ขนาด คือ ORF ที่ 1a จะประกอบด้วยโปรตีน papain-like protease domain, metyltransferase domain, helicase domain แปล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาวมากกว่า 204 กิโลดาลตัน ORF ที่1b ประกอบด้วยโปรตีน RNA-dependent RNA polymeraseแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 65 กิโลดาลตัน ORF2 ประกอบด้วยโปรตีน hydrophobic protein แปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 5 กิโลดาลตัน ORF3 ประกอบด้วยโปรตีน heat shock protein 70 homologue แปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 59 กิโลดาลตัน ORF4 จะแปลรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 46 กิโลดาลตัน ORF5 ประกอบด้วยโปรตีน coat protein แปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 34 กิโลดาลตัน ORF6 ประกอบด้วยโปรตีน diverged coat protein แปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 56 กิโลดาลตัน ORF7 แปลรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 20 กิโลดาลตัน ORF8 แปลรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 22 กิโลดาลตัน ORF9 แปลรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 6 กิโลดาลตัน และตำแหน่งปลายสุดด้าน 3′ เป็นส่วนที่ไม่แปลรหัสเป็นโปรตีน (3′- untranslated region) ประกอบด้วยลำดับเบส 132 นิวคลีโอไทด์ (Melzer *et al.*, 2001)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสับปะรด

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เป็นวิธีการขยายพันธุ์พืชแบบไม่ใช้เพศวิธีหนึ่ง ปฏิบัติภายใต้สภาพที่ควบคุม เรื่องความสะอาดแบบปลอดเชื้อ อุณหภูมิและแสง ด้วยการนำชิ้นส่วนของพืชที่ยังมีชีวิต เช่น ลำต้น ยอด ตาข้าง ก้านช่อดอก ใบ ก้านใบ อับละอองเกสร ฯลฯ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ และชิ้นส่วนนั้นสามารถเจริญและพัฒนาเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์มีทั้งส่วนใบ ลำต้น และรากสามารถนำออกไปปลูกในสภาพธรรมชาติได้

ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. สามารถผลิตต้นพันธุ์พืชปริมาณมากในระยะอันรวดเร็ว

2. ต้นพืชที่ผลิตได้จะปลอดโรค โดยเฉพาะโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัส แบคทีเรีย ด้วยการตัดเนื้อเยื่อที่เจริญอยู่บริเวณปลายยอดของลำต้น ซึ่งยังไม่มีท่ออาหาร อันเป็นทางเคลื่อนย้ายของเชื้อโรคดังกล่าว

3. ต้นพืชที่ผลิตได้ จะมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นแม่ คือมีลักษณะตรงตามพันธุ์ด้วยการใช้เทคนิคของการเลี้ยงจากชิ้นตาพืชพัฒนาเป็นต้นโดยตรงหลีกเลี่ยงขั้นตอนการเกิดกลุ่มก้อนเซลล์ที่เรียกว่าแคลลัส

4. ต้นพืชที่ผลิตได้จะมีขนาดสม่ำเสมอ ผลผลิตที่ได้มีมาตรฐานและเก็บเกี่ยวได้คราวละมากๆ พร้อมกันหรือในเวลาเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.เพื่อการเก็บรักษาหรือแลกเปลี่ยนพันธุ์พืชระหว่างประเทศ

6. เพื่อประโยชน์ด้านการสกัดสารจากต้นพืช นำมาใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น ผลิตเป็นสารป้องกันกำจัดแมลงยารักษาโรคเป็นต้น

7. ใช้เพาะเลี้ยงพืชที่ไม่สามารถงอกในธรรมชาติได้ เช่น กล้วย กล้วยไม้ เป็นต้น

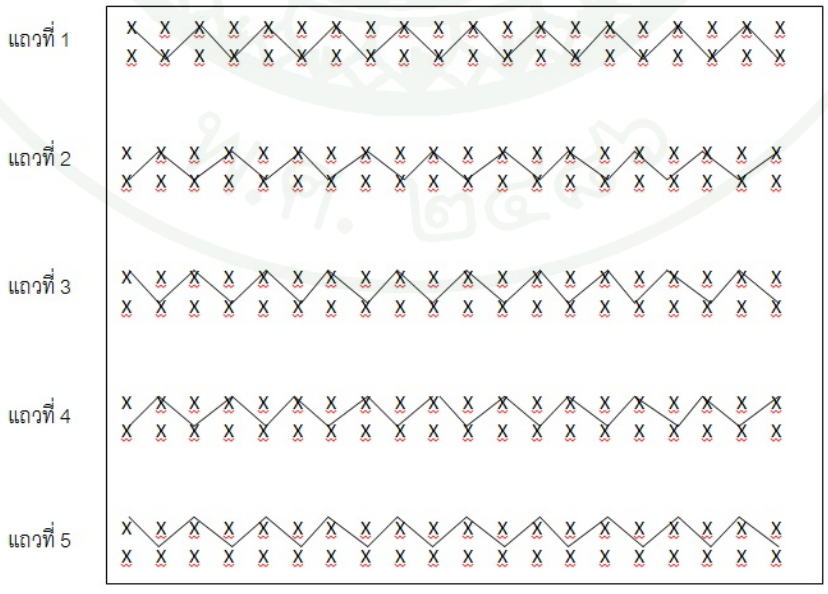
นอกจากนี้ยังมีคุณประโยชน์อีกหลายประการ เช่น เพื่อการผลิตพืชทนทานต่อสภาพแวดล้อม ทนกรด ทนเค็ม ฯลฯ หรือการใช้ประโยชน์เกี่ยวกับการศึกษาทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของพืช เป็นต้น ในส่วนของของกรมส่งเสริมการเกษตรได้นำประโยชน์ข้อ 1-4 มาเป็นข้อกำหนดคุณลักษณะพันธุ์พืชที่ผลิตด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ก่อนนำเข้าระบบส่งเสริมสู่เกษตรกร คือ ต้นพันธุ์พืชที่ผลิตได้ต้องปลอดโรค ลักษณะตรง ตามพันธุ์ และสามารถขยายได้ปริมาณมาในเชิงอุตสาหกรรม นับเป็นหน่วยงานแรกของภาครัฐที่มีการนำเทคโนโลยีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาพัฒนาการใช้งานขยายพันธุ์พืชเศรษฐกิจในเชิงพาณิชย์อย่างเป็นรูปธรรมและพร้อมนำไปใช้ในระบบส่งเสริม ตัวอย่างพันธุ์พืชเพาะเลี้ยงที่มีการทดลองนำร่องปลูกในสภาพไร่ และประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี ได้แก่ หน่อไม้ฝรั่ง กล้วย อ้อย สับปะรด ไผ่ เบญจมาศ และสตรอเบอรี่ เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การตรวจสอบการเกิดโรคเหี่ยวของสับปะรดและนับจำนวนเพลี้ยแป้งสับปะรดในแปลกปลูก

ตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* ซึ่งมีแหล่งปลูกที่สำคัญในประเทศไทยคือ ภาคเหนือ ได้แก่จังหวัดลำปาง จังหวัดเชียงราย และจังหวัดอุตรดิตถ์ ภาคตะวันออกได้แก่ จังหวัดชลบุรี ภาคใต้ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาคตะวันตกได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี แปลงปลูกที่ได้มีการติดตามอาการของโรคและตรวจนับจำนวนแมลงคือ แปลงปลูกสับปะรดของบริษัททิปโก้ ประเทศไทย โดยสับปะรดที่ทำการตรวจโรคคือพันธุ์ปัตตาเวียที่มีอายุประมาณ 6 เดือน ขยายพันธุ์จากหน่อขนาดกลาง (น้ำหนักประมาณ 500 กรัม) และแปลงปลูกสับปะรดที่จังหวัดชลบุรีซึ่งเป็นแปลงปลูกของบริษัท อาหารสยาม จำกัด อายุประมาณ 5 เดือน ขยายพันธุ์จากหน่อขนาดกลาง (น้ำหนักประมาณ 500 กรัม) การตรวจโรคในขั้นแรกทำโดยการติดป้ายระบุตำแหน่งของต้นสับปะรดที่ตรวจสอบทั้งหมด 400 ต้นในแปลงปลูกจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และ 200 ต้น ในแปลงปลูกจังหวัดชลบุรีโดยแบ่งเป็นแถว แถวละ 20 ต้น ติดป้ายระบุตำแหน่งในแถวโดยเว้นห่างกันประมาณ 2-3 ต้น การกำหนดจำนวนแถวแบ่งโดยให้มี 5 แถวในแต่ละแปลงรวมทั้งหมด 4 แปลงปลูก และเว้นระยะห่างระหว่างแถวที่ติดป้ายประมาณ 2-3 แถว การตรวจสอบอัตราการเกิดโรคและนับจำนวนประชากรเพลี้ยแป้งมีการตรวจทุก ๆ 30-40 วัน ลักษณะแปลงปลูกที่ติดป้ายระบุตำแหน่งเป็นดังนี้



ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 1 แสดงอาการลำต้นแคระแกร็น (dwarf) ในแต่ละระดับของสับปะรดซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus*

ก. แสดงอาการลำต้นแคระแกร็นของสับปะรดในระดับ 1

ข. แสดงอาการลำต้นแคระแกร็นของสับปะรดในระดับ 2

ค. แสดงอาการลำต้นแคระแกร็นของสับปะรดในระดับ 3

ง. แสดงอาการลำต้นแคระแกร็นของสับปะรดในระดับ 4

จ. แสดงอาการลำต้นแคระแกร็นของสับปะรดในระดับ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 2 แสดงอาการใบด่าง (mottling leaves) ในแต่ละระดับของสับปะรดซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug Wilt-associated virus*

ก. แสดงอาการใบด่าง ของสับปะรดในระดับ 1

ข. แสดงอาการใบด่าง ของสับปะรดในระดับ 2

ค. แสดงอาการใบด่าง ของสับปะรดในระดับ 3

ง. แสดงอาการใบด่าง ของสับปะรดในระดับ 4

จ. แสดงอาการใบด่าง ของสับปะรดในระดับ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 3 แสดงอาการใบแดง (reddening leaves) ในแต่ละระดับของสับปะรดซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt- associated virus*

ก. แสดงอาการใบแดงของสับปะรดในระดับ 1

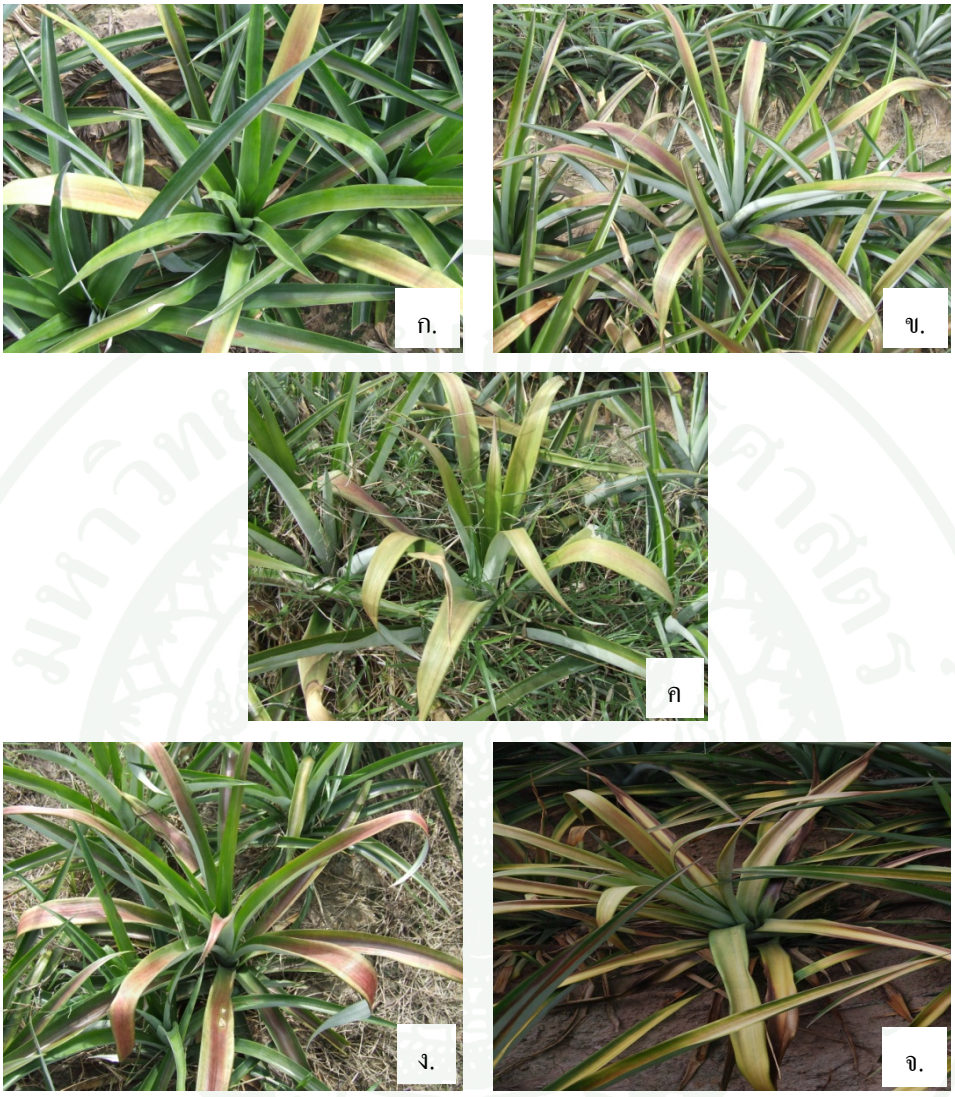
ข. แสดงอาการใบแดงของสับปะรดในระดับ 2

ค. แสดงอาการใบแดงของสับปะรดในระดับ 3

ง. แสดงอาการใบแดงของสับปะรดในระดับ 4

จ. แสดงอาการใบแดงของสับปะรดในระดับ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 รูปแสดงอาการเหี่ยว (wilt) ในแต่ละระดับของสับปะรดซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus*

ก. แสดงอาการเหี่ยวของสับปะรดในระดับ 1

ข. แสดงอาการเหี่ยวของสับปะรดในระดับ 2

ค. แสดงอาการเหี่ยวของสับปะรดในระดับ 3

ง. แสดงอาการเหี่ยวของสับปะรดในระดับ 4

จ. แสดงอาการเหี่ยวของสับปะรดในระดับ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรดด้วยเทคนิค RT-PCR ภายในแปลงปลูก

ตรวจสอบการเกิดโรคเหี่ยวของสับปะรดภายในแปลงทดลอง เก็บสุ่มตัวอย่างทั้งหมดคิดเป็น 10% ของตัวอย่างที่ทำการติดป้ายทั้งหมด และเก็บตัวอย่างสับปะรดในประเทศไทยตามแหล่งปลูกที่สำคัญ นำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ตัว ตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose gel

3. การตรวจนับจำนวนเพลี้ยแป้งสับปะรด (*Dysmicoccus brevipes*.) ในแปลงปลูก

การตรวจนับเพลี้ยแป้งในแปลงปลูกทำโดย ตรวจนับจำนวนเพลี้ยแป้งที่บริเวณโคนต้นใต้ดินจนถึงบริเวณลำต้นเหนือดิน กำหนดการตรวจพบประชากรของเพลี้ยแป้งดังนี้ 0-20 ตัว ให้อยู่ในเกณฑ์น้อยมาก เพลี้ยแป้งจำนวนน้อยกว่าหรือเท่ากับ 50 ตัว อยู่ในเกณฑ์ปานกลาง เพลี้ยแป้งมากกว่าหรือเท่ากับ 100 ตัวขึ้นไปให้อยู่ในเกณฑ์มากที่สุด และนำจำนวนเพลี้ยแป้งมาหาความสัมพันธ์การระบาดของเพลี้ยแป้งและสภาพอาการโรงเหี่ยวของสับปะรดในฤดูปลูก โดยเทียบเคียงจากอาการในข้อ 1 และตรวจสอบหาเชื้อไวรัส PMWaV ด้วยเทคนิค RT-PCR

4. ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนและโคลนยีน Coat protein, Cellular heat shock protein 70 homologue และ ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส PMWaV1

ออกแบบไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ Coat protein gene ของเชื้อไวรัสคือ PMWaV-1, PMWaV-2, PMWaV-3, PMWaV-4 และ PMWaV-5 ซึ่งมีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกาไว้ในฐานข้อมูลของ GenBank โดยใช้โปรแกรม Vector NTI 11 ออกแบบไพรเมอร์ดังนี้ PMWaV-1-CP-F 5′-CAC CAT GGC TGA TTC GAG CAA ACA AAA ACA AAC-3′ และ PMWaV-1-CP-R 5′-TTA TTT GCG TCC ACC CAT AAA GAT GTG CGG-3′, PMWaV-2-CP-F 5′-CAC CAT GGC TCA GAA TTA CGT ACG CGT AGT AGA-3′ และ PMWaV-2-CP-R 5′-CTA CCC TGA AAC AGC TCC CTG GTT CAG CTG GT-3′, PMWaV-3-CP-F 5′-CAC CAT GAG TAC GAT TCC AGT ACC ACC TCC T-3′ และ PMWaV-3-CP-R 5′-TCA TCT GCG ATT ACC TGT AAA TAT TTG AGG AG-3′, PMWaV-4-hsp70-F 5′-ATG GAG GTG GGC TAC GAA TTC GGG ACG AC-3′ และ PMWaV-4-hsp70-R 5′-GAA GCT TTC AAA GCC ATG TCT CTT GTA AA-3′, PMWaV-5-hsp70-F 5′-ATA CTC GAC CTT GTG TTT CTC ACC CGG-3′ และ PMWaV-5-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

hsp70-R 5′-TAA ACC AGT AGA TAA TTC ATA TCA CTT TT-3′ เพื่อใช้ในการตรวจสอบการระบาดของเชื้อไวรัสในแต่ละพื้นที่ จากนั้นนำมาตรวจโรคด้วยเทคนิค RT-PCR ตัว ตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose gel

4.1 การสกัดแยก RNA รวม

สกัด RNA รวมของพืชและไวรัสด้วย Trizol Reagent นำ RNA ที่สกัดจากใบพืชที่เป็นโรคด้วยวิธี Two step RT-PCR ตามวิธีของ บริษัท QIAGEN สหรัฐอเมริกา มีวิธีการและขั้นตอนดังนี้ คือ

บดตัวอย่างใบสับปะรดด้วยไนโตรเจนเหลวจนกระทั่งอยู่ในลักษณะของแป้ง ย้ายตัวอย่างที่บดได้จำนวน 100 มิลลิกรัม ลงหลอด Ependorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol Reagent 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex นาน 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม Chloroform 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ 10 นาที เก็บส่วนใน เติม Isoethanol อัตราส่วน 1:1 ของส่วนใส เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ 15 นาที ทิ้งส่วนใส ล้างด้วย 70% ethanol 300 ไมโครลิตร 2 ครั้ง ละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำ RNase Free Water 50 ไมโครลิตร

4.2 การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของยีน CP gene ด้วยวิธี RT-PCR

เพิ่มปริมาณของยีนแต่ละส่วนของยีน PMWaV1 และ PMWaV2 ด้วยชุด M-MuLV Reverse Transcription RT-PCR (INVITROGEN®) โดยใช้เทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) การสังเคราะห์สาย complementary DNA (cDNA) โดยใช้ reverse primer ที่ได้จากการออกแบบ การเตรียมปฏิกิริยา RT-PCR จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ที่ได้จากขั้นตอนแรกเป็น template ซึ่งการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ในแต่ละส่วนนั้นขึ้นอยู่กับคู่ไพรเมอร์ที่ใช้ นำไปใส่เครื่อง Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN-ELMER) และสังเคราะห์หา Partial genomic ของเชื้อไวรัส PMWaV1 ด้วยไพรเมอร์ทั้งหมด 8 คู่ (ตารางที่ 7) โดยตั้งโปรแกรมที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส 1นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที 35 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที 1 รอบ วิเคราะห์ผลการสังเคราะห์ โดยนำส่วนผสมหลังทำปฏิกิริยา RT-PCR 8 ไมโครลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผสมกับ loading dye 3 ไมโครลิตร มาแยกขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟริซิส โดยใช้ 1% agarose gel ใน 1x TAE buffer ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 135 โวลต์ 25-30 นาที จากนั้นนำเจลไปย้อมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ 5 นาที ตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose gel

4.3 ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส PMWaV1 แบบ partial genome โดยโปรแกรม Vector NTI 11

โดยออกแบบครอบคลุมยีน ORF1, Helicase, RdRp และ Heat shock 70 การออกแบบใช้ไพรเมอร์ทั้งสิ้น 8 คู่ (ตารางที่ 7) โดยในแต่ละคู่ออกแบบให้มีบริเวณซ้อนทับกันประมาณ 50 คู่เบส จากนั้นนำไปสกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีในข้อ 4.1 และ 4.2 เมื่อได้ขนาดดีเอ็นเอที่ต้องการแล้วนำไปทำให้บิรสุทธิ์ด้วยชุด Gel extraction kit (D5200-01 OMEGA) และนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Qiagen ประเทศเกาหลีต่อไป

5. ตราวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Duplex Polymerase Chain Reaction

นำ cDNA ที่ได้จากข้อ 2.2 มาเพิ่มปริมาณ DNA ด้วยเทคนิค Duplex PCR ปริมาตร 1 ไมโครลิตรเติม PCR cocktail (dH_2O ปริมาตร 35 ไมโครลิตร, 10x buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse ของ ยีน Coat protein ทั้ง PMWaV1 และ 2 ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, 2.5 mMdNTP ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และ Taq polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร) ปฏิกิริยารวมปริมาตร 50 ไมโครลิตรนำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN-ELMER) กำหนดให้เกิดปฏิกิริยาด้วยการเริ่มต้นขั้นแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denature) นาน 3 นาที จากนั้นเริ่มรอบ ปฏิกิริยาขั้นที่สอง โดยใช้อุณหภูมิ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป็นจำนวน 30 รอบและขั้นสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำการตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR โดยนำ product ปริมาตร 8 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose gel จากนั้นนำไปย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 10

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่า นาน 10 นาที แล้วจึงตรวจดูแถบดีเอ็นเอและขนาดดีเอ็นเอบนเครื่อง UV transilluminator

6. การโคลนชิ้นส่วนยีน Coat Protein

6.1 การเตรียมชิ้นผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์สำหรับการเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะ (vector)

นำดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR มาแยกขนาดด้วยการใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) บน 1% อะกาโรสเจล ใน 0.5 TAE buffer เป็นเวลา 25 นาที ความต่างศักย์ไฟฟ้า 135 โวลล์ ตัดเจลบริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการ ชั่งน้ำหนักเจลที่ตัดได้ใส่หลอด microtube ทำการแยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยใช้ QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN®) โดยการเติม Solubilization solution buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล ต้มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที จนเจลหลอมละลายหมด ผสมให้เข้ากัน ย้ายสารละลายทั้งหมดใส่ column ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ในด้านล่างของ column ล้าง column ด้วยการเติม Washing buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ล้าง 2 ครั้ง ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งเพื่อกำจัดสารละลายที่ตกค้างออกให้หมด ย้าย column ใส่ในหลอด microcentrifuge อันใหม่ เพื่อแยกดีเอ็นเอออกจาก column โดยการเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C ตรวจสอบผลการเตรียม cDNA ด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) บน1% อะกาโรสเจล ใน 0.5X TAE buffer เวลา 25 นาที ความต่างศักย์ไฟฟ้า 135 โวลล์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide (10 ug/ml) เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel Documentation (UVP®)

6.2 การเตรียม competent cell

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* Top10 ในอาหาร 2XYT เหลวที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ข้ามคืน นำเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหาร 2XYT เหลว ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน flask เขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง นำ flask ไปแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ละลายตะกอนเซลล์ด้วย TB buffer (EDTA 1 mM, KCL

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

183mM, Nacl 47 mM, Phenylmethylsulfonyl fluoride 1 mM, Tris-HCL 10 mM) ในอัตราส่วน 32 ml/2XYT 100 ml แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ด้วย TB buffer ปริมาตร 4-8 ml อีกครั้ง เขย่าในน้ำแข็งจนตะกอนละลายและเติม 7% DMSO (dimethyl sulfoxide) จากนั้นจึงแบ่งใส่หลอด microtube หลอดละ 50-100 ไมโครลิตร (เวลาแบ่งแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนนำมาใช้

6.3 การเชื่อมต่อชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR กับ Cloning vector

เชื่อมต่อชิ้นผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR กับ พลาสมิดพาหะ pCR®8/GW/TOPO vector® (Invitrogen®) ด้วยชุด pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit ด้วยการทำงานของเอนไซม์ Topoisomerase ที่ติดมากับปลายของเวคเตอร์ ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตโดยใช้ชิ้นผลิตภัณฑ์ของ CTV 1-3 ไมโครลิตร (200 นาโนกรัม หรือขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของ DNA) Topo vector 1 ไมโครลิตร (50 นาโนกรัม) สารละลายเกลือ 1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 6 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

6.4 การถ่ายพลาสมิดสายผสม เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10

ย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ Top10 โดยวิธี ของ (Sambrook *et al.*, 1989) โดยดูดสารละลายพลาสมิดสายผสมจากปฏิกิริยาใน ข้อ 6.3 ทั้งหมดใส่หลอดที่มีเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้านที่พร้อมรับพลาสมิด (*E. coli* Top10 competent cell) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับไปมา แล้วแช่หลอดไว้ในน้ำแข็ง 30 นาทีทันที จากนั้นย้ายหลอดลงในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 ºC เป็นเวลา 90 วินาที และรีบแช่หลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 2 นาที เติมอาหารเหลว 2XYT สำหรับเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวออก เติมอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมกันเบาๆ ให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียในหลอดมาเกลี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 2XYT ชนิดแข็งที่เติม Spectinomycin 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีสีขาวขุ่นมาเลี้ยงเชื้อ ในอาหาร 2XYT ที่เติม Spectinomycin 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อเก็บเชื้อหรือสกัดพลาสมิดต่อไป

6.5 การสกัดพลาสมิดของดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA)

สกัดพลาสมิดสายผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธี alkaline lysis ดัดแปลงจาก Sambrook *et al.* (1989) โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียที่มีโคโลนีมาเลี้ยงในอาหารเหลว 2XYT ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติม Spectinomycin 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บนเครื่องเขย่า 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37º C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ดูดเอาอาหารออก เติม TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เติม Lysis buffer (0.2 M NaOH, 1% SDS) ที่เตรียมใหม่ก่อนใช้งานปริมาตร 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมาเบาๆจนสารละลายเริ่มหนืด แล้วเติม solution III (3M potassium acetate) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา หมุนเติม CH_2Cl_2 200 ไมโครลิตร แช่น้ำแข็ง 10 นาที เหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนที่มีพลาสมิดใส่หลอดใหม่ เติม Isopropanol ที่แช่เย็นปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วหมุนเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ 70% หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ละลายด้วยน้ำกลั่น 45 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ RNase A เพื่อขจัดอาร์เอ็นเอบ่มที่ 37º C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ตรวจสอบผลด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (gel electrophoresis) บน 1% agarose เจลใน 0.5X TAE buffer เวลา 25 นาที ที่ความต่างศักดิ์ 135 โวลล์ จากนั้นนำไปแช่สารละลาย ethidium bromide (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่าก่อนนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง Gel Documentation (UVP®)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.6 การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ

นำพลาสมิดที่ได้จากการสกัดไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สถาบันจีโนม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี ด้วยเทคนิค dideoxy-chain termination โดยใช้ชุดปฏิกิริยา Big dye sequencing Kit

6.7 นำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาผสานกันโดยใช้โปรแกรม Fintch TV

จากผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการส่งวิเคราะห์ลำดับเบส เมื่อทำการตรวจสอบและยืนยันความถูกต้องของผลโดยการนำผลที่ได้ ไปเข้าโปรแกรม BLAST ในฐานข้อมูลของเว็บไซด์ NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) เพื่อเปรียบเทียบความถูกต้องของลำดับเบสจากผลที่ได้ นำแต่ละส่วนมาจัดเรียงต่อกันด้วยโปรแกรม Fintch TV ในส่วนของการ Assembly ลำดับเบส โดยเริ่มทำการจัดเรียงลำดับเบสตั้งแต่ส่วน 5'UTR จนถึง 3'UTR จนครบทั้งยีน Coat protein ซึ่งลำดับเบสแต่ละส่วนจะมีส่วนที่ทับซ้อนและแตกต่างกันเพื่อใช้เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสที่เคยรายงานไว้ในฐานข้อมูลของประเทศสหรัฐอเมริกา

7. ตววจสอบความสามารถในการถ่ายทอดโรคของเพลี้ยแป้งสับปะรด

ตรวจสอบความสามารถการถ่ายทอดโรคโดยเก็บตัวอย่างเพลี้ยแป้งจากต้นสับปะรดที่เป็นโรค และตรวจสอบหาเชื้อไวรัสภายในตัวเพลี้ยแป้งด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งในแต่ละตัวอย่างแบ่งการตรวจสอบโดยใช้จำนวนเพลี้ยแป้งในการตรวจสอบคือ 1,3,5 และ 7 ตัว ตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose gel

ทดสอบโดยการปลูกสับปะรดจากหน่อขนาดกลาง (น้ำหนัก 400-600 กรัม) ลงในกระถางขนาด 9 นิ้ว ทั้งหมด 12 ต้น และทำการตรวจโรคทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 90 วัน เพื่อทดสอบความปลอดโรคของต้นสับปะรด นำแมลงจำนวน 1,3,5 และ 7 ตัว ใส่ลงในแต่ละกระถาง ทำอย่างละ 3 ซ้ำ หลังจากนั้นคลุมด้วยถุงพลาสติกเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ฉีดยาฆ่าเพลี้ยแป้งไทอะมีโซแทม 25% เพื่อกำจัดเพลี้ยแป้ง เลี้ยงต้นสับปะรดต่อไปให้มีอายุประมาณ 5 เดือน จึงนำมาตรวจสอบความสามารถในการถ่ายทอดโรคของเพลี้ยแป้งด้วยเทคนิค RT-PCR ตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose gel

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การแยกสกัดดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากเจล

นำผลิตภัณฑ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการทำ PCR มาตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอบน 1% agarose gel จากนั้นตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม Binding buffer ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจล นำไปอุ่นด้วยน้ำร้อนอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส จนเจลละลายจากนั้นนำสารละลายที่ได้ ไปผ่าน HiBind® DNA spin-column ปริมาตรจำนวน 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ล้าง HiBind® DNA spin-column ด้วย 70% ethanol ปริมาตรจำนวน 300 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำ HiBind® DNA spin-column ไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนอีกรอบเพื่อกำจัด 70% ethanol ออก ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ย้าย HiBind® DNA spin-column สีม่วงที่อยู่ด้านไปใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution buffer จำนวน 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที จากนั้นนำดีเอ็นเอเป้าหมายที่แยกสกัดได้ไปตรวจสอบขนาดบน 1% agarose gel

9. ทดสอบความสามารถการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยการขยายพันธุ์ผ่านทางวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

9.1 ตรวจสอบการเป็นโรคของหน่อและจุกสับปะรดก่อนนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค RT-PCR ตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose gel เพื่อยืนยันการเป็นโรค นำหน่อและจุกที่เป็นโรคแกะใบออกให้เหลือแต่เนื้อเยื่อสีขาวภายใน แช่ด้วย 30% Clorox นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนาน 5 นาที 2 ครั้ง ย้ายเนื้อเยื่อแช่ลงใน absolute alcohol 95% นาน 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนาน 5 นาที 2 ครั้ง ซับด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึงฆ่าเชื้อให้แห้ง ตัดแบ่งชิ้นพืชให้เป็นชิ้นขนาดเล็กประมาณ 1*1 เซนติเมตร ย้ายชิ้นพืชลงฟอกใน 10% Clorox นาน 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านนึ่งฆ่าเชื้อแล้วนาน 5 นาที 2 ครั้ง นำเนื้อเยื่อพืชมาซับด้วยกระดาษทิชชูที่ผ่านการนึงฆ่าเชื้อให้แห้ง วางชิ้นเนื้อเยื่อภายในตู้ปลอดเชื้อทิ้งไว้ประมาณ 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายลงอาหารแข็งที่การเติมฮอร์โมน BAP 3 (3ppm of benzylaminopurine) เพื่อชักนำให้เกิดการแตกแคลลัสประมาณ 3-4 เดือน ย้ายเนื้อเยื่อพืชลงในอาหารแข็ง Murashige and Skoog (MS) นำไปวางในห้องเพาะเลี้ยงที่มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุณหภูมิประมาณ 23-25 องศาเซลเซียส โดยให้แสงแก่เนื้อเยื่อสับปะรด 16 ชั่วโมงและงดให้แสง 8 ชั่วโมงต่อวัน ประมาณ 7 เดือน

9.2 หลังจากนั้นนำต้นสับปะรดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาตรวจสอบความสามารถการถ่ายทอดโรคโดยเทคนิค RT-PCR ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 1% TBE agarose

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลการทดลอง

1. การพัฒนาลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด

จากการศึกษาลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดซึ่งได้ทดลองในแปลงปลูกของเกษตรกรในสองจังหวัดคือ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดชลบุรี การทดลองมีการเก็บตัวอย่างในทุกๆ 1 เดือนเพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสและตรวจสอบการพัฒนาลักษณะอาการของไวรัสในแปลงปลูกในระยะเวลา 1 ปี โดยตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR และสำรวจอาการที่ปรากฏบนต้นสับปะรด พบว่ามีทั้งหมด 4 อาการคือ ลักษณะอาการใบแดง (reddening leaves) อาการเหี่ยว (wilt) อาการใบด่าง (mottling leaves) และอาการต้นแคระแกรน (dwarf) จากการสำรวจลักษณะอาการจะสัมพันกับช่วงอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและลดลงในแต่ละเดือน ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณฝนที่ตก และปริมาณแสงต่อวัน ในแต่ละเดือนที่มีการศึกษา

จากการสำรวจลักษณะอาการไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดที่ปลูกในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์มีลักษณะอาการใบด่างเพิ่มมากขึ้นซึ่งได้มีการศึกษาสำรวจลักษณะอาการตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์จนถึงเดือน พฤศจิกายน 2553 และสภาพอุณหภูมิในระหว่างเดือนในแปลงปลูกจะอยู่ในช่วง 27°C - 30°C ลักษณะอาการใบแดงจะลดลงตั้งแต่เดือนมิถุนายนจนถึงเดือนพฤศจิกายน ส่วนอาการใบเหี่ยวและอาการต้นแคระแกรนนั้นจะสำรวจพบได้ตั้งแต่ในเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน และจากการสำรวจในครั้งนี้พบว่าลักษณะอาการใบเหี่ยวและอาการต้นแคระแกรนจะแสดงอาการได้ต้องมีอุณหูมิ $\geq$ 27°C (ภาพที่ 5ก.) ซึ่งจากการพบลักษณะอาการที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากในช่วงเดือน กันยายนเป็นต้นไปเกษตรกรมีการหยอดแก๊สแคลเซียมคาร์ไบด์ (calcium cabide) หรือเอทิฟอน (ethephon) เพื่อให้สับปะรดมีการพัฒนาเพื่อสร้างดอก และพืชอาจมีการอ่อนแอทำให้ไวรัสสามารถพัฒนาอาการได้มากขึ้นและมีอาการที่รุนแรงมากขึ้น ส่วนปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศจะอยู่ในช่วง 71-81 และจากการสำรวจพบลัษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวทั้ง 4 อาการจะมีความชื้นสัมพัทธ์ค่อนข้างสูงโดยจะพบในเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน (ภาพที่ 5ข.) เช่นเดียวกับค่าปริมาณน้ำฝนและปริมาณแสงต่อวัน พบว่าในช่วงปลายฤดูฝน (กันยายนถึงตุลาคม) จะพบลักษณะอาการของโรคเหี่ยวที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยในช่วงที่ปลายฤดูฝนเข้าสู่ต้นฤดูหนาวจะสำรวจพบลักษณะอาการของโรคทั้ง 4 อาการ อาจเนื่องมาจากสภาพภูมิอากาศในช่วงที่กล่าวมานี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เหมาะสมต่อการพัฒนาลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทยที่ปลูกในแถบจังหวัดภาคใต้ (ภาพที่ 6ก. และภาพที่ 6ข.)

การสำรวจลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่ปลูกในเขตภาคตะวันออกคือจังหวัดชลบุรีในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนพฤศจิกายน 2553 และเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนสิงหาคม 2554 ซึ่งจากการสำรวจลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดพบว่าสับปะรดจะแสดงลักษณะอาการใบแดง (Reddening leave) อาการเหี่ยว (wilt) อาการใบด่าง (mottling leave) และอาการต้นแคระแกรน (dwarft) ในช่วงปลายฤดูฝนจนถึงต้นฤดูหนาวเหมือนกับการสำรวจในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดชลบุรีพบว่าในช่วงฤดูร้อนสับปะรดจะแสดงอาการที่รุนแรงได้เช่นเดียวกับช่วงปลายฤดูฝนจนถึงต้นฤดูหนาว คือในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน โดยอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 27°C - 29°C (ภาพที่ 7ก.) และข้อสังเกตที่พบคือในช่วงฤดูร้อน (เดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม) สับปะรดจะแสดงอาการใบแดงในปริมาณมากขึ้นโดยมีปริมาณความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 74-75 (ภาพที่ 7ข.) แต่ในช่วงฤดูฝน (เดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม) จะไม่พบลักษณะอาการต้นแคระแกรนในแปลงปลูกสับปะรด และลักษณะอาการอื่นๆก็ลดน้อยลงด้วยเช่นเดียวกัน โดยในช่วงเดือนเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม จะพบว่ามีปริมาณน้ำฝนและปริมาณแสงต่อวัน ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 8ก. และภาพที่ 8ข.) โดยพบว่าในแต่ละช่วงฤดูกาลการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน และปริมาณแสงต่อวัน นั้นจะมีผลต่อการพัฒนาลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยที่เอื้อต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อในต้นสับปะรดด้วย

ต้นสับปะรดมีการเปลี่ยนแปลงของอาการที่บ่งบอกถึงอาการของโรคเหี่ยวหลังจากที่มีการหยอดสารเร่งการออกดอกได้แก่ แคลเซียมคาร์ไบด์ (calcium carbide) หรือ เอทิฟอน (Ethephon) พบว่าต้นสับปะรดมีการแสดงออกของอาการใบแดง ใบด่าง ลำต้นแคระแกร็น และเหี่ยว เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นหลังจากมีการหยอดแก๊สในเดือนมิถุนายนที่แปลงปลูกของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ อาการที่บ่งบอกถึงโรคเหี่ยวหลังจากมีการหยอดแก๊สนั้นมีลักษณะคล้ายคลึงเช่นกันในแปลงปลูกจังหวัดชลบุรี แต่อาการของโรคในจังหวัดชลบุรีจะเริ่มลดความรุนแรงลงหลังจากเริ่มเข้าสู่ฤดูฝนซึ่งเป็นช่วงที่มีอุณหภูมิที่เย็นลงประกอบกับไม่มีการหยอดแก๊สเอทิฟอนเพื่อเร่งให้สับปะรดออกดอก ประกอบกับอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดปีของแปลงปลูกจังหวัดชลบุรีต่ำกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แปลงปลูกจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สับปะรดในแปลงปลูกจังหวัดชลบุรีจึงไม่มีแสดงอาการของโรคให้เห็นชัดเจนเหมือนในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ตรวจสอบอัตราการเกิดโรคเหี่ยวของสับปะรดที่ปลูกในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์โดยการเก็บตัวอย่างจำนวน 40 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10 ของจำนวนต้นสับปะรดที่ทำการติดตาม พบว่าอัตราการเกิดโรคนั้นจะเกิดขึ้นสูงเมื่อพบการระบาดของเพลี้ยแป้งในปริมาณที่สูงตามไปด้วย (ตารางที่ 1) ในขณะเดียวกันเมื่อทำการตรวจสอบอัตราการเกิดโรคเหี่ยวของสับปะรดในแปลงปลูกจังหวัดชลบุรี โดยการเก็บตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 10 ของจำนวนต้นสับปะรดที่ทำการติดตาม พบว่าอัตราการเกิดโรคจะสูงขึ้นหลังจากมีการระบาดของเพลี้ยแป้งอย่างรุนแรงในแปลงปลูก (ตารางที่ 2)

สำรวจเพลี้ยแป้งสับปะรด (*Dysmicoccus Brevipes*.) ที่เป็นแมลงพาหะถ่ายทอดเชื้อไวรัส PMWaV ในแปลงปลูกจังหวัดประจวบคีรีขันธ์พบว่าเพลี้ยแป้งอาศัยอยู่บริเวณกาบใยด้านในจนไปถึงโคนต้น และรากใต้ดิน (ภาพที่ 21) การระบาดของเพลี้ยแป้งสูงมากในช่วงที่อากาศร้อนและไม่มีฝนตกในช่วงเดือนมีนาคมและเมษายน การระเบิดเริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่ฤดูฝนในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคมและเพลี้ยแป้งจะกลับมาระบาดอีกครั้งเมื่อฤดูฝนเริ่มหมดไปตั้งแต่เดือนสิงหาคมเป็นต้นไป การสำรวจการระบาดของเพลี้ยแป้งในจังหวัดชลบุรีพบว่าลักษณะการระบาดของเพลี้ยแป้งคล้ายคลึงกับจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยเพลี้ยแป้งจะเริ่มมีการระบาดในเดือนพฤศจิกายนซึ่งเป็นช่วงที่สิ้นสุดฤดูฝนและเริ่มเข้าสู่ฤดูหนาวและมีการระบาดอย่างต่อเนื่องไปจนถึงเดือนเมษายนในปีถัดไป การระบาดเริ่มน้อยลงเมื่อเริ่มเข้าสู่ฤดูฝนในเดือนพฤษภาคม (ตารางที่ 1 และ 2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 การสำรวจอาการของโรคเหี่ยวสับปะรดและการระบาดของเพลี้ยแป้งในแปลงปลูกจังหวัดประจวบคีรีขันธ์จำนวน 400 ต้นทุก ๆ เดือน

เดือน (ปี)	ลักษณะอาการ				RT-PCR		การเกิดโรค (%)	จำนวนเพลี้ยแป้ง
	R	M	W	D	PMWaV1	PMWaV2		
Feb 2010	400	330	45	NS	-	-	ND*	-
Mar 2010	400	397	34	NS	-	-	ND*	**
Apr 2010	400	399	24	NS	+	+	35.00%	***
May 2010	400	400	19	NS	-	-	ND*	-
June 2010	400	400	NS	NS	+	-	34.70%	-
July 2010	400	400	NS	2	-	-	ND*	-
Aug 2010	400	400	8	5	+	+	22.50%	**
Oct 2010	400	400	16	8	-	-	ND*	*
Nov 2010	400	400	16	11	+	-	52.50%	-

หมายเหตุ - ระดับความรุนแรงของโรค และจำนวนแมลงที่พบภายในแปลงปลูกจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

- สุ่มตรวจตัวอย่างภายในแปลงปลูก 10 % ของตัวอย่างทั้งหมด 400 ตัวอย่าง

การประเมินปริมาณแมลงในแปลงปลูกสับปะรด

*** จำนวนเพลี้ยแป้งสูง (>100 mealybugs)

** จำนวนเพลี้ยแป้งปานกลาง (□50 mealybugs)

* จำนวนเพลี้ยแป้งน้อย (≤ 20 mealybugs)

R = อาการใบแดง

M = อาการใบด่าง

W = อาการเหี่ยว

D = อาการลำต้นแคระแกร็น

NS = ไม่พบอาการของโรค

ND* = ไม่มีการตรวจสอบด้วย RT-PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 การสำรวจอาการของโรคเหี่ยวสับปะรดและการระบาดของเพลี้ยแป้งในแปลงปลูก จังหวัดชลบุรีจำนวน 200 ต้นทุก ๆ เดือน

เดือน (ปี)	ลักษณะอาการ				RT-PCR		การเกิดโรค (%)	จำนวนเพลี้ยแป้ง
	R	M	W	D	PMWaV1	PMWaV2		
Aug 2010	200	200	NS	NS	-	-	ND*	-
Oct 2010	200	200	3	2	+	-	10.50%	-
Nov 2010	200	200	3	2	-	-	ND*	*
Feb 2011	200	200	3	2	+	+	24.00%	***
Mar 2011	200	200	3	2	-	-	ND*	***
Apr 2011	200	200	3	2	+	+	37.00%	**
May 2011	200	200	3	2	-	-	ND*	-
June 2011	200	200	3	NS	+	+	45.00%	-
July 2011	200	200	3	NS	-	-	ND*	-
Aug 2011	200	200	3	NS	+	-	27.00%	**

หมายเหตุ - ระดับความรุนแรงของโรค และจำนวนแมลงที่พบภายในแปลงปลูกจังหวัดชลบุรี

สุ่มตรวจตัวอย่างภายในแปลงปลูก 10 % ของตัวอย่างทั้งหมด 200 ตัวอย่าง

การประเมินปริมาณแมลงในแปลงปลูกสับปะรด

*** จำนวนเพลี้ยแป้งสูง (>100 mealybugs)

** จำนวนเพลี้ยแป้งปานกลาง (□50 mealybugs)

* จำนวนเพลี้ยแป้งน้อย (≤ 20 mealybugs)

R = อาการใบแดง

M = อาการใบด่าง

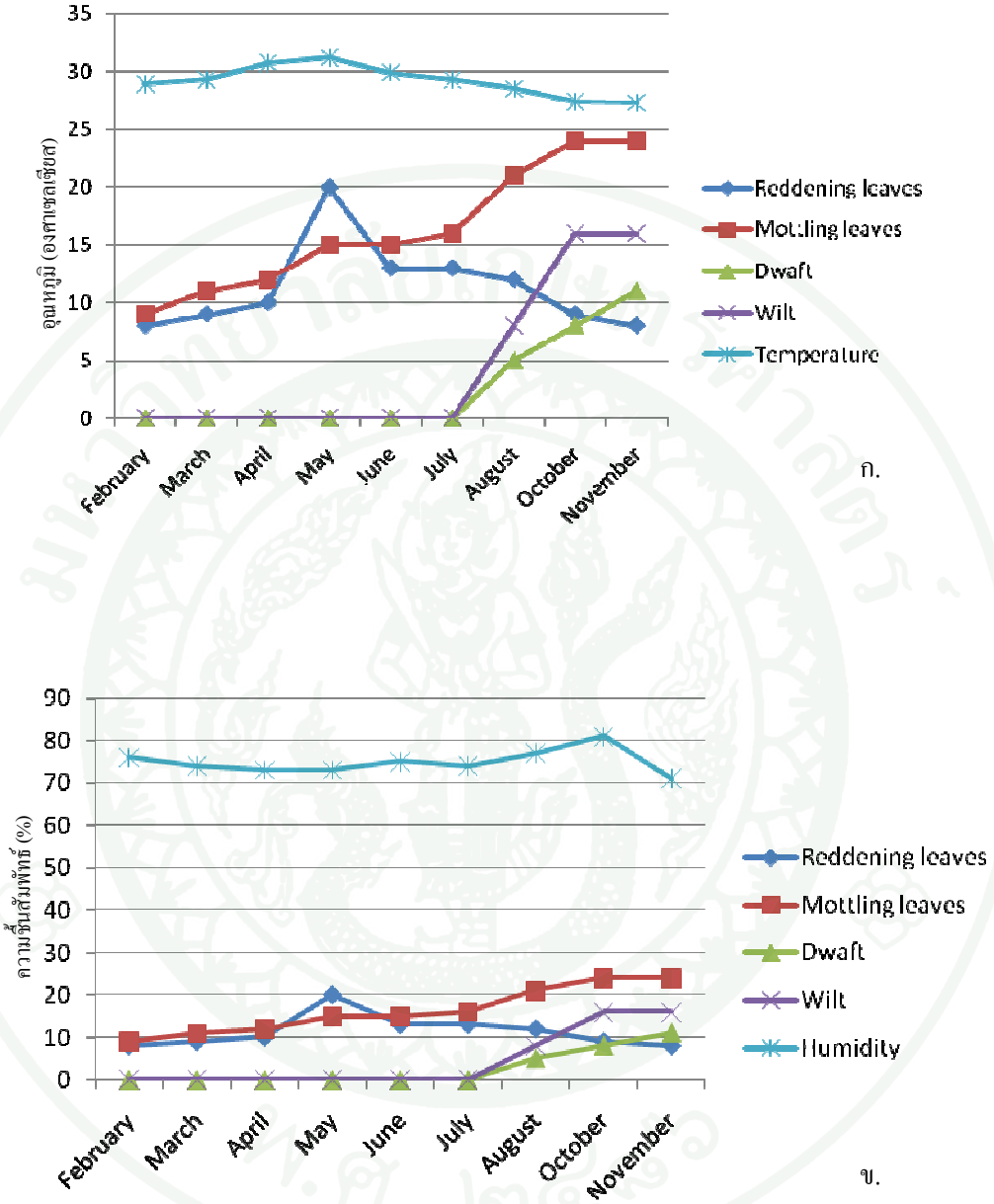
W = อาการเหี่ยว

D = อาการลำต้นแคระแกร็น

NS = ไม่พบอาการของโรค

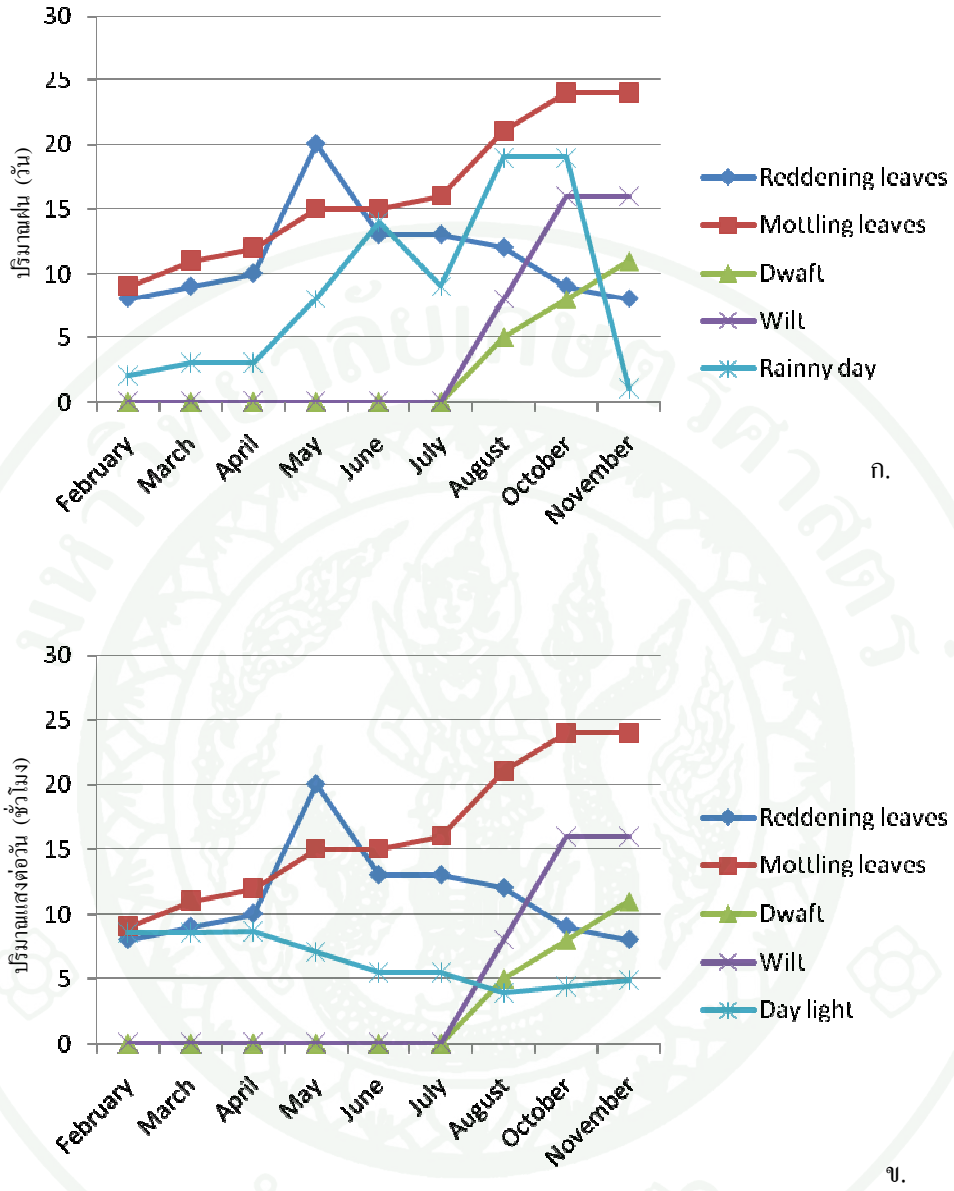
ND* = ไม่มีการตรวจสอบด้วย RT-PCR

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



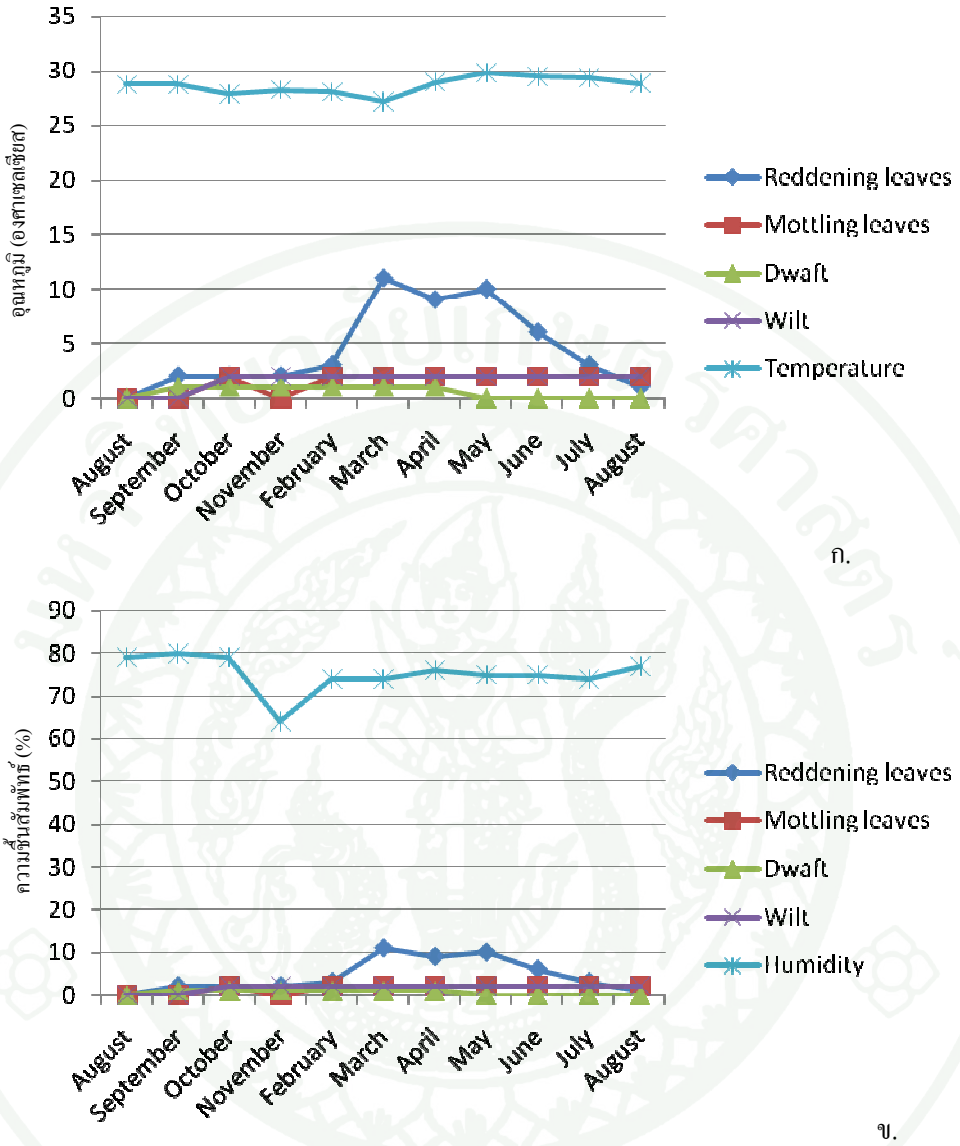
ภาพที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดกับอุณหภูมิ (ภาพ ก.) และความสัมพันธ์ระหว่างอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดกับความชื้น ณ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ภาพ ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



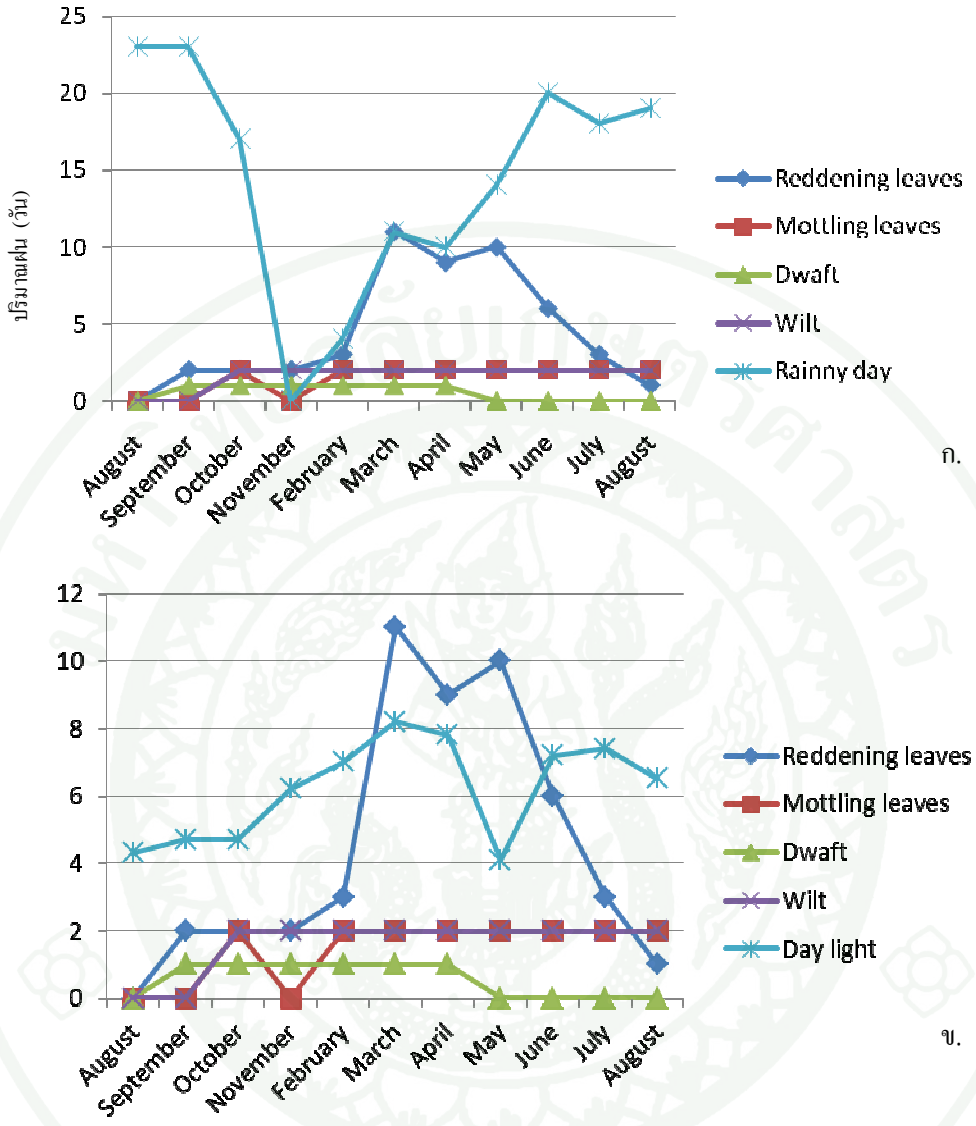
ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดกับวันที่มีฝนตก (ภาพ ก.) และ แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดกับปริมาณแสงต่อวัน ณ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (ภาพ ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดกับอุณหภูมิ (ภาพ ก.) และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดกับความชื้น ณ จังหวัดชลบุรี (ภาพ ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดกับความชื้น (ภาพ ก.) และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดกับความชื้น ณ จังหวัดชลบุรี (ภาพ ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. สำรวจแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญในประเทศไทย

เก็บตัวอย่างสับปะรดในแหล่งปลูกที่สำคัญของประเทศไทยในเขตภาคเหนือ ภาคตะวันออก และภาคใต้ ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสับปะรดเพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งโรงงานอุตสาหกรรม ประกอบไปด้วยจังหวัด เชียงราย ลำปาง อุตรดิตถ์ ชลบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ จากนั้นเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการแสดงอาการใบแดง อาการใบด่าง อาการลำต้นแคระแกร็น และต้นเหี่ยว ซึ่งเป็นอาการหลักโรคเหี่ยวของสับปะรด โดยอาการดังกล่าวสามารถพบได้ทุกภูมิภาคที่ทำการสำรวจโรค โดยอาการดังกล่าวนั้นมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ PMWaV1 และ PMWaV2 ดังแสดงในภาพที่ 9 - 20

3. การตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดด้วยเทคนิค RT-PCR

จากการเก็บตัวอย่างมาตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR จากจังหวัด เชียงราย ลำปาง อุตรดิตถ์ ชลบุรี เพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 595 ตัวอย่างมาตรวจสอบกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับเชื้อไวรัส PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, PMWaV4 และ PMWaV5 พบว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบสามารถเกิดผลบวกกับเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ทั้งหมด 153 ตัวอย่าง มีขนาดแถบ DNA ของไวรัสเท่ากับ 774 คู่เบสและ 909 คู่เบสตามลำดับ และไม่เกิดผลบวกกับเชื้อไวรัส PMWaV3,PMWaV4 และ PMWaV5 จากการตรวจสอบพบว่าโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทยมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 เท่านั้น ตัวอย่างจากจังหวัดอุตรดิตถ์เกิดผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV2 ทั้งหมด 4 ตัวอย่าง ซึ่งแปลงปลูกในจังหวัดอุตรดิตถ์สามารถพบอาการของโรคเหี่ยวได้ทั้ง 4 อาการ ตัวอย่างจากจังหวัดลำปางเกิดผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง ซึ่งในจังหวัดลำปางนิยมปลูกพันธุ์ปัตตาเวียเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม โดยในแปลงปลูกพบลักษณะอาการของโรคเหี่ยวของสับปะรด ตัวอย่างจากจังหวัดเชียงรายเกิดผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ทั้งหมด 8 ตัวอย่าง ซึ่งนิยมปลูกสับปะรดพันธุ์นางแลเพื่อบริโภคผลสดภายในประเทศ ในแปลงปลูกของเกษตรกรมีการสำรวจพบเฉพาะอาการใบแดง อาการใบด่างและอาการเหี่ยว จากการตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR พบเพียงไวรัส PMWaV1 เท่านั้น (ตารางที่ 3) ตัวอย่างจากจังหวัดเพชรบุรีเกิดผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ทั้งหมด 34 ตัวอย่าง สับปะรดพันธุ์เพชรบุรีใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการบริโภคผลสดแบบแกะตาและสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ปลูกเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม พบอาการของโรคเหี่ยวของสับปะรดทั้ง 4 อาการ ตัวอย่างจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เกิดผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ทั้งหมด 57 ตัวอย่าง สับปะรดที่ปลูกในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เป็นแหล่งปลูกที่สำคัญเพื่อส่งโรงงานอุตสาหกรรม การสำรวจโรคในแปลงปลูกสามารถพบอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดได้ทั้ง 4 อาการ ตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรีเกิดผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ทั้งหมด 28 ตัวอย่าง ซึ่งแปลงปลูกในจังหวัดชลบุรีเป็นอีกแหล่งปลูกหนึ่งที่สำคัญเกี่ยวกับอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง สามารถพบอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดได้ในแปลงปลูก ดังแสดงในตารางที่ 3

4. การตรวจสอบเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ด้วยเทคนิค Duplex RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้จากใบสับปะรดมาทำการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายผสม (complementary DNA) ด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ในปฏิกริยาเดียวกัน แล้วนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายบน 1% agarose gel ปรากฏว่าได้แถบดีเอ็นเอที่มี 2 ขนาดบนเจล ซึ่งผลการทดลองนี้เกิดผลบวกได้กับไวรัสทั้ง 2 สายพันธุ์โดยได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 909 และ 774 คู่เบส ซึ่งเป็นขนาดดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ **22**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 9 แสดงสภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ห้วยมุ่น ต.น้ำปาด อ.ห้วยมุ่น จ.อุตรดิตถ์ (ก.) สับปะรดพันธุ์ห้วยมุ่นที่แสดงอาการโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อไวรัส PMWaV (ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 10 การระบาดของโรคเหี่ยวที่พบได้ภายในแปลงปลูกซึ่งการระบาดจะสามารถพบได้เป็นกลุ่ม (ก.) ลักษณะของสับปะรดที่แสดงอาการลำต้นแคระแกร็นมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสที่ ต.น้ำปาด อ.ห้วยมุ่น จ.อุตรดิตถ์ (ข.)

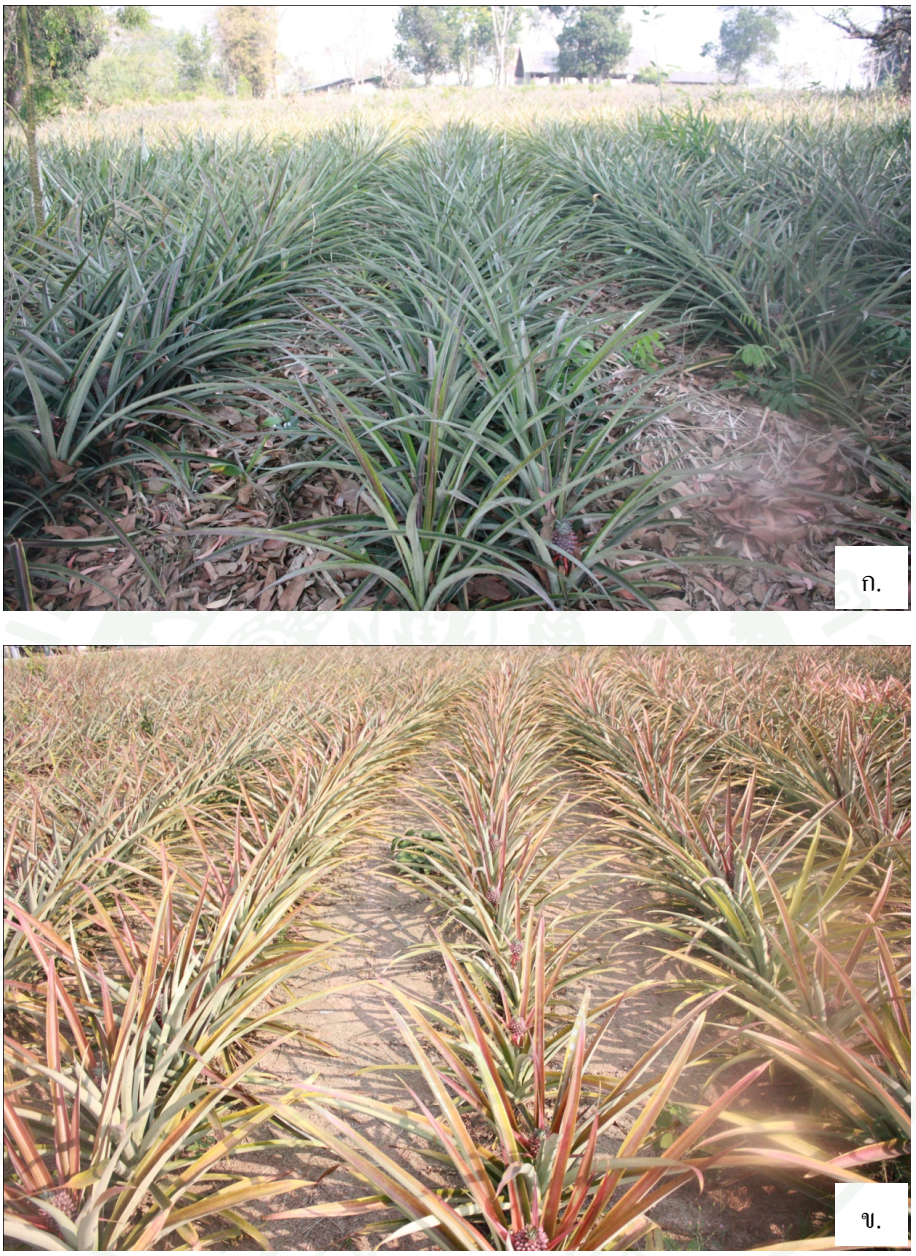
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 11 แสดงสภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ต.บ้านเสด็จ อ.เมือง จ.ลำปาง (ก.) อาการเหี่ยวของสับปะรดที่มีการระบาดภายในแปลงปลูก (ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 12 อาการของใบสับปะรดเกิดจุดจ้ำเขียว (green blotchy) ที่เกิดจากการดูดกินน้ำเลี้ยงของเพลี้ยแป้งสับปะรด (ก.) อาการลำต้นแคระแกร็นที่พบได้ในแปลงปลูกสับปะรดที่มีการระบาดของโรค (ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 สภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์นางแลที่ ต.นางแล อ.นางแล จ.เชียงราย (ก.) และ (ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 14 อาการของใบสับปะรดเกิดจุดจ้ำเขียว (green blotchy) ที่เกิดจากการดูดกินน้ำเลี้ยงของเพลี้ยแป้งสับปะรดที่เกิดขึ้นกับสับปะรด (ก.) พันธุ์นางแลที่ ต.นางแล อ.นางแล จ. เชียงราย

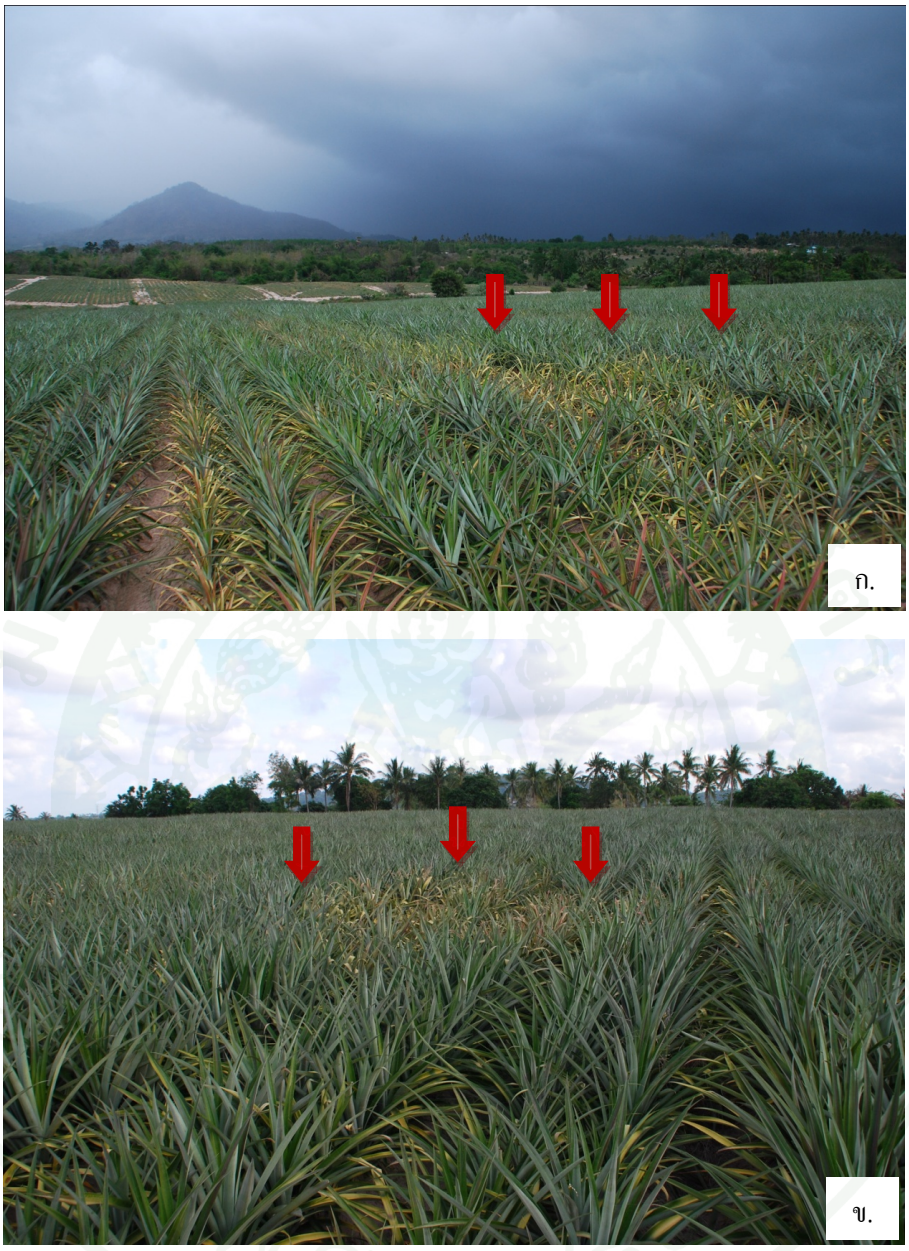
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 15 สภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์เพชรบุรีที่ อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี (ก.) และ (ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 16 ลักษณะอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดพันธุ์เพชรบุรีที่เกิดจากเชื้อไวรัส PMWaV แสดงอาการที่เห็นได้ชัดเจนที่สุดของสับปะรดพันธุ์นี้คืออาการใบแดง และอาการเหี่ยว (ก.) และ (ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 17 สภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ณ ต.คลองวาฬ อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ ที่พบการระบาดของโรคเหี่ยวแสดงให้เห็นเป็นพื้นที่วงกลมภายในแปลง (ก.) และ (ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 18 ลักษณะอาการปลายใบไหม้ (tip dieback) ของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่พบได้ภายในแปลงปลูก ณ ต.คลองวาฬ อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ (ก.) และอาการใบด่างที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส PMWaV (ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 19 สภาพแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ ต.บ้านบึง อ.บ้านบึง จ.ชลบุรี (ก.) อาการของสับปะรดที่มีอาการของโรคเหี่ยวอย่างรุนแรง สามารถพบได้ทั่วไปภายในแปลงปลูก (ข.)

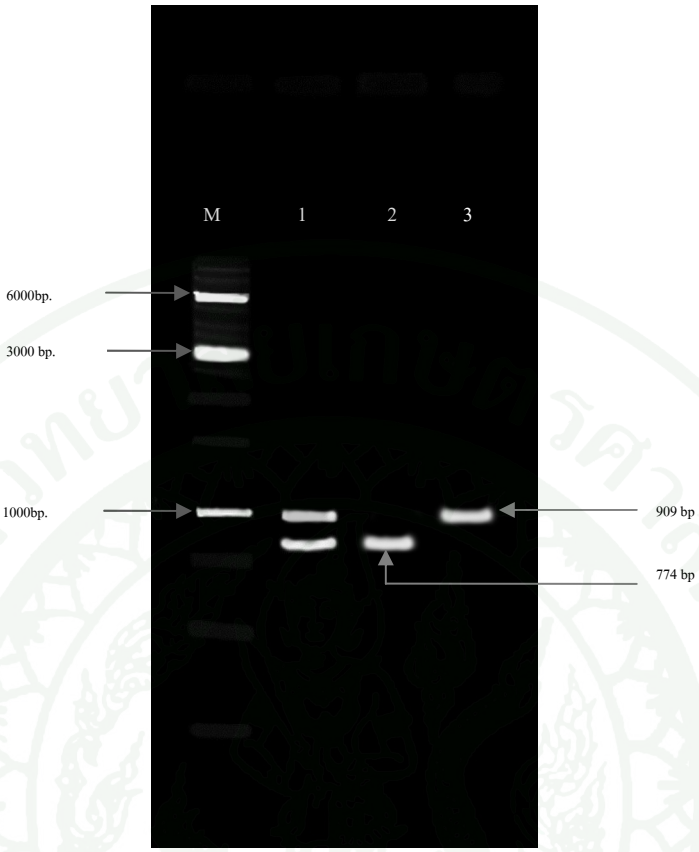
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 20 อาการปลายใบไหม้ (tip dieback) ของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ ต.บ้านบึง อ.บ้านบึง จ. ชลบุรีสามารถพบได้เกือบทุกต้นภายในแปลงปลูก (ข.) ใบสับปะรดแสดงอาการใบแดง (reddening leaves) และอาการเหี่ยว (wilt) อย่างรุนแรงหลังจากถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 21 เพลี้ยแป้งสับปะรด (*dysmicoccus brevipes*.) ตรวจพบภายในแปลงปลูกสับปะรดที่มีการระบาดของโรคเหี่ยวมีสาเหตุจากเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* ซึ่งพื้นที่อาศัยของเพลี้ยแป้งจะอยู่บริเวณโคนกาบใบใต้ดินจนไปถึงบริเวณรากของต้นสับปะรด (ก. และ ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 22 ดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Duplex RT-PCR มีขนาด 909 และ 774 คู่เบสตามลำดับ (1) เมื่อเทียบกับ DNA ladder (M) และเปรียบเทียบขนาดดีเอ็นเอของไวรัสจากวิธีการทำ RT-PCR แบบปกติ (3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การสกัดอาร์เอนเอของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดและการตรวจสอบด้วยเทคนิค Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากเชื้อ *Pineapple Mealybug Wilt associated Virus* 1 และ *Pineapple Mealybug Wilt associated Virus* 2 ซึ่งเป็น Coat protein gene ของไวรัสโดยได้ข้อมูลของยีนมาจากที่มีรายงานแล้วใน Genbank ที่มี accession number JN995532 และ accession number JX645775 ตามลำดับ โดยลำดับเบสไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อ PWaV1 คือ PMWaV-1-CP-F 5′-CAC CAT GGC TGA TTC GAG CAA ACA AAA ACA AAC-3′ และ PMWaV-1-CP-R 5′-TTA TTT GCG TCC ACC CAT AAA GAT GTG CGG-3′, PMWaV-2-CP-F 5′-CAC CAT GGC TCA GAA TTA CGT ACG CGT AGT AGA-3′ และ PMWaV-2-CP-R 5′-CTA CCC TGA AAC AGC TCC CTG GTT CAG CTG GT-3′จากนั้นตรวจสอบโดยเทคนิค RT-PCR ได้ชิ้นดีเอ็นเอของ PWaV1 ขนาดประมาณ 774 คู่เบส และ PWaV2 ขนาดประมาณ 909 คู่เบส (ภาพที่ 23)

นำตัวอย่างสับปะรดที่แสดงอาการใบแดง ลำต้นเหี่ยว ใบมีอาการด่าง และอาการต้นแคระแกรนจำนวนทั้งสิ้น 595 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นลักษณะอาการหลักที่สำคัญของไวรัสโรคเหี่ยวในสับปะรดมาทำการสกัดอาร์เอ็นเอและนำอาร์เอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์ พบว่าทุกตัวอย่างสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน Coat protein ของไวรัส PWaV1 และ PWaV2 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 774 คู่เบส และ 909 คู่เบส ตามลำดับ และได้มีการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์โดยนำไพรเมอร์มาตรวจสอบกับไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอและ Citrus Tristeza Virus เปรียบเทียบกับตัวอย่างข้างต้น พบว่าไพรเมอร์ที่ใช้สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน coat protein ไวรัส PWaV1 และ PWaV2 ในสับปะรดเท่านั้นโดยตัวอย่างอื่นไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ผลการตรวจการระบาดของโรคเหี่ยวสับปะรดในแหล่งปลูกที่สำคัญในประเทศไทย

พื้นที่	พันธุ์	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนต้นที่เป็นโรค	RT-PCR					การเกิดโรค (%)
				V1	V2	V3	V4	V5	
UTT 1	HM	50	1	+	+	-	-	-	2.00%
UTT 2	HM	50	3	+	+	-	-	-	6.00%
LPG 1	PV	30	10	+	-	-	-	-	33.33%
LPG 2	PV	30	12	+	+	-	-	-	40.00%
CRI 1	NL	30	3	+	-	-	-	-	10.00%
CRI 2	NL	30	5	+	-	-	-	-	16.67%
PBI	PB	30	12	+	+	-	-	-	40.00%
PBI 1	PV	10	0	-	-	-	-	-	NS
PBI 2	PV	20	8	+	-	-	-	-	40.00%
PBI 3	PV	20	4	+	-	-	-	-	20.00%
PBI 4	PV	15	10	+	-	-	-	-	66.67%
PBI 5	PV	20	0	-	-	-	-	-	NS
PKN	PV	160	57	+	+	-	-	-	35.63%
CBI	PV	100	28	+	+	-	-	-	28.00%

หมายเหตุ พื้นที่แปลงปลูกสับปะรดในประเทศไทยที่ได้มีการเก็บตัวอย่างมาตรวจด้วยเทคนิค RT- PCR

UTT จังหวัดอุตรดิตถ์ PV สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย NS ไม่พบเชื้อไวรัส
LPG จังหวัดลำปาง HM สับปะรดพันธุ์ห้วยม้น
CRI จังหวัดเชียงราย PB สับปะรดพันธุ์เพชรบุรี
PBI จังหวัดเพชรบุรี
PKN จังหวัดประจวบคีรีขันธ์
CBI จังหวัดชลบุรี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การเชื่อมต่อยีน Coat Protein ของเชื้อไวรัส PWaV1 และ PWaV2 กับพลาสมิดพาหะ

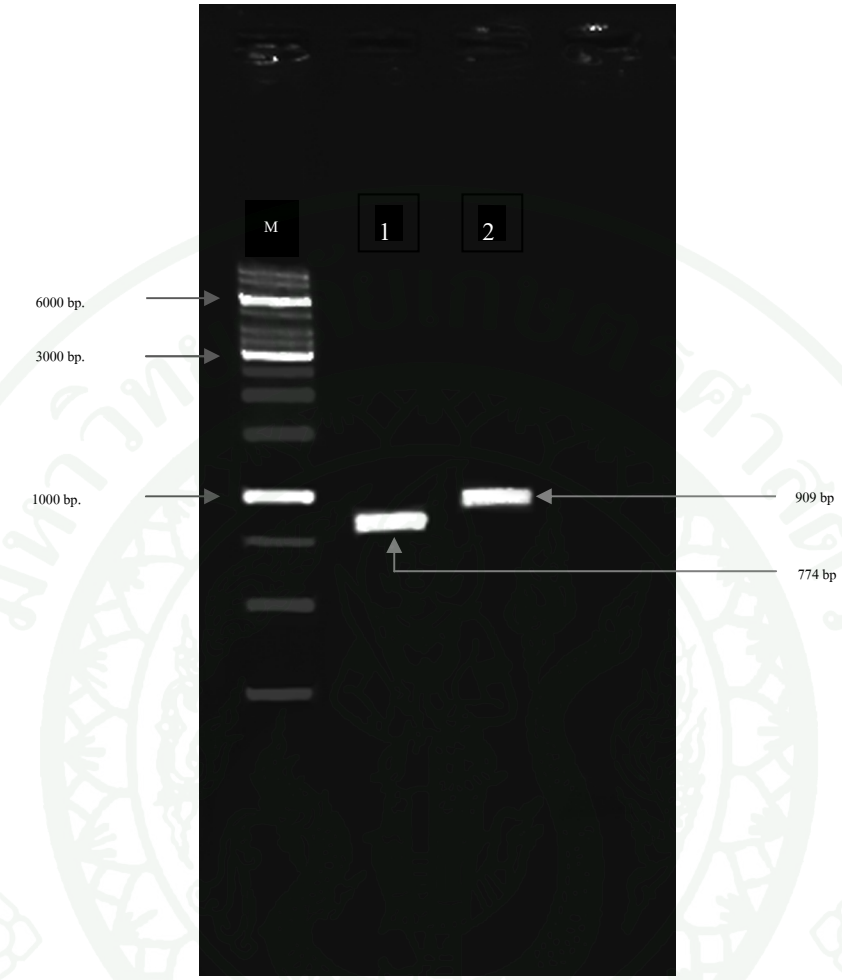
นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก RT-PCR เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pCR®8/GW/TOPO® ซึ่งเป็น TA cloning vector (Invitrogen™) การเชื่อมผลิตภัณฑ์ RT-PCR กับเวคเตอร์เกิดได้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้หลังจากการทำ RT-PCR จะมีปลายทางด้าน **3'** เป็นเบส Adenine ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase โดยจะเกิด nontemplate-dependent activity ทำให้มีการเติม deoxyadenosine (A) จำนวน 1 เบส เข้าบริเวณส่วนปลาย **3'** ของผลิตภัณฑ์ PCR ส่วนเวคเตอร์จะถูกออกแบบให้มีปลาย **3'** เป็น deoxythymidine (T) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ส่วนของยีน coat protein และ pCR®8/GW/TOPO® สามารถเชื่อกันได้โดยการจับกันของเบส Adenine และ Thymidine ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester bond)

นำพลาสมิด pCR®8/GW/TOPO® ที่ถูกแทรกด้วยยีน coat protein ของไวรัส PWaV1 (TOPO-PWaV1) และ พลาสมิด pCR®8/GW/TOPO® ที่ถูกแทรกด้วยยีน coat protein ของไวรัส PWaV2 (TOPO- PWaV2) เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี transformation คัดเลือก *E. coli* ที่มีพลาสมิดสายผสม (transformant) ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารปฏิชีวะนะ spectinomycin โดยโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด TOPO- PWaV1 และ TOPO- PWaV2 จะมีสีขาว ส่วนโคโลนีที่ไม่ได้รับพลาสมิดสายผสมก็จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ จากนั้นนำโคโลนีมาตรวจสอบยืนยันว่ามียีน coat protein ของ PWaV1 และ PWaV2 สอดแทรกอยู่จริงโดยนำโคลีนีมาตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PMWaV1-CPF และ PMWaV1-CPR ที่จำเพาะต่อ PWaV1 และไพรเมอร์ PMWaV2-CPF และ PMWaV2-CPR ที่จำเพาะต่อ PWaV2 ตามลำดับ และตรวจสอบโดย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด774 คู่เบส และ 909 คู่เบส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของยีน coat protein ของไวรัส PWaV1 และ PWaV2 ตามลำดับ นำโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสมยีน coat protein แทรกอยู่มาเลี้ยงบนอาหารเหลว 2XYT ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ข้ามคืน และสกัดพลาสมิดโดยวิธี alkaline lysis method (Birmboim and Doy, 1979) และจากการตรวจสอบใน 1% agarose gel electrophoresis พบว่าพลาสมิด TOPO- PWaV1 มีขนาดประมาณ 3,591 คู่เบส และ พลาสมิด TOPO- PWaV2 มีขนาดประมาณ 3,726 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นตัดพลาสมิด TOPO- PWaV1และ พลาสมิด TOPO- PWaV2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR*I และนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี autosequencing (ของบริษัทที่ส่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

sequence) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน coat protein ของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดของประเทศไทยพบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน coat protein ประมาณ 774 คู่เบส ของไวรัส PWaV1 และในไวรัส PWaV2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน coat protein ประมาณ 909 คู่เบส (ภาพที่ 23) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน coat protein ของโรคเหี่ยวสับปะรดที่มีรายงานแล้วใน Genbank โดยใช้โปรแกรม Blast และ Vector NTI 11(invitrogen) พบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน coat protein ของไวรัส PWaV1 เท่ากับร้อยละ 97 และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีความเหมือนเท่ากับร้อยละ 98 ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน coat protein ของไวรัส PWaV2 มีค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 98 และลำดับกรดอะมิโนมีค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 99 ตามลำดับ (ภาพที่ 24 และภาพที่ 25)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 23 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR จากสับปะรดที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน coat protein ของไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ได้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 774 คู่เบส ในช่องที่ 1 และ 909 คู่เบสในช่องที่ 2 เมื่อเทียบกับ 1Kb DNA ladder (M)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Virus strains	position	Nucleotide Sequence	position
PMWaV-1USA	(1)	ATGGCTGATTCGAGCAAACAAAAACAACCTGAACATGCTGACTCTGGGCC	(50)
PMWaV-1 TH	(1)	ATGGCTGATCCGAGCAAACAAAAACAACCTGAACATGCTGACTCTGGGCC	(50)
PMWaV-1USA	(51)	TAAGACAGTGGACGACCAAGTCAAGGAAATAATGAACCTGCCTGTGCCGG	(100)
PMWaV-1 TH	(51)	TAAGACAGCGGACGACCAAGTCAAGGAAATACTGAACCTGCCTGTGCCGG	(100)
PMWaV-1USA	(101)	GAGGTAGGACTACTGTGTCGACGTTTGAAGATTTGATAGCAGCTGAAAAT	(150)
PMWaV-1 TH	(101)	GAGGTAGGACTACTGTGTCGACGTTTGAAGATTTGATAGCAGCTGAAAAT	(150)
PMWaV-1USA	(151)	GCTATAATTGATTTCACCAAGGTTGATGTACCACGCATGATTAACGTTCC	(200)
PMWaV-1 TH	(151)	GCTATAATTGATTTCACCAAGGTTGATGTACCACGCATGATTAACGTTCA	(200)
PMWaV-1USA	(201)	GATCCCAGGAATAGTTACTAATGCACACAAGGTGATAGGATCCAAAGCTC	(250)
PMWaV-1 TH	(201)	GATCCCAGGAATAGTTACTAATGCACACAAGGTGATAGGATCCAAAGCTC	(250)
PMWaV-1USA	(251)	TGTGGGAGTTGGGTAAATCGAAGGGTATATCAGAATCGGCGAAACACATG	(300)
PMWaV-1 TH	(251)	TGTGGGAGTTGGGTAAATCGAAGGGTATATCAGAATCGGCGAAACACATG	(300)
PMWaV-1USA	(301)	ATCCAATTTCTGATGCAATCTTTCCAAGATATGTGCACCTTTTCTACATC	(350)
PMWaV-1 TH	(301)	ATCCAATTTTTGATGCAATCTTTCCAAGATATGTGCACCTTTTCTACATC	(350)
PMWaV-1USA	(351)	ACCGAAAGTTTCGGCGACTCAGAACTACTCCACCACAGCTAAGTATGATG	(400)
PMWaV-1 TH	(351)	ACCGAAAGTTTCGGCGACTCAGAACTACTCCACCACAGCTAAGTATGATG	(400)
PMWaV-1USA	(401)	GTAAAGATGTTAACGTCACGCACGAGGAGATCAGAATTGCTTTGAGCAAC	(450)
PMWaV-1 TH	(401)	GTAAAGATGTTAACGTCACGCACGAGGAGATCAGAATTGCTTTGAGCAAC	(450)
PMWaV-1USA	(451)	TCACTATCCAATTTGGGATACGATAATCCTATGAGACAGTTTGGGAGAGG	(500)
PMWaV-1 TH	(451)	TCACTATCCAATTTGGGATACGATAATCCTATGAGACAGTTTGGGAGAGG	(500)
PMWaV-1USA	(501)	TTTTACTTCCACAATTGTTCAAGGACTGAGTTCTGGGAAGTTGGTGGTTA	(550)
PMWaV-1 TH	(501)	TTTTACTTCCACAATTGTTCAAGGACTGAGTTCTGGGAAGTTGGTGGTCA	(550)
PMWaV-1USA	(551)	ACACTAGGATATGTACTAAGAACGGAGTACCGAGGAATTATTACTCGTTC	(600)
PMWaV-1 TH	(551)	ACACTAGGATATGTACTAAGAACGGAGTACCGAGGAATTATTACTCGTTC	(600)
PMWaV-1USA	(601)	TATCCAGATTGCTTACACGTGGAAGCCAGAGTACACGGTGATGATGCAGC	(650)
PMWaV-1 TH	(601)	TATCCAGATTGCTTACACGTGGAAGCCAGAGTACACGGTGATGATGCAGC	(650)
PMWaV-1USA	(651)	GTTGGTAAGTGAGTTAGCCAGAATGGTAGCCGTAAACAGAGCAAACTCGA	(700)
PMWaV-1 TH	(651)	GTTGGTAAGTGAGTTAGCCAGAATGGTAGCCATAAACAGAGCAAACTCGA	(700)
PMWaV-1USA	(701)	GTGGTTCTGGCGAACACAACGTCTTTGAGAAGACGGCTGTGTCCCCGCAC	(750)
PMWaV-1 TH	(701)	GTGGTTCTGGCGAACACAACGTCTTTGAGAAGACGGCTGTGTCCCCGCAC	(750)
PMWaV-1USA	(751)	ATCTTTATGGGTGGACGCAAATAA	(774)
PMWaV-1 TH	(751)	ATCTTTATGGGTGGACGCAAATAA	(774)

ภาพที่ 24 เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโทไทด์ของเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1 ในประเทศสหรัฐอเมริกาที่ได้มีการรายงานไว้ใน Genbank กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศไทย พบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับร้อยละ 97

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Virus strains	position	Nucleotide Sequence	position
PMWaV-2USA	(1)	ATGGCTCAGAATTACGTAGCCGTAGTAGAAGGCACTATTCTCGAAAGTTT	(50)
PMWaV-2 TH	(1)	ATGGCTCAGAATTACGTAGCCGTAGTAGAAGGCACTATTCTCGAAAGTTT	(50)
PMWaV-2USA	(51)	GACGGCTCCACCTAAACGATTTAGAGTGGCGACGTCTGATGTGGGGAAAT	(100)
PMWaV-2 TH	(51)	GACGGCTCCACCTAAACGATTTAGAGTGGCGACGTCTGATGTGGGAAAAT	(100)
PMWaV-2USA	(101)	ATTACGATAGTAGCAAATACCGCTCTGTAACGGGCGTAGCTACAGCCGAG	(150)
PMWaV-2 TH	(101)	ATTACGATAGTAGCAAATACCGCTCTGTAACGGGCGTAGCTACAGCCGAG	(150)
PMWaV-2USA	(151)	AGGGATCGGTTACCAGCGATAGAGGAAACTGAACTATTGGCAACAATCCC	(200)
PMWaV-2 TH	(151)	AGGGATCGGTTACCAGCGATAGAGGAAACTGAACTATTGGCAACAATCCC	(200)
PMWaV-2USA	(201)	AACGGAAGCTTCGACAGATAAGGGTGTTATTCCTGAGACTGTTACGAGGT	(250)
PMWaV-2 TH	(201)	AACGGAAGCTTCAACAGATAAGGGTGTTATTCCTGAGACTGTTAAGAAGT	(250)
PMWaV-2USA	(251)	CGAGTAATAAACCAGAAATAGTAGATGATGTATCAACGTTGCTGTTAAAT	(300)
PMWaV-2 TH	(251)	CGAGTAATAAACCAGAAATAGTAGATGATGTATCAACGTTGCTGTTAAAT	(300)
PMWaV-2USA	(301)	CCTAGAAAGAACGTTGTACTAAATATTGGATCGGTTAAAACCGTGCCAAA	(350)
PMWaV-2 TH	(301)	CCTAGAAAGAACGTTGTACTAAATATTGGATCGGTTAAAACCGTGCCAAA	(350)
PMWaV-2USA	(351)	GGTAGTTAATCAGCCGGGTTTGATATCCCGGGAGATTGCTATCCGTATAG	(400)
PMWaV-2 TH	(351)	GGTAGTTAATCAGCCGGGTTTGATATCCCGGGAGATTGCTATCCGTATAG	(400)
PMWaV-2USA	(401)	GGGAGGCTCTGAAGGAACATTGCAAACAAGTTATGGGTTCGGATAGTAGT	(450)
PMWaV-2 TH	(401)	GAGAGGCTCTGAAGGAACATTGCAAACAAGTTATGGGTTCGGATAGTAGT	(450)
PMWaV-2USA	(451)	ACTGACTTAGCTACATACTTTATACATTTGATTCAACTCGCTATTACGTT	(500)
PMWaV-2 TH	(451)	ACGGACTTAGCTACATACTTTATACATTTGATTCAACTCGCTATTACGTT	(500)
PMWaV-2USA	(501)	TTCTACATCCAAAAATAGCGAATACAAAGAGTTTGACTATATAGAAACAG	(550)
PMWaV-2 TH	(501)	TTCTACATCAAAAAATAGCGAATACAAAGAGTTTGACTATATAGAAACAG	(550)
PMWaV-2USA	(551)	AGACGCAAAAGAAAATATACATCAAGGACGTGAGTGAGGTGGTTGAGAGA	(600)
PMWaV-2 TH	(551)	AGACGCAAAAGAAAATATACATCAAGGACGTGAGTGAGGTGGTTGAGAGA	(600)
PMWaV-2USA	(601)	GCGGCGATGAATTCGGGGTACGAAAACCCGTTTAGGCAATATATGCGTTA	(650)
PMWaV-2 TH	(601)	GCGGCGATGAATTCGGGGAACGAAAACCCGTTTAGGCAATATATGCGTTA	(650)
PMWaV-2USA	(651)	TTTTACAAGCTCGAGTATAACACTAACTTTAAATGGTAAAATAACACCTA	(700)
PMWaV-2 TH	(651)	TTTTACAAGCTCGAGTATAACACTAACTTTAAATGGTAAAATAACACCTA	(700)
PMWaV-2USA	(701)	ACGAGAGAACTATGGCTCATCACGGAGTACCCAAGCAGTTCTTTGCGTAT	(750)
PMWaV-2 TH	(701)	ACGAGAGAACTATGGCTCATCACGGAGTGCCCAAGCAGTTCTTTGCATAT	(750)
PMWaV-2USA	(751)	ACTTACGATTTTATTGACCCCGACTATAGCCTCATGAACCATTCGGCGAT	(800)
PMWaV-2 TH	(751)	ACTTACGATTTTATTGACCCCGACTATAGCCTCATGAATCATTCGGCGAT	(800)
PMWaV-2USA	(801)	TAATGCTTACAACTTAGCGAGGATTCAAGCATTTAAGAATAAGATAGCTT	(850)
PMWaV-2 TH	(801)	TAATGCTTACAACTTAGCGAGGATTCAAGCATTTAAGAATAAGATAGCTT	(850)
PMWaV-2USA	(851)	CAGTGAACAATACTATGCATAACACATACCAGCTGAACCAGGGAGCTGTT	(900)
PMWaV-2 TH	(851)	CAGTGAACAATACTATGCATAACACATACCAGCTGAACCAGGGAGCTGTT	(900)
PMWaV-2USA	(901)	TCAGGGTAG	(909)
PMWaV-2 TH	(901)	TCAGGGTAG	(909)

ภาพที่ 25 เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโทไทด์ของเชื้อ*ไวรัส Pineapple mealybug wilt-associated virus* 2 ในประเทศสหรัฐอเมริกาที่ได้มีการรายงานไว้ใน Genbank กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศไทย พบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับร้อยละ 98

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. การตรวจสอบความสามารถการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านเพลี้ยแป้งสับปะรด

เก็บส่วนขยายพันธุ์ของสับปะรด (หน่อ) จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ที่ไม่แสดงลักษณะอาการของโรคเหี่ยวสับปะรด โดยคัดเลือกขนาดของหน่อที่มีขนาดและน้ำหนักใกล้เคียงกันนำมาปลูกในโรงเรือนทดลองของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร จำนวนทั้งหมด 12 ตัวอย่าง เตรียมต้นสับปะรดเพื่อปล่อยเพลี้ยแป้งลงไปและตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด โดยการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) จำนวน 3 ซ้ำ หลังจากปลูกสับปะรดในโรงเรือน เก็บตัวอย่างใบของสับปะรดมาตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ทุก ๆ 2 สัปดาห์เป็นเวลา 90 วัน เพื่อตรวจสอบว่าสับปะรดที่นำมาปลูกปลอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด จากนั้นจึงปล่อยเพลี้ยแป้งที่มีเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวลงไปเพื่อให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงบนต้นสับปะรดที่ปลอดโรคซึ่งในการทดลองนี้เป็นการทดลองเพื่อศึกษาการถ่ายทอดโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดผ่านทางแมลงพาหะ โดยในการทดลองทำการปล่อยแมลงจำนวน 1, 3, 5, และ 7 ตัว ตามลำดับ ลงไปในต้นสับปะรดที่ปลอดโรค หลังจากนั้นนำกระถางต้นสับปะรดที่มีเพลี้ยแป้งดูดกินน้ำเลี้ยงอยู่วางในกรงที่มีมุ้งครอบเพื่อป้องกันการเคลื่อนย้ายของแมลง และปล่อยให้แมลงถ่ายทอดไวรัสลงสู่ต้นสับปะรดเป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นกำจัดเพลี้ยแป้งด้วยสารเคมีไทอะมีโทแซม 25% (Thiamethoxam) และทำการเก็บใบสับปะรดที่ผ่านการถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยเพลี้ยแป้งมาตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าต้นสับปะรดที่มีการปล่อยแมลงจำนวน 5 และ 7 ตัว ให้ผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความเพาะต่อไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรด PMWaV1 และ PMWaV2 เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR หลังจากการปล่อยเพลี้ยแป้งดูดกินน้ำเลี้ยงไปแล้ว 120 วัน (ตารางที่ 4)

หลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัสลงในต้นสับปะรดโดยอาศัยแมลงเพลี้ยแป้งจำนวน 1, 3, 5 และ 7 ตัวตามลำดับ พบว่าสับปะรดต้นที่ให้ผลบวกเมื่อตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR คือต้นสับปะรดที่ปล่อยแมลงเพื่อถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่มีจำนวนแมลง 5 และ 7 ตัว แสดงอาการของโรคเหี่ยวให้เห็นอย่างชัดเจนหลังจากที่ปล่อยให้แมลงดูดกินน้ำเลี้ยงแล้วเป็นเวลา 5 เดือน ได้แก่อาการเหี่ยว ลำต้นแคระแกร็น อาการใบแดงและใบด่าง (ภาพที่ 26ก. และภาพที่ 26ข.) และ (ตารางที่ 5) เมื่อเวลาผ่านไปแล้วประมาณ 5 เดือน ส่วนต้นสับปะรดที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยแมลงจำนวน 1 และ 3 ตัว ไม่แสดงลักษณะอาการของโรคไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรด และไม่เกิดผลบวกเมื่อนำมาตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR (ภาพที่ 27ก. และภาพที่ 27ข.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย

ไพรเมอร์	Primer sequence (5′ to 3′ direction)	ความจำเพาะต่อไวรัส	ยีน
PMWaV1 CP-F	CAC CAT GGC TGA TTC GAG CAA ACA AAA ACA AAC	PMWaV1	Coat protein gene
PMWaV1 CP-R	TTA TTT GCG TCC ACC CAT AAA GAT GTG CGG	PMWaV1	Coat protein gene
PMWaV2 CP-F	CAC CAT GGC TCA GAA TTA CGT ACG CGT AGT AGA	PMWaV2	Coat protein gene
PMWaV2 CP-R	CTA CCC TGA AAC AGC TCC CTG GTT CAG CTG GT	PMWaV2	Coat protein gene
PMWaV3 CP-F	CAC CAT GAG TAC GAT TCC AGT ACC ACC TCC T	PMWaV3	Coat protein gene
PMWaV3 CP-R	TCA TCT GCG ATT ACC TGT AAA TAT TTG AGG AG	PMWaV3	Coat protein gene
PMWaV4 CP-F	ATG GAG GTG GGC TAC GAA TTC GGG ACG AC	PMWaV4	Heat shock 70
PMWaV4 CP-R	GAA GCT TTC AAA GCC ATG TCT CTT GTA AA	PMWaV4	Heat shock 70
PMWaV5 CP-F	ATA CTC GAC CTT GTG TTT CTC ACC CGG	PMWaV5	Heat shock 70
PMWaV5 CP-R	TAA ACC AGT AGA TAA TTC ATA TCA CTT TT	PMWaV5	Heat shock 70

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 การทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดด้วยแมลงเพลี้ยแป้งสับปะรด

ส่วนขยายพันธุ์	น้ำหนัก (กรัม.)	อายุ (เดือน)	จำนวนเพลี้ยแป้ง	ตรวจสอบเพลี้ยแป้งด้วย RT-PCR ก่อนปล่อยลงในกระถางสับปะรด	ตรวจสอบต้นสับปะรดด้วย RT-PCR หลังจากปล่อยแมลงให้ดูดกินน้ำเลี้ยง
หน่อ	450	6	1	+	-
หน่อ	520	6	1	+	-
หน่อ	580	6	1	+	-
หน่อ	610	6	3	+	-
หน่อ	610	6	3	+	-
หน่อ	540	6	3	+	-
หน่อ	440	6	5	+	+
หน่อ	540	6	5	+	+
หน่อ	530	6	5	+	-
หน่อ	500	6	7	+	+
หน่อ	420	6	7	+	+
หน่อ	550	6	7	+	+

หมายเหตุ : - ปลูกสับปะรด วันที่ 30 สิงหาคม 2553

- เชื้อไวรัสโรคเหี่ยวหลังจากปลูกในโรงเรือนเป็นเวลา 90 วัน วันที่ 30 พฤษจิกายน2553
- ปลูกเชื้อไวรัสผ่านทางเพลี้ยแป้ง วันที่ 2 ธันวาคม 2553
- ตรวจหาเชื้อไวรัสหลังจากปลูกเชื้อผ่านทางแมลง วันที่ 8 เมษายน 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 26 ต้นสับปะรดที่ปลูกเชื้อไวรัสจำนวน 1 ตัว (ก.) และ 3 ตัว (ข.) ไม่แสดงลักษณะอาการของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อไวรัสให้พบ จะมีเพียงอาการใบแดงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 27 ต้นสับปะรดที่แสดงลักษณะอาการของโรคเหี่ยวได้แก่ อาการใบแดง อาการใบด่าง ลำต้น แคระแกร็นและเหี่ยว หลังจากปลูกเชื้อไวรัสผ่านทางแมลงเพลี้ยแป้งจำนวน 5 ตัว (ก.) และ 7 ตัว (ข.) เป็นเวลา 5 เดือน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านด้วยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ทำการเก็บตัวอย่างหน่อและจุกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ณ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดชลบุรีที่มีอายุต้น 3 เดือนจากแปลงปลูกของเกษตรกร และนำตัวอย่างมาทดสอบเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดในห้องปฏิบัติการ จากนั้นนำตัวอย่างที่เกิดผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 มาทำการตรวจสอบการถ่ายทอดโรคของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดผ่านทางตาโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งนำตาสับปะรดที่ได้จากหน่อและจุก มาทำการฆ่าเชื้อ (sterilization) ก่อนที่จะนำมาวางบนอาหารแข็งสูตร MS โดยเปลี่ยนย้ายตาสับปะรดลงอาหารแข็งทุกๆ 1 เดือนเพื่อให้ตามีการสร้างแคลลัสและติดตามการถ่ายทอดโรค (ภาพที่ 14)

หลังจาก 3 เดือน ตาของสับปะรดมีการสร้างต้นใหม่ซึ่งเจริญมาจากตา แยกต้นสับปะรดเดี่ยวมาเลี้ยงบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติมฮอร์โมน 3NAA และ 3BAP (alpha-napthalene acetic acid และ benzylaminopurine) เพื่อชักนำให้แคลลัสมีการเพิ่มจำนวนในอาหารแข็งและพัฒนาเป็นต้นอ่อนให้ได้สับปะรดที่มีปริมาณมากขึ้น (ภาพที่ 28ก. และ ภาพที่ 28ข.) โดยใช้เวลาประมาณ 8-12 เดือน ต้นสับปะรดเจริญเติบโตบนอาหารแข็งได้ขนาดประมาณ 4 นิ้ว ซึ่งต้นสับปะรดที่เจริญอยู่ภายในขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวของสับปะรดให้เห็น (ภาพที่ 28ค. และภาพที่ 28ง.) ตัวอย่างทั้งหมดนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดได้แก่ PMWaV1 และ PMWaV2 จากการทดลองพบว่าจำนวนตัวอย่างสับปะรดทั้งหมด 140 ตัวอย่าง สามารถเกิดผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของสับปะรดจำนวน 68 ตัวอย่าง คิดเป็น 48% ของตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบทั้งหมด เชื้อไวรัสที่ตรวจพบนั้นมีทั้งสายพันธุ์ของไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1 และ *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 2 โดยมีบางตัวอย่างเท่านั้นที่พบ *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1 เพียงชนิดเดียว การตรวจสอบการถ่ายทอดโรคผ่านทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพบว่ามีอัตราการถ่ายทอดเชื้อไวรัสลดลงเมื่อทำการ subculture ในจำนวนครั้งที่มากขึ้น (ตารางที่ 6) ซึ่งอัตราการถ่ายทอดโรคเริ่มลดลงเมื่อต้นสับปะรดเจริญเติบโตผ่านการ subculture มาแล้วมากกว่า 1 ครั้งขึ้นไปและยังคงมีแนวโน้มการลดลงของอัตราการถ่ายทอดเชื้อไวรัสลดลงเรื่อย ๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

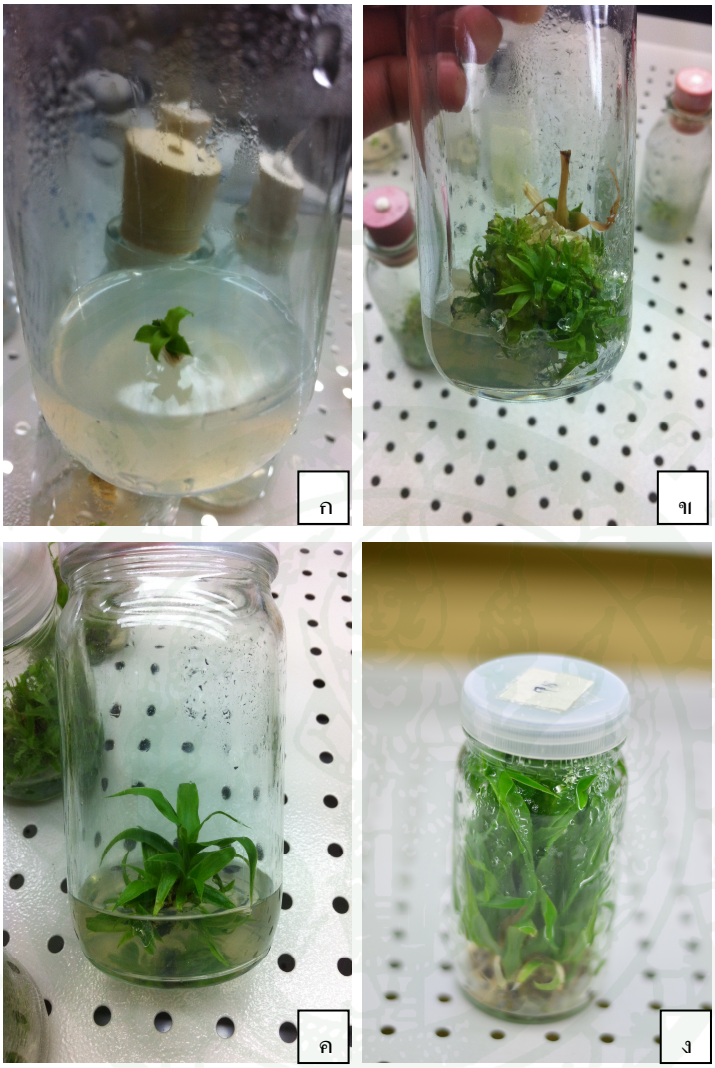
ตารางที่ 6 การตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดผ่านทางตาของ สับปะรดโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

พันธุ์	อายุ/เดือน	จำนวนต้นที่ตรวจสอบ	จำนวนต้นที่ติดเชื้อ	ชนิดไวรัส		การถ่ายทอดไวรัส (%)
				V1	V2	
PV-PK	8	15	4	+	-	26.67***
PV-PK	8	9	2	+	+	22.22***
PV-PK	8	7	5	+	+	71.43*
PV-PK	9	10	2	+	+	20.00***
PV-PK	9	5	3	+	+	60.00*
PV-PK	10	9	4	+	+	44.44**
PV-PK	10	16	4	+	+	25.00***
PV-CB	10	6	3	+	+	50.00**
PV-CB	11	10	6	+	-	60.00*
PV-CB	12	13	11	+	+	84.61*
PV-CB	12	11	9	+	-	81.81*
PV-CB	12	5	3	+	+	60.00**
PV-CB	12	12	9	+	+	75.00*
PV-CB	12	6	2	+	+	33.33**
PV-PK	12	6	1	+	+	16.67***
รวม		140	68	+	+	48.00

หมายเหตุ อักษรย่อของพื้นที่และพันธุ์สับปะรด

PV-PK	สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียตัวอย่างจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์
PV-CB	สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียตัวอย่างจากจังหวัดชลบุรี
V1	เชื้อไวรัส *Pineapple Mealybug wilt-associated virus* 1
V2	เชื้อไวรัส *Pineapple Mealybug wilt-associated virus* 2
*	Subculture ครั้งที่ 1
**	Subculture ครั้งที่ 2
***	Subculture ครั้งที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 28 ต้นสับปะรดขนาดประมาณ 1 เซนติเมตรที่เจริญมาจากตาเมื่อนำมาวางบนอาหารแข็งเพื่อชักนำให้เกิดต้น (ก.) บนอาหาร MS ที่ไม่มีการเติมฮอร์โมน จากนั้นนำไปวางบนอาหารที่มีการเติมฮอร์โมน 3BAP ต้นสับปะรดมีการแตกแคลลัสซึ่งถูกชักนำโดยฮอร์โมน (ข.) ทำการ subculture เพื่อแยกต้นสับปะรดและเลี้ยงต่อไปให้ได้ต้นสับปะรดมีขนาดที่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบหาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสต่อไป (ค. และ ง.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

9. การสังเคราะห์ Partial sequence ของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดสายพันธุ์ *Pineapple mealybug wilt-associated virus* 1

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดแยกได้จากเชื้อไวรัสรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์มาสังเคราะห์ cDNA ของยีนทั้งหมดของไวรัส PwaV1 คือ ORF1, helicase, RNA dependent RNA polymerase gene และ heat shock 70-like protein gene โดยใช้ไพรเมอร์ ทั้ง 8 คู่ (ตารางที่ 7) นำดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในแต่ละยีนมาทำการแยกสกัดให้บริสุทธิ์จากเจล โดยใช้ชุด EZNA Gel extraction kit D5200-01 (Omega) จากนั้นนำดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำแต่ละยีนมาจัดเรียงต่อเนื่องกันด้วยโปรแกรม Vector NTI 11 (invitrogen) โดยเริ่มการจัดเรียงลำดับเบสตั้งแต่ส่วนแรกที่เป็นยีน ORF1 ไปจนถึงนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน heat shock 70-like protein gene พบว่า partial sequence ของไวรัส PWaV1 ที่ได้มีขนาด 6993 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 29) ซึ่งตัวอย่างสับปะรดที่เก็บมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เป็นตัวอย่างที่มีการแสดงอาการของโรคคือ ใบแดง ใบด่าง ต้นแคระแกร็น และมีอาการเหี่ยว และลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้สามารถแปรรหัสในการสร้างโพลีเปปไทด์ได้ขนาด 2331 กรดอะมิโน (ภาพที่ 30) โดยเริ่มจากตำแหน่งที่ 1,081 ไปจนึงตำแหน่งที่ 6,584 ครอบคลุมยีน ORF1 และยีน helicase และจากตำแหน่งที่ 6,585 ไปจนถึงตำแหน่งที่ 7,960 ครอบคลุมยีน RdRp และยีน heat shock 70 บางส่วน

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส PWaV1ประกอบด้วยด้วย 7 ORFs รวมถึงตำแหน่ง untranslated region ที่บริเวณปลาย 3' ของไวรัส ซึ่ง partial sequence ของ ORF 1 ประกอบไปด้วยตำแหน่ง conserved ของยีน viral methyltransferase domain (MTR) viral helicase domain (HEL) และตำแหน่งของยีน RNA dependant RNA polymerase โดย MTR region ของไวรัส PWaV1 และไวรัส PWaV3 มีค่าความเหมือนประมาณร้อยละ 58 และมีค่าความเหมือนน้อยกว่าร้อยละ 44 กับไวรัส PWaV2 และลำดับนิวคลีโอไทด์ partial sequence นำไป Blast ในฐานข้อมูล NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 6993 นิวคลีโอไทด์มีค่าความเหมือนร้อยละ 94 กับ *Pineapple mealybug wilt associated virus* 1 genome ที่มีรายงานไว้ใน Genbank accession number AF414119 และลำดับนิวคลีโอไทด์ในลำดับที่ 5266-6993 มีค่าความเหมือนร้อยละ 93 กับยีน helicase, RNA dependant RNA polymerase genes, partial cds, unknown protein gene และ heat shock 70-like protein gene, partial cds และมีค่าความเหมือนร้อยละ 88 กับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยีน helicase ที่มีรายงานไว้ใน Genbank accession number EF463005 ซึ่งเป็นรายงานจากประเทศออสเตรเรีย

จากการทดลองพบว่า partial sequence ของ *Pineapple mealybug wilt associated virus* 1 ที่พบในประเทศไทยมีความเหมือนกับ *Pineapple mealybug wilt associated virus* 1 complete genome ที่รายงานโดยประเทศสหรัฐอเมริกาและเป็นรายงานครั้งแรกของประเทศไทยที่มีการทำ partial sequence ขนาด 6693 นิวคลีโอไทด์ของไวรัส PWaV1 ที่ระบาดในแปลงปลูกสับปะรดที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญในบริเวณภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งปลูกเพื่ออุตสาหกรรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส PMWaV1 แบบ partial genome

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส 5′-3′	คู่เบส	Anealling temperature	ตำแหน่ง
PMWaV-F1	GCCAGTCTTCTTCAAGTTATA	21	53	1081-1101
PMWaV-R1	CCTGTAAGCACGAGCACACAT	21		2160-2180
PMWaV-F2	CGGCGGAACAACTAGATCTGC	21	60	2044-2065
PMWaV-R2	GCGGCGTAAGACAAGCTTC	19		2911-2930
PMWaV-F3	AGTCAACAGAGACTTCGTTCG	21	50	2888-2908
PMWaV-R3	ATGTCTGGTCCAGTCTCTCC	20		3758-3777
PMWaV-F4	CCTGCTACTAGCATTGTCGAAG	22	51	3690-3710
PMWaV-R4	TCTCGTCTCTCTGCAGGCTC	20		4562-4582
PMWaV-F5	GAGAGACGAGACACGCCTAGA	21	51	4572-4592
PMWaV-R5	CCGTCCGGTTTGTACTTTACTC	22		5401-5423
PMWaV-F6	CGGACGGGTTCCATTATTAC	20	51	5417-5436
PMWaV-R6	GACCCTGTCCACTTGTGAGAA	21		6229-6249
PMWaV-F7	GACAGGGTCATGACCTTTACTCAG	24	53	6240-6264
PMWaV-R7	CCCATTGGAGTTCTGCTCAAC	21		7059-7080
PMWaV-F8	GCAGAACTCCAATGGGAAAG	20	51	7064-7084
PMWaV-R8	TGTTCGCGTCCGAAGTGTA	19		7942-7960

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
GCCAGTCTTC TTCAAGTTAT ATTTTTAGAT CGGTGGTTGA GACTATTTTT ACACCCAAAG 60
GCGAAGAAGA GTGTGTCTCA TGAAAGATGA GCACATCGTA CTGAACAGGG AGCACGGCGA 120
ACTAATCGTC GAGTTATCGG AGCTAAGTTT AGCTAAAGAG ATACAGCTAG TGAATCACTT 180
AGACTCTGAG GGCAAGTGGG CTTCCAAATA CATAGCTGAA TTCGTCAGGG ATAGGCTGAG 240
GAAAGACAGA TTGAAAGCTC TAAGAGGCAA TGTGCTTATA GGTAATAGAG CCTTAGCACA 300
TTTCTTTTCC CCAGCAGGCG TGTATCTTGG GAAGGTAGCG CTACAGGAGA AAGTGTGGTT 360
CTACTTTAGA ACTGCCGGTA GGAGTCACGG AGAGTATATT TCTTGTGGAG ATGGGAAAGT 420
GAGCCGACTT TTCATTAAGA CACGTTTCCC TACTCTTCAA GAAGTGGTGG CTCATGATTG 480
GGCAAAAGGC TACAGTTCGT TAGAACACAT GACGCTTTAT GATCCGGTAT TCAACCGCAA 540
TGTTCATGCA AAGAAGGGGT ATTGTTGGTT ACCTCTTTTC TTAAAATCTA AAATACCTCT 600
ATCAAAATAC CCGCAGTGTC CTTATGTGAG ATTGAACCAT CTGAGGAGGC TGTTTGGTGA 660
GGTAAATTTA GTTAAGGCGG GGGAATACTA TCATTATTCG GAGTCAGGAA TTAAGAATCC 720
AAAGCTTCCA AATGTTCTGG TCGGCGCAAA TCCAGAAGGG CGGAATACTG AAATAATTTC 780
TATGTCGGCA GTAAATGGAA ACCCTCTCCT AAGCGTTGCG CTAGACAGCG TGGTGAAGAA 840
GTTGACTATG AGGGAGAGCT CACATTTCCA AAACACAGTC GACGATATTT TAGAAGTAGC 900
TTTGAAATCT GATCTGCGGG AGAGGGTGGA TAAGAGATTC AAAGTTGACT GTTCGATGAC 960
GGCGGAACAA CTAGATCTGC TCCGGAAGAT GTTGAAGATT AATAATATAG AAGCCGGTTA 1020
TGTGGAGTCC TGAGAGCACA TCCCCATATT CAACGCTATG AGGAAGTTCT TCAACGAGAT 1080
GTGTGCTCGT GCTTACAGGG AGAGTCCTAG TCTCAGATAT TGGGGGCAGT ATCTTGAACT 1140
GTGTGGTCAA TAAGCTGACG AATACTCATG TTTGTGCTCC TAATTTGGAT TTAAAAAACG 1200
CGGGAAGGCA TGAGCAAAGC TTGTATAAGT TTGCTCAATA AAGTAGGAGA CTTCAAAGAA 1260
TTCGATGAAA ATTATCTCAA ATTCATGACT ACTATATCTA ACTTATCGGT GTGCAATGCG 1320
AGTGTTCCTA ACTGCAAACA TAGGAGCTCT GTAATCACGA TGGTTGATGT TTATGACATA 1380
CATGTGGAAC AATTATTGCA AGCTATGGAG GTTAAAGGTG CAGTCTTGGC CAGATTGTTC 1440
TTTATGTTTC CCCCTGAAAT TCTAGCAGGT GCAGAGTCGG TGCAGTATCC TGAAACATTC 1500
TCTCACTGTC AGCATATAAG AAGGGAGTAG ACTTGGTATA TTTTATAGGA GAAACAGGTG 1560
ACTCTTACGT TCACTCCCTG CGACACCTTG CTCTCCTATA TCACTCGAAG CGTAGTAGTG 1620
AGTCAAAACA GGAAGGGACA GCTGACTACA TTGAACCTCA GATCCGAGCA GGGTTTGGAC 1680
CCTATTTGGA TATGTACCGC TATCTTTAGA CCCGCAAGGA GAGGAAGCTC CTACAAGACA 1740
AGCTTACCCT ATCCCTGAAG GTTGCAAGTG CCTAATGGAC GAGCGGGAAT GCACTCGTAT 1800
CACAATACCG AGAATGAATG AATCATGGAG TGGTGGACAA GTTTTCAATA TTAGTCAACA 1860
GAGACTTCGT TCGTAGAAGC TTGTCTTACG CCGCTAACGT CTGCAACACT ACCGACGATC 1920
GTACTTTCGA GTACGTTATG TCGAATCTCA GGTCGCAGAC GACTATGATG GTAGTTGGTT 1980
CAAAAATAGT ACACACAAAG GTGGATTTAT CTAATGACGT GATCGTTGAG CTACCTACTG 2040
TCATTCTGAA TGAAGCCGTT TCAAGACGGA ATCGTGCCGT CAAAATGTTG AAACAGGCCA 2100
ACAGGGGTTT CCTATATAAG ATATTCTCCA CCCTTTATAA AGGATTAACT GCCTCTGTGT 2160
GTTGGATATT AAAGAAAATA TTCAATTGCC TCCCAAAGTG CGTTGTGGAC GCTTGTGAGG 2220
ATTTGTTTAA GACTCATTAT GGATTGAAAG ATACAGACGA TGAAATTGTG ATCAGTTCTT 2280
CCGTGGAGTC TGGACCATTA GACTGCGAAA ATGAATATAT TGAAGAATTA TTGACGATTT 2340
CGCAAGCGTT GGCCGGACTC AATTGCAAAG CTGGACCGAT GAAGCTTGAG GAGGAAATTA 2400
GCGAAATTGA AGAAGAGCTT GAAGATGACT CGTTTGAAAA CCTCAAAAAT CCGATAAACG 2460
AATCAAAGAA TGAACGGTCC GGAGGTTTAA AAGGTGGCGG CGCAACCAAT TGGTATGATT 2520
TCCTACTGCC GAACAGGCCG GAAGCCAAAC CTGCAGACTC TGCTAGAGCT GCGCTGTGGC 2580
GTTTATGCAG GCGTTTGACA AGAATGGTGT GCAATCTAGA CATAGTGACT CCCATCAGAA 2640
GATTGCTAAC GACCCTGCTA CTAGCATTGT CGAAGTTAAT AATTCGGGAA TGGAAGATAC 2700
GAAAATATTA AAGAGGAAAG ATGAGGAGAG ACTGGACCAG ACATTGAAAA CTATAGTAGG 2760
GGAAATTTTG AAGAGAGGTT TTAGTGAAAG TGGGTGATCT ATTAAAGGGA TTCTCTCATG 2820
TTGCATGTAA ACCACTAGTA TATGTTGGAC AGGCATCCAC TACTCTGTTC ACCAACGCAT 2880
GCAGTGCTTT GAAGGAAGAT GCTGCTGATC GTATCAGACA GCTAAAACAC AGGATAGCAA 2940
AAGCGTTGAA AGCAGCAGAT ATGGCTTACC CGAAAGACTG GATAATTGAG GGGAAATATC 3000
TCAGGTTTTT CAATAAGTAT ATCAGGAGAT TTATCCCACA CGCTGCATTT GCTTCCGTGG 3060
TTGTATCTGC CATAGTAATA AGTAAAGCCA ACAAAGTGTT TTGTAAAACT TTAAACACCA 3120
```

ภาพที่ 29 ลำดับนิวคลีโอไทด์ partial sequence ของ *Pineapple mealybug wilt associated virus* 1 ของประเทศไทยซึ่งเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการใบแดง ใบด่าง ลำต้นแคระแกรนและอาการเหี่ยว จากแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
TGTTTGATAA GCTTAAAAGT AAGTTGGAAA ATTTAAAACT TGTGTCGACA AGTACTCTCT 3180
GTGCGATAAT GTTTGGGATG TGCTTTTGCA AATTCGTCAA TTTAATATCT GTTGTTAGTG 3240
CTGTCGCAAA TCCACTTACA TTGGCTTTAC CAGTTTATGT GGGGGCTGAA TTTTCCAGCG 3300
TAGTACATGA CGGTTTGGGC GGAAGAAACA TATTTAATTT CAATCGGTTT ATGAGAATTT 3360
TAATCAACTT AAGCGCGCTT AAGACCCTCA AACCACCAAT CAAATACGTG CCTACGTCNG 3420
ATTCTGATAG AAGCGGTAGA GACGGTACTC GATGTCGTTC CTGACCTGAA TCGCTTCGAT 3480
AGGAGGAATG TTATGTCTAG GGCTCTGGAC ACTGTCCGAA TGGGGGCGGT GAGCCTGCAG 3540
AGAGACGAGA CACGCCTAGA AAAGGGGGCA TTAACCCACA ATGCGCACGA GCACCCACAT 3600
GCAGGCGAAT CTTATAGATC TCACTAAAGC TGCAAGACAG CGATGGCGAG CGTTTGAGGA 3660
AAGGTAAAGC TGTCGTCTCT GATGTTCATG AYGCGGTTGC GAACGAATCT CTCGMGGTGA 3720
TGCSAGAATC TGGCGAGATT ATGCCTGGTG TAGGACAAGA AATTGGATCA TCTAGCGGAG 3780
CTTCRAGATG TAKGTTCGAA GGGGTTTTTA AACCCGCTAT TCCCGTTGTC TTCGGTGAGA 3840
AAGATAAAAG ACCCTTTGAA GAGTCGTCTA GAGAGAGTGA TTCCACAATA ATGCCCGAAA 3900
GAAATTTAGT TGTGGAACAT ACGCAAACGT TAATTTTAGG CGACGATGTG AGGTCAGAAG 3960
GGGAAAGCGT AGAGAATAAC CAAACCGTCA ACACGGAAGT AAACGTCTCA AGATGCGTTA 4020
ATAAGGTATC ATCTCCGCTG AAGATAGTAG ACCGACCGGA GCAAGGGGTT GTCCAGCAAG 4080
TGTGTAAGGT GCAGCCGGTG AACCGATTTC AAGTTGTCAA GACTATCCTA GCCAATACTC 4140
TTGGATTCTC ATTTACTGGA ATGAACAGTT TCCTAGACAT AGAAAGTTAT AGGACACTGG 4200
TTAGGAGAGT AAGTGGATCT GATGGGTATT CAGCTGTATT GGAAGCTTTA TGTCATTCGT 4260
TGCACGGGTT GAGGGCTGAG GTTGACGTTT TGGACAAAGT TGTTAAACAG CAGATACCGT 4320
TAATCGGTCA CAAACACGAA TTGTTTTGCA GGATCATGAA AAGGCGCCGG ATAGAGTAAA 4380
GTACAAACCG GACGGGTTCC ATTATTACAA CGTAGAGCTC AGCAACATTT ACGGTTTAGT 4440
GAACACCCGC AAGTCGCGAT ACAACAACGA ACCCTGCGGT TCAAGAAACC GGAGGGGATC 4500
GTTTTCTTCG AACCACATCG AAAACCTCGT TTAATTTAAT TCCGATCGTT AGCGTTAATA 4560
GACCTTTCCG GCGAAAGTTA GCGTCGAGGA AGTTAACAAG AGCGATTCGA CAATCGTCGA 4620
AATTTCGTGA ACGCTGTTCC CGGGGCAGGG AAAAACCTAC CAGATCAAAC AGAGAATGTT 4680
ACGCTCGGGT CGATTCGGAA AAGGATCGGT AGCGCGTTGT TAGTGTTGAC TTCGAGTAGA 4740
AACTCAGCTG ATACGCTAAA AGCTTTTCGC GCAGGAGAAG AGGTTCGGGC AAGATGATTT 4800
CAGATTTTAA CGGTCGATGC ATTTTTTGTT CCAAGCGAGA GGAAGGAAAT GTAAGAACTT 4860
TATATAAAAC GTTTGTTTGA TAGACGAATG CTACATGACA CACGCGGGCA TATTTGCGAG 4920
GTATAATCGC CGCTGTGAAA GCCGGAAGAG TGTGTACTTT ACGGTGATAG GCGACAAGTG 4980
CCCTTTATCA ACAGAAATCG AAATTGCTGA AATGACGAAC GAAATCCTTT TTGAAAACCG 5040
AAGTTTTCGG CGAATTATTC GAGAGAATGT TGATGAACCC AGGGCGAGTG TTCCACGCCA 5100
GAACGWTCTG GTTGAGTGGA ATGTTCCCGA ATGTTGAACG GAATGGGAAG AAAGGAGATM 5160
GTTWGKACTC AGRAYCGGTA AAWTTGTTKA CTTCAGTCTG GACCCGGGTG AGGAATTGTA 5220
ACATGTACAC GAGTTCAGTG AAGTGATCAC AATCTATTCT CACAAGTGGA CAGGGTCATG 5280
ACCTTTACTC AGAACGAGAA GAATGAACTC ATCTCAGAGT TCATGAGCAG GGGAATAGGT 5340
ACAATTGAGG ACGCAAGAAC CCTGATCGGT ACGGTTGCTG AATCTCAAGG TGAAACTTAC 5400
GGGAGGGTTC ATTTAGTTGC ATTTAAACCG ACGGATGACC AAGTGTTTTT CTTCCATGCC 5460
GCATAAATTG GTAGCTTTGT CGAGACACAC CATCAGCTTT GCAGTACTTT TGCATACCTA 5520
ATAAAATGAA CAAGGGTATA GGTGAAGACG TGCAGTCAAT AATCAAGCGG GAGGATAGAG 5580
TCGCTGCAAA TTTTGTAGTT CAGCAGGGCG TTTAACATTT ATCTTCCGGG TAAGGATGTG 5640
GTCATCCCAA TGCCGTTGGG TATGGGAAGA CCTCCAAAGG CTCACTTCGA AGCTATCCAA 5700
AGTTTTCTCG ACGACACACT GAACGGAGTT GGGTCTTTGT TGTTCCTTAA CACGGAAGAA 5760
CAGTTTCAAA TGACTGACAC CATCACCAAC ATCTCTGATT TTTCCATGAG CGATAACGAT 5820
ATTCGCTTTA AACCGATCAA GTTTTTCTCC AATCAGCCAA GAATCAGATC ACAGATGGTA 5880
GTACGTAGAC AAAACACTCT AAAAGCAAAT ATTTTGGCCT ATGAAAAGAG GAATGCGGGA 5940
GTGGTTAAAT CTTTGTGGCA TCCAGATGTG ACTGATGAAG TAATGGCTGT GGTGGACGAC 6000
TTCTTTGGTT CGTACGTAGA TTCCCGGAAA TTGAGTGAAG TGTTGGTGGA TCCTGTAGAA 6060
```

ภาพที่ 29 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
CCAAATATAT TTGATTTAGC CGATTGGTTG TTGAGCAGAA CTCCAATGGG AAAGAAAGCC 6120
CTAAAAATGG AAATGGGAAT CCTGTTGGAA CTAGGTACAA ATTTGAATAG GTTTAAGCTG 6180
ATGGTAAAAG CGGATGTAAA ATTTAAAACA GATTTGGAGT GTCTGTCGGA AGTACCACCT 6240
GGGCAGAATA TAGTTTTCCA TGACAGAGCG ATATGCGCAC ACTTCTCCGT GTGTTTTAGG 6300
GAAATGGTCA ATAGATTGCG CRCAGTCGTA CACAAAAATA TTGTACTTTT CAACGGATTA 6360
AGTTTTGAAG AATTTGCTGA TCAGTTGAGC GCGGCGCTTA ACGATGAGTC AATTGATACG 6420
TTCAATTGTG ACGAGGTAGA CATATCTAAA TACGACAAAT CCCAATCCAC GTTCACAAAA 6480
GCCGTAGAAT TGGAAATCTA CAGGAGGTTA GGTTTACCAG AAAAGATTCT TCAAGTCTGG 6540
GCAGCCAGCG AGTTCTTTGG CAAAGCTGTT ACTAATAAGA GGTCATTTTC TGCGGAGGTG 6600
TATGCCCAAC GTCGCACAGG TGCTGCGAAT ACGTGGATAG GAAACACTGT AATCAACATG 6660
ATGTTGCTTT CACAGAGTGT AGACGTGACA TCATTGAACG CAGTCTGTTT TGCCGGTGAT 6720
GACTCACTGA TTCTCAAGAA AGGTGTTCCT GGCGTTAATT TYGATGTCTA CGATTTGAAG 6780
TATGAGTTCG ATGTCAAATA CTTTGATTGT GCCTCCAAAT ATTTTTGTGG TAAGTTTTTA 6840
ATTGAAAACT CGGGAAAGAT TAAAGTGATG CCTGATCCTT TTAAAATTTT TGTGAAGTTC 6900
GGTAAAGAAC GACCGGAAAC AGATAAGATT TTGTTGGAGT CAGTGGCAGT CCTTTTCTGA 6960
TTCGGGCCGA AGCTTACACT TCGGACGCGA ACA                              6993
```

ภาพที่ 29 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: gccagtcttcttcaagttatatttttagatcggtggttgagactatttttacacccaaag
+1fr: ·A··S··L··L··Q··V··I··F··L··D··R··W··L··R··L··F··L··H··P··K·
+2fr: ·P··V··F··F··K··L··Y··F··*··I··G··G··*··D··Y··F··Y··T··Q··R·
+3fr: ·Q··S··S··S··S··Y··I··F··R··S··V··V··E··T··I··F··T··P··K··G·


DNA: gcgaagaagagtgtgtctcatgaaagatgagcacatcgtactgaacagggagcacggcga
+1fr: ·A··K··K··S··V··S··H··E··R··*··A··H··R··T··E··Q··G··A··R··R·
+2fr: ·R··R··R··V··C··L··M··K··D··E··H··I··V··L··N··R··E··H··G··E·
+3fr: ·E··E··E··C··V··S··*··K··M··S··T··S··Y··*··T··G··S··T··A··N·


DNA: actaatcgtcgagttatcggagctaagtttagctaaagagatacagctagtgaatcactt
+1fr: ·T··N··R··R··V··I··G··A··K··F··S··*··R··D··T··A··S··E··S··L·
+2fr: ·L··I··V··E··L··S··E··L··S··L··A··K··E··I··Q··L··V··N··H··L·
+3fr: ·*··S··S··S··Y··R··S··*··V··*··L··K··R··Y··S··*··*··I··T··*·


DNA: agactctgagggcaagtgggcttccaaatacatagctgaattcgtcagggataggctgag
+1fr: ·R··L··*··G··Q··V··G··F··Q··I··H··S··*··I··R··Q··G··*··A··E·
+2fr: ·D··S··E··G··K··W··A··S··K··Y··I··A··E··F··V··R··D··R··L··R·
+3fr: ·T··L··R··A··S··G··L··P··N··T··*··L··N··S··S··G··I··G··*··G·


DNA: gaaagacagattgaaagctctaagaggcaatgtgcttataggtaatagagccttagcaca
+1fr: ·E··R··Q··I··E··S··S··K··R··Q··C··A··Y··R··*··*··S··L··S··T·
+2fr: ·K··D··R··L··K··A··L··R··G··N··V··L··I··G··N··R··A··L··A··H·
+3fr: ·K··T··D··*··K··L··*··E··A··M··C··L··*··V··I··E··P··*··H··I·


DNA: tttcttttccccagcaggcgtgtatcttgggaaggtagcgctacaggagaaagtgtggtt
+1fr: ·F··L··F··P··S··R··R··V··S··W··E··G··S··A··T··G··E··S··V··V·
+2fr: ·F··F··S··P··A··G··V··Y··L··G··K··V··A··L··Q··E··K··V··W··F·
+3fr: ·S··F··P··Q··Q··A··C··I··L··G··R··*··R··Y··R··R··K··C··G··S·


DNA: ctactttagaactgccggtaggagtcacggagagtatatttcttgtggagatgggaaagt
+1fr: ·L··L··*··N··C··R··*··E··S··R··R··V··Y··F··L··W··R··W··E··S·
+2fr: ·Y··F··R··T··A··G··R··S··H··G··E··Y··I··S··C··G··D··G··K··V·
+3fr: ·T··L··E··L··P··V··G··V··T··E··S··I··F··L··V··E··M··G··K··*·


DNA: gagccgacttttcattaagacacgtttccctactcttcaagaagtggtggctcatgattg
+1fr: ·E··P··T··F··H··*··D··T··F··P··Y··S··S··R··S··G··G··S··*··L·
+2fr: ·S··R··L··F··I··K··T··R··F··P··T··L··Q··E··V··V··A··H··D··W·
+3fr: ·A··D··F··S··L··R··H··V··S··L··L··F··K··K··W··W··L··M··I··G·
```

ภาพที่ 30 ลำดับกรดอะมิโน partial sequence ของ *Pineapple mealybug wilt associated virus* 1 ของประเทศไทยซึ่งเก็บตัวอย่างที่แสดงอาการใบแดง ใบด่าง ลำต้นแคระแกรนและอาการเหี่ยว จากแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: ggcaaaaggctacagttcgttagaacacatgacgctttatgatccggtattcaaccgcaa
+1fr: ·G··K··R··L··Q··F··V··R··T··H··D··A··L··*··S··G··I··Q··P··Q·
+2fr: ·A··K··G··Y··S··S··L··E··H··M··T··L··Y··D··P··V··F··N··R··N·
+3fr: ·Q··K··A··T··V··R··*··N··T··*··R··F··M··I··R··Y··S··T··A··M·


DNA: tgttcatgcaaagaaggggtattgttggttacctcttttcttaaaatctaaaatacctct
+1fr: ·C··S··C··K··E··G··V··L··L··V··T··S··F··L··K··I··*··N··T··S·
+2fr: ·V··H··A··K··K··G··Y··C··W··L··P··L··F··L··K··S··K··I··P··L·
+3fr: ·F··M··Q··R··R··G··I··V··G··Y··L··F··S··*··N··L··K··Y··L··Y·


DNA: atcaaaatacccgcagtgtccttatgtgagattgaaccatctgaggaggctgtttggtga
+1fr: ·I··K··I··P··A··V··S··L··C··E··I··E··P··S··E··E··A··V··W··*·
+2fr: ·S··K··Y··P··Q··C··P··Y··V··R··L··N··H··L··R··R··L··F··G··E·
+3fr: ·Q··N··T··R··S··V··L··M··*··D··*··T··I··*··G··G··C··L··V··R·


DNA: ggtaaatttagttaaggcgggggaatactatcattattcggagtcaggaattaagaatcc
+1fr: ·G··K··F··S··*··G··G··G··I··L··S··L··F··G··V··R··N··*··E··S·
+2fr: ·V··N··L··V··K··A··G··E··Y··Y··H··Y··S··E··S··G··I··K··N··P·
+3fr: ·*··I··*··L··R··R··G··N··T··I··I··I··R··S··Q··E··L··R··I··Q·


DNA: aaagcttccaaatgttctggtcggcgcaaatccagaagggcggaatactgaaataatttc
+1fr: ·K··A··S··K··C··S··G··R··R··K··S··R··R··A··E··Y··*··N··N··F·
+2fr: ·K··L··P··N··V··L··V··G··A··N··P··E··G··R··N··T··E··I··I··S·
+3fr: ·S··F··Q··M··F··W··S··A··Q··I··Q··K··G··G··I··L··K··*··F··L·


DNA: tatgtcggcagtaaatggaaaccctctcctaagcgttgcgctagacagcgtggtgaagaa
+1fr: ·Y··V··G··S··K··W··K··P··S··P··K··R··C··A··R··Q··R··G··E··E·
+2fr: ·M··S··A··V··N··G··N··P··L··L··S··V··A··L··D··S··V··V··K··K·
+3fr: ·C··R··Q··*··M··E··T··L··S··*··A··L··R··*··T··A··W··*··R··S·


DNA: gttgactatgagggagagctcacatttccaaaacacagtcgacgatattttagaagtagc
+1fr: ·V··D··Y··E··G··E··L··T··F··P··K··H··S··R··R··Y··F··R··S··S·
+2fr: ·L··T··M··R··E··S··S··H··F··Q··N··T··V··D··D··I··L··E··V··A·
+3fr: ·*··L··*··G··R··A··H··I··S··K··T··Q··S··T··I··F··*··K··*··L·


DNA: tttgaaatctgatctgcgggagagggtggataagagattcaaagttgactgttcgatgac
+1fr: ·F··E··I··*··S··A··G··E··G··G··*··E··I··Q··S··*··L··F··D··D·
+2fr: ·L··K··S··D··L··R··E··R··V··D··K··R··F··K··V··D··C··S··M··T·
+3fr: ·*··N··L··I··C··G··R··G··W··I··R··D··S··K··L··T··V··R··*··R·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: ggcggaacaactagatctgctccggaagatgttgaagattaataatatagaagccggtta
+1fr: ·G··G··T··T··R··S··A··P··E··D··V··E··D··*··*··Y··R··S··R··L·
+2fr: ·A··E··Q··L··D··L··L··R··K··M··L··K··I··N··N··I··E··A··G··Y·
+3fr: ·R··N··N··*··I··C··S··G··R··C··*··R··L··I··I··*··K··P··V··M·


DNA: tgtggagtcctgagagcacatccccatattcaacgctatgaggaagttcttcaacgagat
+1fr: ·C··G··V··L··R··A··H··P··H··I··Q··R··Y··E··E··V··L··Q··R··D·
+2fr: ·V··E··S··*··E··H··I··P··I··F··N··A··M··R··K··F··F··N··E··M·
+3fr: ·W··S··P··E··S··T··S··P··Y··S··T··L··*··G··S··S··S··T··R··C·


DNA: gtgtgctcgtgcttacagggagagtcctagtctcagatattgggggcagtatcttgaact
+1fr: ·V··C··S··C··L··Q··G··E··S··*··S··Q··I··L··G··A··V··S··*··T·
+2fr: ·C··A··R··A··Y··R··E··S··P··S··L··R··Y··W··G··Q··Y··L··E··L·
+3fr: ·V··L··V··L··T··G··R··V··L··V··S··D··I··G··G··S··I··L··N··C·


DNA: gtgtggtcaataagctgacgaatactcatgtttgtgctcctaatttggatttaaaaaacg
+1fr: ·V··W··S··I··S··*··R··I··L··M··F··V··L··L··I··W··I··*··K··T·
+2fr: ·C··G··Q··*··A··D··E··Y··S··C··L··C··S··*··F··G··F··K··K··R·
+3fr: ·V··V··N··K··L··T··N··T··H··V··C··A··P··N··L··D··L··K··N··A·


DNA: cgggaaggcatgagcaaagcttgtataagtttgctcaataaagtaggagacttcaaagaa
+1fr: ·R··E··G··M··S··K··A··C··I··S··L··L··N··K··V··G··D··F··K··E·
+2fr: ·G··K··A··*··A··K··L··V··*··V··C··S··I··K··*··E··T··S··K··N·
+3fr: ·G··R··H··E··Q··S··L··Y··K··F··A··Q··*··S··R··R··L··Q··R··I·


DNA: ttcgatgaaaattatctcaaattcatgactactatatctaacttatcggtgtgcaatgcg
+1fr: ·F··D··E··N··Y··L··K··F··M··T··T··I··S··N··L··S··V··C··N··A·
+2fr: ·S··M··K··I··I··S··N··S··*··L··L··Y··L··T··Y··R··C··A··M··R·
+3fr: ·R··*··K··L··S··Q··I··H··D··Y··Y··I··*··L··I··G··V··Q··C··E·


DNA: agtgttcctaactgcaaacataggagctctgtaatcacgatggttgatgtttatgacata
+1fr: ·S··V··P··N··C··K··H··R··S··S··V··I··T··M··V··D··V··Y··D··I·
+2fr: ·V··F··L··T··A··N··I··G··A··L··*··S··R··W··L··M··F··M··T··Y·
+3fr: ·C··S··*··L··Q··T··*··E··L··C··N··H··D··G··*··C··L··*··H··T·


DNA: catgtggaacaattattgcaagctatggaggttaaaggtgcagtcttggccagattgttc
+1fr: ·H··V··E··Q··L··L··Q··A··M··E··V··K··G··A··V··L··A··R··L··F·
+2fr: ·M··W··N··N··Y··C··K··L··W··R··L··K··V··Q··S··W··P··D··C··S·
+3fr: ·C··G··T··I··I··A··S··Y··G··G··*··R··C··S··L··G··Q··I··V··L·


DNA: tttatgtttccccctgaaattctagcaggtgcagagtcggtgcagtatcctgaaacattc
+1fr: ·F··M··F··P··P··E··I··L··A··G··A··E··S··V··Q··Y··P··E··T··F·
+2fr: ·L··C··F··P··L··K··F··*··Q··V··Q··S··R··C··S··I··L··K··H··S·
+3fr: ·Y··V··S··P··*··N··S··S··R··C··R··V··G··A··V··S··*··N··I··L·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: tctcactgtcagcatataagaagggagtagacttggtatattttataggagaaacaggtg
+1fr: ·S··H··C··Q··H··I··R··R··E··*··T··W··Y··I··L··*··E··K··Q··V·
+2fr: ·L··T··V··S··I··*··E··G··S··R··L··G··I··F··Y··R··R··N··R··*·
+3fr: ·S··L··S··A··Y··K··K··G··V··D··L··V··Y··F··I··G··E··T··G··D·


DNA: actcttacgttcactccctgcgacaccttgctctcctatatcactcgaagcgtagtagtg
+1fr: ·T··L··T··F··T··P··C··D··T··L··L··S··Y··I··T··R··S··V··V··V·
+2fr: ·L··L··R··S··L··P··A··T··P··C··S··P··I··S··L··E··A··*··*··*·
+3fr: ·S··Y··V··H··S··L··R··H··L··A··L··L··Y··H··S··K··R··S··S··E·


DNA: agtcaaaacaggaagggacagctgactacattgaacctcagatccgagcagggtttggac
+1fr: ·S··Q··N··R··K··G··Q··L··T··T··L··N··L··R··S··E··Q··G··L··D·
+2fr: ·V··K··T··G··R··D··S··*··L··H··*··T··S··D··P··S··R··V··W··T·
+3fr: ·S··K··Q··E··G··T··A··D··Y··I··E··P··Q··I··R··A··G··F··G··P·


DNA: cctatttggatatgtaccgctatctttagacccgcaaggagaggaagctcctacaagaca
+1fr: ·P··I··W··I··C··T··A··I··F··R··P··A··R··R··G··S··S··Y··K··T·
+2fr: ·L··F··G··Y··V··P··L··S··L··D··P··Q··G··E··E··A··P··T··R··Q·
+3fr: ·Y··L··D··M··Y··R··Y··L··*··T··R··K··E··R··K··L··L··Q··D··K·


DNA: agcttaccctatccctgaaggttgcaagtgcctaatggacgagcgggaatgcactcgtat
+1fr: ·S··L··P··Y··P··*··R··L··Q··V··P··N··G··R··A··G··M··H··S··Y·
+2fr: ·A··Y··P··I··P··E··G··C··K··C··L··M··D··E··R··E··C··T··R··I·
+3fr: ·L··T··L··S··L··K··V··A··S··A··*··W··T··S··G··N··A··L··V··S·


DNA: cacaataccgagaatgaatgaatcatggagtggtggacaagttttcaatattagtcaaca
+1fr: ·H··N··T··E··N··E··*··I··M··E··W··W··T··S··F··Q··Y··*··S··T·
+2fr: ·T··I··P··R··M··N··E··S··W··S··G··G··Q··V··F··N··I··S··Q··Q·
+3fr: ·Q··Y··R··E··*··M··N··H··G··V··V··D··K··F··S··I··L··V··N··R·


DNA: gagacttcgttcgtagaagcttgtcttacgccgctaacgtctgcaacactaccgacgatc
+1fr: ·E··T··S··F··V··E··A··C··L··T··P··L··T··S··A··T··L··P··T··I·
+2fr: ·R··L··R··S··*··K··L··V··L··R··R··*··R··L··Q··H··Y··R··R··S·
+3fr: ·D··F··V··R··R··S··L··S··Y··A··A··N··V··C··N··T··T··D··D··R·


DNA: gtactttcgagtacgttatgtcgaatctcaggtcgcagacgactatgatggtagttggtt
+1fr: ·V··L··S··S··T··L··C··R··I··S··G··R··R··R··L··*··W··*··L··V·
+2fr: ·Y··F··R··V··R··Y··V··E··S··Q··V··A··D··D··Y··D··G··S··W··F·
+3fr: ·T··F··E··Y··V··M··S··N··L··R··S··Q··T··T··M··M··V··V··G··S·


DNA: caaaaatagtacacacaaaggtggatttatctaatgacgtgatcgttgagctacctactg
+1fr: ·Q··K··*··Y··T··Q··R··W··I··Y··L··M··T··*··S··L··S··Y··L··L·
+2fr: ·K··N··S··T··H··K··G··G··F··I··*··*··R··D··R··*··A··T··Y··C·
+3fr: ·K··I··V··H··T··K··V··D··L··S··N··D··V··I··V··E··L··P··T··V·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: tcattctgaatgaagccgtttcaagacggaatcgtgccgtcaaaatgttgaaacaggcca
+1fr: ·S··F··*··M··K··P··F··Q··D··G··I··V··P··S··K··C··*··N··R··P·
+2fr: ·H··S··E··*··S··R··F··K··T··E··S··C··R··Q··N··V··E··T··G··Q·
+3fr: ·I··L··N··E··A··V··S··R··R··N··R··A··V··K··M··L··K··Q··A··N·

DNA: acaggggtttcctatataagatattctccacccttttataaaggattaactgcctctgtgt
+1fr: ·T··G··V··S··Y··I··R··Y··S··P··P··F··I··K··D··*··L··P··L··C·
+2fr: ·Q··G··F··P··I··*··D··I··L··H··P··L··*··R··I··N··C··L··C··V·
+3fr: ·R··G··F··L··Y··K··I··F··S··T··L··Y··K··G··L··T··A··S··V··C·

DNA: gttggatattaaagaaaatattcaattgcctcccaaagtgcgttgtggacgcttgtgagg
+1fr: ·V··G··Y··*··R··K··Y··S··I··A··S··Q··S··A··L··W··T··L··V··R·
+2fr: ·L··D··I··K··E··N··I··Q··L··P··P··K··V··R··C··G··R··L··*··G·
+3fr: ·W··I··L··K··K··I··F··N··C··L··P··K··C··V··V··D··A··C··E··D·

DNA: atttgtttaagactcattatggattgaaagatacagacgatgaaattgtgatcagttctt
+1fr: ·I··C··L··R··L··I··M··D··*··K··I··Q··T··M··K··L··*··S··V··L·
+2fr: ·F··V··*··D··S··L··W··I··E··R··Y··R··R··*··N··C··D··Q··F··F·
+3fr: ·L··F··K··T··H··Y··G··L··K··D··T··D··D··E··I··V··I··S··S··S·

DNA: ccgtggagtctggaccattagactgcgaaaatgaatatattgaagaattattgacgattt
+1fr: ·P··W··S··L··D··H··*··T··A··K··M··N··I··L··K··N··Y··*··R··F·
+2fr: ·R··G··V··W··T··I··R··L··R··K··*··I··Y··*··R··I··I··D··D··F·
+3fr: ·V··E··S··G··P··L··D··C··E··N··E··Y··I··E··E··L··L··T··I··S·

DNA: cgcaagcgttggccggactcaattgcaaagctggaccgatgaagcttgaggaggaaatta
+1fr: ·R··K··R··W··P··D··S··I··A··K··L··D··R··*··S··L··R··R··K··L·
+2fr: ·A··S··V··G··R··T··Q··L··Q··S··W··T··D··E··A··*··G··G··N··*·
+3fr: ·Q··A··L··A··G··L··N··C··K··A··G··P··M··K··L··E··E··E··I··S·

DNA: gcgaaattgaagaagagcttgaagatgactcgtttgaaaacctcaaaaatccgataaacg
+1fr: ·A··K··L··K··K··S··L··K··M··T··R··L··K··T··S··K··I··R··*··T·
+2fr: ·R··N··*··R··R··A··*··R··*··L··V··*··K··P··Q··K··S··D··K··R·
+3fr: ·E··I··E··E··E··L··E··D··D··S··F··E··N··L··K··N··P··I··N··E·

DNA: aatcaaagaatgaacggtccggaggtttaaaaggtggcggcgcaaccaattggtatgatt
+1fr: ·N··Q··R··M··N··G··P··E··V··*··K··V··A··A··Q··P··I··G··M··I·
+2fr: ·I··K··E··*··T··V··R··R··F··K··R··W··R··R··N··Q··L··V··*··F·
+3fr: ·S··K··N··E··R··S··G··G··L··K··G··G··G··A··T··N··W··Y··D··F·

DNA: tcctactgccgaacaggccggaagccaaacctgcagactctgctagagctgcgctgtggc
+1fr: ·S··Y··C··R··T··G··R··K··P··N··L··Q··T··L··L··E··L··R··C··G·
+2fr: ·P··T··A··E··Q··A··G··S··Q··T··C··R··L··C··*··S··C··A··V··A·
+3fr: ·L··L··P··N··R··P··E··A··K··P··A··D··S··A··R··A··A··L··W··R·
```

ที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: gtttatgcaggcgtttgacaagaatggtgtgcaatctagacatagtgactcccatcagaa
+1fr: ·V··Y··A··G··V··*··Q··E··W··C··A··I··*··T··*··*··L··P··S··E·
+2fr: ·F··M··Q··A··F··D··K··N··G··V··Q··S··R··H··S··D··S··H··Q··K·
+3fr: ·L··C··R··R··L··T··R··M··V··C··N··L··D··I··V··T··P··I··R··R·


DNA: gattgctaacgaccctgctactagcattgtcgaagttaataattcgggaatggaagatac
+1fr: ·D··C··*··R··P··C··Y··*··H··C··R··S··*··*··F··G··N··G··R··Y·
+2fr: ·I··A··N··D··P··A··T··S··I··V··E··V··N··N··S··G··M··E··D··T·
+3fr: ·L··L··T··T··L··L··L··A··L··S··K··L··I··I··R··E··W··K··I··R·


DNA: gaaaatattaaagaggaaagatgaggagagactggaccagacattgaaaactatagtagg
+1fr: ·E··N··I··K··E··E··R··*··G··E··T··G··P··D··I··E··N··Y··S··R·
+2fr: ·K··I··L··K··R··K··D··E··E··R··L··D··Q··T··L··K··T··I··V··G·
+3fr: ·K··Y··*··R··G··K··M··R··R··D··W··T··R··H··*··K··L··*··*··G·


DNA: ggaaattttgaagagaggttttagtgaaagtgggtgatctattaaagggattctctcatg
+1fr: ·G··N··F··E··E··R··F··*··*··K··W··V··I··Y··*··R··D··S··L··M·
+2fr: ·E··I··L··K··R··G··F··S··E··S··G··*··S··I··K··G··I··L··S··C·
+3fr: ·K··F··*··R··E··V··L··V··K··V··G··D··L··L··K··G··F··S··H··V·


DNA: ttgcatgtaaaccactagtatatgttggacaggcatccactactctgttcaccaacgcat
+1fr: ·L··H··V··N··H··*··Y··M··L··D··R··H··P··L··L··C··S··P··T··H·
+2fr: ·C··M··*··T··T··S··I··C··W··T··G··I··H··Y··S··V··H··Q··R··M·
+3fr: ·A··C··K··P··L··V··Y··V··G··Q··A··S··T··T··L··F··T··N··A··C·


DNA: gcagtgctttgaaggaagatgctgctgatcgtatcagacagctaaaacacaggatagcaa
+1fr: ·A··V··L··*··R··K··M··L··L··I··V··S··D··S··*··N··T··G··*··Q·
+2fr: ·Q··C··F··E··G··R··C··C··*··S··Y··Q··T··A··K··T··Q··D··S··K·
+3fr: ·S··A··L··K··E··D··A··A··D··R··I··R··Q··L··K··H··R··I··A··K·


DNA: aagcgttgaaagcagcagatatggcttacccgaaagactggataattgaggggaaatatc
+1fr: ·K··R··*··K··Q··Q··I··W··L··T··R··K··T··G··*··L··R··G··N··I·
+2fr: ·S··V··E··S··S··R··Y··G··L··P··E··R··L··D··N··*··G··E··I··S·
+3fr: ·A··L··K··A··A··D··M··A··Y··P··K··D··W··I··I··E··G··K··Y··L·


DNA: tcaggtttttcaataagtatatcaggagatttatcccacacgctgcatttgcttccgtgg
+1fr: ·S··G··F··S··I··S··I··S··G··D··L··S··H··T··L··H··L··L··P··W·
+2fr: ·Q··V··F··Q··*··V··Y··Q··E··I··Y··P··T··R··C··I··C··F··R··G·
+3fr: ·R··F··F··N··K··Y··I··R··R··F··I··P··H··A··A··F··A··S··V··V·


DNA: ttgtatctgccatagtaataagtaaagccaacaaagtgttttgtaaaactttaaacacca
+1fr: ·L··Y··L··P··*··*··*··V··K··P··T··K··C··F··V··K··L··*··T··P·
+2fr: ·C··I··C··H··S··N··K··*··S··Q··Q··S··V··L··*··N··F··K··H··H·
+3fr: ·V··S··A··I··V··I··S··K··A··N··K··V··F··C··K··T··L··N··T··M·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: tgtttgataagcttaaaagtaagttggaaaatttaaaacttgtgtcgacaagtactctct
+1fr: ·C··L··I··S··L··K··V··S··W··K··I··*··N··L··C··R··Q··V··L··S·
+2fr: ·V··*··*··A··*··K··*··V··G··K··F··K··T··C··V··D··K··Y··S··L·
+3fr: ·F··D··K··L··K··S··K··L··E··N··L··K··L··V··S··T··S··T··L··C·

DNA: gtgcgataatgtttgggatgtgcttttgcaaattcgtcaatttaatatctgttgttagtg
+1fr: ·V··R··*··C··L··G··C··A··F··A··N··S··S··I··*··Y··L··L··L··V·
+2fr: ·C··D··N··V··W··D··V··L··L··Q··I··R··Q··F··N··I··C··C··*··C·
+3fr: ·A··I··M··F··G··M··C··F··C··K··F··V··N··L··I··S··V··V··S··A·

DNA: ctgtcgcaaatccacttacattggctttaccagtttatgtgggggctgaattttccagcg
+1fr: ·L··S··Q··I··H··L··H··W··L··Y··Q··F··M··W··G··L··N··F··P··A·
+2fr: ·C··R··K··S··T··Y··I··G··F··T··S··L··C··G··G··*··I··F··Q··R·
+3fr: ·V··A··N··P··L··T··L··A··L··P··V··Y··V··G··A··E··F··S··S··V·

DNA: tagtacatgacggtttgggcggaagaaacatatttaatttcaatcggtttatgagaattt
+1fr: ·*··Y··M··T··V··W··A··E··E··T··Y··L··I··S··I··G··L··*··E··F·
+2fr: ·S··T··*··R··F··G··R··K··K··H··I··*··F··Q··S··V··Y··E··N··F·
+3fr: ·V··H··D··G··L··G··G··R··N··I··F··N··F··N··R··F··M··R··I··L·

DNA: taatcaacttaagcgcgcttaagaccctcaaaccaccaatcaaatacgtgcctacgtcng
+1fr: ·*··S··T··*··A··R··L··R··P··S··N··H··Q··S··N··T··C··L··R··X·
+2fr: ·N··Q··L··K··R··A··*··D··P··Q··T··T··N··Q··I··R··A··Y··V··X·
+3fr: ·I··N··L··S··A··L··K··T··L··K··P··P··I··K··Y··V··P··T··S··D·

DNA: attctgatagaagcggtagagacggtactcgatgtcgttcctgacctgaatcgcttcgat
+1fr: ·I··L··I··E··A··V··E··T··V··L··D··V··V··P··D··L··N··R··F··D·
+2fr: ·F··*··*··K··R··*··R··R··Y··S··M··S··F··L··T··*··I··A··S··I·
+3fr: ·S··D··R··S··G··R··D··G··T··R··C··R··S··*··P··E··S··L··R··*·

DNA: aggaggaatgttatgtctagggctctggacactgtccgaatgggggcggtgagcctgcag
+1fr: ·R··R··N··V··M··S··R··A··L··D··T··V··R··M··G··A··V··S··L··Q·
+2fr: ·G··G··M··L··C··L··G··L··W··T··L··S··E··W··G··R··*··A··C··R·
+3fr: ·E··E··C··Y··V··*··G··S··G··H··C··P··N··G··G··G··E··P··A··E·

DNA: agagacgagacacgcctagaaaaggggcattaacccacaatgcgcacgagcacccacat
+1fr: ·R··D··E··T··R··L··E··K··G··A··L··T··H··N··A··H··E··H··P··H·
+2fr: ·E··T··R··H··A··*··K··R··G··H··*··P··T··M··R··T··S··T··H··M·
+3fr: ·R··R··D··T··P··R··K··G··G··I··N··P··Q··C··A··R··A··P··T··C·

DNA: gcaggcgaatcttatagatctcactaaagctgcaagacagcgatggcgagcgtttgagga
+1fr: ·A··G··E··S··Y··R··S··H··*··S··C··K··T··A··M··A··S··V··*··G·
+2fr: ·Q··A··N··L··I··D··L··T··K··A··A··R··Q··R··W··R··A··F··E··E·
+3fr: ·R··R··I··L··*··I··S··L··K··L··Q··D··S··D··G··E··R··L··R··K·
```

ที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: aaggtaaagctgtcgtctctgatgttcatgaygcggttgcgaacgaatctctcgmggtga
+1fr: ·K··V··K··L··S··S··L··M··F··M··X··R··L··R··T··N··L··S··R··*·
+2fr: ·R··*··S··C··R··L··*··C··S··*··X··G··C··E··R··I··S··R··G··D·
+3fr: ·G··K··A··V··V··S··D··V··H··D··A··V··A··N··E··S··L··X··V··M·

DNA: tgcsagaatctggcgagattatgcctggtgtaggacaagaaattggatcatctagcggag
+1fr: ·C··X··N··L··A··R··L··C··L··V··*··D··K··K··L··D··H··L··A··E·
+2fr: ·A··R··I··W··R··D··Y··A··W··C··R··T··R··N··W··I··I··*··R··S·
+3fr: ·X··E··S··G··E··I··M··P··G··V··G··Q··E··I··G··S··S··S··G··A·

DNA: cttcragatgtakgttcgaaggggtttttaaacccgctattcccgttgtcttcggtgaga
+1fr: ·L··X··D··V··X··S··K··G··F··L··N··P··L··F··P··L··S··S··V··R·
+2fr: ·F··X··M··X··V··R··R··G··F··*··T··R··Y··S··R··C··L··R··*··E·
+3fr: ·S··R··C··X··F··E··G··V··F··K··P··A··I··P··V··V··F··G··E··K·

DNA: aagataaaagacccttttgaagagtcgtctagagagagtgattccacaataatgcccgaaa
+1fr: ·K··I··K··D··P··L··K··S··R··L··E··R··V··I··P··Q··*··C··P··K·
+2fr: ·R··*··K··T··L··*··R··V··V··*··R··E··*··F··H··N··N··A··R··K·
+3fr: ·D··K··R··P··F··E··E··S··S··R··E··S··D··S··T··I··M··P··E··R·

DNA: gaaatttagttgtggaacatacgcaaacgttaattttaggcgacgatgtgaggtcagaag
+1fr: ·E··I··*··L··W··N··I··R··K··R··*··F··*··A··T··M··*··G··Q··K·
+2fr: ·K··F··S··C··G··T··Y··A··N··V··N··F··R··R··R··C··E··V··R··R·
+3fr: ·N··L··V··V··E··H··T··Q··T··L··I··L··G··D··D··V··R··S··E··G·

DNA: gggaaagcgtagagaataaccaaaccgtcaacacggaagtaaacgtctcaagatgcgtta
+1fr: ·G··K··A··*··R··I··T··K··P··S··T··R··K··*··T··S··Q··D··A··L·
+2fr: ·G··K··R··R··E··*··P··N··R··Q··H··G··S··K··R··L··K··M··R··*·
+3fr: ·E··S··V··E··N··N··Q··T··V··N··T··E··V··N··V··S··R··C··V··N·

DNA: ataaggtatcatctccgctgaagatagtagaccgaccggagcaaggggttgtccagcaag
+1fr: ·I··R··Y··H··L··R··*··R··*··*··T··D··R··S··K··G··L··S··S··K·
+2fr: ·*··G··I··I··S··A··E··D··S··R··P··T··G··A··R··G··C··P··A··S·
+3fr: ·K··V··S··S··P··L··K··I··V··D··R··P··E··Q··G··V··V··Q··Q··V·

DNA: tgtgtaaggtgcagccggtgaaccgatttcaagttgtcaagactatcctagccaatactc
+1fr: ·C··V··R··C··S··R··*··T··D··F··K··L··S··R··L··S··*··P··I··L·
+2fr: ·V··*··G··A··A··G··E··P··I··S··S··C··Q··D··Y··P··S··Q··Y··S·
+3fr: ·C··K··V··Q··P··V··N··R··F··Q··V··V··K··T··I··L··A··N··T··L·

DNA: ttggattctcatttactggaatgaacagtttcctagacatagaaagttataggacactgg
+1fr: ·L··D··S··H··L··L··E··*··T··V··S··*··T··*··K··V··I··G··H··W·
+2fr: ·W··I··L··I··Y··W··N··E··Q··F··P··R··H··R··K··L··*··D··T··G·
+3fr: ·G··F··S··F··T··G··M··N··S··F··L··D··I··E··S··Y··R··T··L··V·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: ttaggagagtaagtggatctgatgggtattcagctgtattggaagctttatgtcattcgt
+1fr: ·L··G··E··*··V··D··L··M··G··I··Q··L··Y··W··K··L··Y··V··I··R·
+2fr: ·*··E··S··K··W··I··*··W··V··F··S··C··I··G··S··F··M··S··F··V·
+3fr: ·R··R··V··S··G··S··D··G··Y··S··A··V··L··E··A··L··C··H··S··L·

DNA: tgcacgggttgagggctgaggttgacgttttggacaaagttgttaaacagcagataccgt
+1fr: ·C··T··G··*··G··L··R··L··T··F··W··T··K··L··L··N··S··R··Y··R·
+2fr: ·A··R··V··E··G··*··G··*··R··F··G··Q··S··C··*··T··A··D··T··V·
+3fr: ·H··G··L··R··A··E··V··D··V··L··D··K··V··V··K··Q··Q··I··P··L·

DNA: taatcggtcacaaacacgaattgttttgcaggatcatgaaaaggcgccggatagagtaaa
+1fr: ·*··S··V··T··N··T··N··C··F··A··G··S··*··K··G··A··G··*··S··K·
+2fr: ·N··R··S··Q··T··R··I··V··L··Q··D··H··E··K··A··P··D··R··V··K·
+3fr: ·I··G··H··K··H··E··L··F··C··R··I··M··K··R··R··R··I··E··*··S·

DNA: gtacaaaccggacgggttccattattacaacgtagagctcagcaacatttacggtttagt
+1fr: ·V··Q··T··G··R··V··P··L··L··Q··R··R··A··Q··Q··H··L··R··F··S·
+2fr: ·Y··K··P··D··G··F··H··Y··Y··N··V··E··L··S··N··I··Y··G··L··V·
+3fr: ·T··N··R··T··G··S··I··I··T··T··*··S··S··A··T··F··T··V··*··*·

DNA: gaacacccgcaagtcgcgatacaacaacgaaccctgcggttcaagaaaccggaggggatc
+1fr: ·E··H··P··Q··V··A··I··Q··Q··R··T··L··R··F··K··K··P··E··G··I·
+2fr: ·N··T··R··K··S··R··Y··N··N··E··P··C··G··S··R··N··R··R··G··S·
+3fr: ·T··P··A··S··R··D··T··T··T··N··P··A··V··Q··E··T··G··G··D··R·

DNA: gttttcttcgaaccacatcgaaaacctcgtttaatttaattccgatcgttagcgttaata
+1fr: ·V··F··F··E··P··H··R··K··P··R··L··I··*··F··R··S··L··A··L··I·
+2fr: ·F··S··S··N··H··I··E··N··L··V··*··F··N··S··D··R··*··R··*··*·
+3fr: ·F··L··R··T··T··S··K··T··S··F··N··L··I··P··I··V··S··V··N··R·

DNA: gacctttccggcgaaagttagcgtcgaggaagttaacaagagcgattcgacaatcgtcga
+1fr: ·D··L··S··G··E··S··*··R··R··G··S··*··Q··E··R··F··D··N··R··R·
+2fr: ·T··F··P··A··K··V··S··V··E··E··V··N··K··S··D··S··T··I··V··E·
+3fr: ·P··F··R··R··K··L··A··S··R··K··L··T··R··A··I··R··Q··S··S··K·

DNA: aatttcgtgaacgctgttcccggggcagggaaaaacctaccagatcaaacagagaatgtt
+1fr: ·N··F··V··N··A··V··P··G··A··G··K··N··L··P··D··Q··T··E··N··V·
+2fr: ·I··S··*··T··L··F··P··G··Q··G··K··T··Y··Q··I··K··Q··R··M··L·
+3fr: ·F··R··E··R··C··S··R··G··R··E··K··P··T··R··S··N··R··E··C··Y·

DNA: acgctcgggtcgattcggaaaaggatcggtagcgcgttgttagtgttgacttcgagtaga
+1fr: ·T··L··G··S··I··R··K··R··I··G··S··A··L··L··V··L··T··S··S··R·
+2fr: ·R··S··G··R··F··G··K··G··S··V··A··R··C··*··C··*··L··R··V··E·
+3fr: ·A··R··V··D··S··E··K··D··R··*··R··V··V··S··V··D··F··E··*··K·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: aactcagctgatacgctaaaagcttttcgcgcaggagaagaggttcgggcaagatgattt
+1fr: ·N··S··A··D··T··L··K··A··F··R··A··G··E··E··V··R··A··R··*··F·
+2fr: ·T··Q··L··I··R··*··K··L··F··A··Q··E··K··R··F··G··Q··D··D··F·
+3fr: ·L··S··*··Y··A··K··S··F··S··R··R··R··R··G··S··G··K··M··I··S·

DNA: cagattttaacggtcgatgcatttttttgttccaagcgagaggaaggaaatgtaagaactt
+1fr: ·Q··I··L··T··V··D··A··F··F··V··P··S··E··R··K··E··M··*··E··L·
+2fr: ·R··F··*··R··S··M··H··F··L··F··Q··A··R··G··R··K··C··K··N··F·
+3fr: ·D··F··N··G··R··C··I··F··C··S··K··R··E··E··G··N··V··R··T··L·

DNA: tatataaaacgtttgtttgatagacgaatgctacatgacacacgcgggcatatttgcgag
+1fr: ·Y··I··K··R··L··F··D··R··R··M··L··H··D··T··R··G··H··I··C··E·
+2fr: ·I··*··N··V··C··L··I··D··E··C··Y··M··T··H··A··G··I··F··A··R·
+3fr: ·Y··K··T··F··V··*··*··T··N··A··T··*··H··T··R··A··Y··L··R··G·

DNA: gtataatcgccgctgtgaaagccggaagagtgtgtactttacggtgataggcgacaagtg
+1fr: ·V··*··S··P··L··*··K··P··E··E··C··V··L··Y··G··D··R··R··Q··V·
+2fr: ·Y··N··R··R··C··E··S··R··K··S··V··Y··F··T··V··I··G··D··K··C·
+3fr: ·I··I··A··A··V··K··A··G··R··V··C··T··L··R··*··*··A··T··S··A·

DNA: ccctttatcaacagaaatcgaaattgctgaaatgacgaacgaaatccttttttgaaaaccg
+1fr: ·P··F··I··N··R··N··R··N··C··*··N··D··E··R··N··P··F··*··K··P·
+2fr: ·P··L··S··T··E··I··E··I··A··E··M··T··N··E··I··L··F··E··N··R·
+3fr: ·L··Y··Q··Q··K··S··K··L··L··K··*··R··T··K··S··F··L··K··T··E·

DNA: aagttttcggcgaattattcgagagaatgttgatgaacccagggcgagtgttccacgcca
+1fr: ·K··F··S··A··N··Y··S··R··E··C··*··*··T··Q··G··E··C··S··T··P·
+2fr: ·S··F··R··R··I··I··R··E··N··V··D··E··P··R··A··S··V··P··R··Q·
+3fr: ·V··F··G··E··L··F··E··R··M··L··M··N··P··G··R··V··F··H··A··R·

DNA: gaacgwtctggttgagtggaatgttcccgaatgttgaacggaatgggaagaaaggagatm
+1fr: ·E··R··S··G··*··V··E··C··S··R··M··L··N··G··M··G··R··K··E··I·
+2fr: ·N··X··L··V··E··W··N··V··P··E··C··*··T··E··W··E··E··R··R··X·
+3fr: ·T··X··W··L··S··G··M··F··P··N··V··E··R··N··G··K··K··G··D··X·

DNA: gttwgkactcagraycggtaaawttgttkacttcagtctggacccgggtgaggaattgta
+1fr: ·V··X··T··Q··X··R··*··X··C··X··L··Q··S··G··P··G··*··G··I··V·
+2fr: ·X··X··L··R··X··G··K··X··V··X··F··S··L··D··P··G··E··E··L··*·
+3fr: ·X··X··S··X··X··V··X··L··X··T··S··V··W··T··R··V··R··N··C··N·

DNA: acatgtacacgagttcagtgaagtgatcacaatctattctcacaagtggacagggtcatg
+1fr: ·T··C··T··R··V··Q··*··S··D··H··N··L··F··S··Q··V··D··R··V··M·
+2fr: ·H··V··H··E··F··S··E··V··I··T··I··Y··S··H··K··W··T··G··S··*·
+3fr: ·M··Y··T··S··S··V··K··*··S··Q··S··I··L··T··S··G··Q··G··H··D·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: acctttactcagaacgagaagaatgaactcatctcagagttcatgagcaggggaataggt
+1fr: ·T··F··T··Q··N··E··K··N··E··L··I··S··E··F··M··S··R··G··I··G·
+2fr: ·P··L··L··R··T··R··R··M··N··S··S··Q··S··S··*··A··G··E··*··V·
+3fr: ·L··Y··S··E··R··E··E··*··T··H··L··R··V··H··E··Q··G··N··R··Y·

DNA: acaattgaggacgcaagaaccctgatcggtacggttgctgaatctcaaggtgaaacttac
+1fr: ·T··I··E··D··A··R··T··L··I··G··T··V··A··E··S··Q··G··E··T··Y·
+2fr: ·Q··L··R··T··Q··E··P··*··S··V··R··L··L··N··L··K··V··K··L··T·
+3fr: ·N··*··G··R··K··N··P··D··R··Y··G··C··*··I··S··R··*··N··L··R·

DNA: gggagggttcatttagttgcatttaaaccgacggatgaccaagtgtttttcttccatgcc
+1fr: ·G··R··V··H··L··V··A··F··K··P··T··D··D··Q··V··F··F··F··H··A·
+2fr: ·G··G··F··I··*··L··H··L··N··R··R··M··T··K··C··F··S··S··M··P·
+3fr: ·E··G··S··F··S··C··I··*··T··D··G··*··P··S··V··F··L··P··C··R·

DNA: gcataaattggtagctttgtcgagacacaccatcagctttgcagtacttttgcataccta
+1fr: ·A··*··I··G··S··F··V··E··T··H··H··Q··L··C··S··T··F··A··Y··L·
+2fr: ·H··K··L··V··A··L··S··R··H··T··I··S··F··A··V··L··L··H··T··*·
+3fr: ·I··N··W··*··L··C··R··D··T··P··S··A··L··Q··Y··F··C··I··P··N·

DNA: ataaaatgaacaagggtataggtgaagacgtgcagtcaataatcaagcgggaggatagag
+1fr: ·I··K··*··T··R··V··*··V··K··T··C··S··Q··*··S··S··G··R··I··E·
+2fr: ·*··N··E··Q··G··Y··R··*··R··R··A··V··N··N··Q··A··G··G··*··S·
+3fr: ·K··M··N··K··G··I··G··E··D··V··Q··S··I··I··K··R··E··D··R··V·

DNA: tcgctgcaaattttgtagttcagcagggcgtttaacatttatcttccgggtaaggatgtg
+1fr: ·S··L··Q··I··L··*··F··S··R··A··F··N··I··Y··L··P··G··K··D··V·
+2fr: ·R··C··K··F··C··S··S··A··G··R··L··T··F··I··F··R··V··R··M··W·
+3fr: ·A··A··N··F··V··V··Q··Q··G··V··*··H··L··S··S··G··*··G··C··G·

DNA: gtcatcccaatgccgttgggtatgggaagacctccaaaggctcacttcgaagctatccaa
+1fr: ·V··I··P··M··P··L··G··M··G··R··P··P··K··A··H··F··E··A··I··Q·
+2fr: ·S··S··Q··C··R··W··V··W··E··D··L··Q··R··L··T··S··K··L··S··K·
+3fr: ·H··P··N··A··V··G··Y··G··K··T··S··K··G··S··L··R··S··Y··P··K·

DNA: agttttctcgacgacacactgaacggagttgggtctttgttgttccttaacacggaagaa
+1fr: ·S··F··L··D··D··T··L··N··G··V··G··S··L··L··F··L··N··T··E··E·
+2fr: ·V··F··S··T··T··H··*··T··E··L··G··L··C··C··S··L··T··R··K··N·
+3fr: ·F··S··R··R··H··T··E··R··S··W··V··F··V··V··P··*··H··G··R··T·

DNA: cagtttcaaatgactgacaccatcaccaacatctctgatttttccatgagcgataacgat
+1fr: ·Q··F··Q··M··T··D··T··I··T··N··I··S··D··F··S··M··S··D··N··D·
+2fr: ·S··F··K··*··L··T··P··S··P··T··S··L··I··F··P··*··A··I··T··I·
+3fr: ·V··S··N··D··*··H··H··H··Q··H··L··*··F··F··H··E··R··*··R··Y·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: attcgctttaaaccgatcaagtttttctccaatcagccaagaatcagatcacagatggta
+1fr: ·I··R··F··K··P··I··K··F··F··S··N··Q··P··R··I··R··S··Q··M··V·
+2fr: ·F··A··L··N··R··S··S··F··S··P··I··S··Q··E··S··D··H··R··W··*·
+3fr: ·S··L··*··T··D··Q··V··F··L··Q··S··A··K··N··Q··I··T··D··G··S·

DNA: gtacgtagacaaaacactctaaaagcaaatattttggcctatgaaaagaggaatgcggga
+1fr: ·V··R··R··Q··N··T··L··K··A··N··I··L··A··Y··E··K··R··N··A··G·
+2fr: ·Y··V··D··K··T··L··*··K··Q··I··F··W··P··M··K··R··G··M··R··E·
+3fr: ·T··*··T··K··H··S··K··S··K··Y··F··G··L··*··K··E··E··C··G··S·

DNA: gtggttaaatctttgtggcatccagatgtgactgatgaagtaatggctgtggtggacgac
+1fr: ·V··V··K··S··L··W··H··P··D··V··T··D··E··V··M··A··V··V··D··D·
+2fr: ·W··L··N··L··C··G··I··Q··M··*··L··M··K··*··W··L··W··W··T··T·
+3fr: ·G··*··I··F··V··A··S··R··C··D··*··*··S··N··G··C··G··G··R··L·

DNA: ttctttggttcgtacgtagattcccggaaattgagtgaagtgttggtggatcctgtagaa
+1fr: ·F··F··G··S··Y··V··D··S··R··K··L··S··E··V··L··V··D··P··V··E·
+2fr: ·S··L··V··R··T··*··I··P··G··N··*··V··K··C··W··W··I··L··*··N·
+3fr: ·L··W··F··V··R··R··F··P··E··I··E··*··S··V··G··G··S··C··R··T·

DNA: ccaaatatatttgatttagccgattggttgttgagcagaactccaatgggaaagaaagcc
+1fr: ·P··N··I··F··D··L··A··D··W··L··L··S··R··T··P··M··G··K··K··A·
+2fr: ·Q··I··Y··L··I··*··P··I··G··C··*··A··E··L··Q··W··E··R··K··P·
+3fr: ·K··Y··I··*··F··S··R··L··V··V··E··Q··N··S··N··G··K··E··S··P·

DNA: ctaaaaatggaaatgggaatcctgttggaactaggtacaaatttgaataggtttaagctg
+1fr: ·L··K··M··E··M··G··I··L··L··E··L··G··T··N··L··N··R··F··K··L·
+2fr: ·*··K··W··K··W··E··S··C··W··N··*··V··Q··I··*··I··G··L··S··*·
+3fr: ·K··N··G··N··G··N··P··V··G··T··R··Y··K··F··E··*··V··*··A··D·

DNA: atggtaaaagcggatgtaaaatttaaaacagatttggagtgtctgtcggaagtaccacct
+1fr: ·M··V··K··A··D··V··K··F··K··T··D··L··E··C··L··S··E··V··P··P·
+2fr: ·W··*··K··R··M··*··N··L··K··Q··I··W··S··V··C··R··K··Y··H··L·
+3fr: ·G··K··S··G··C··K··I··*··N··R··F··G··V··S··V··G··S··T··T··W·

DNA: gggcagaatatagttttccatgacagagcgatatgcgcacacttctccgtgtgttttagg
+1fr: ·G··Q··N··I··V··F··H··D··R··A··I··C··A··H··F··S··V··C··F··R·
+2fr: ·G··R··I··*··F··S··M··T··E··R··Y··A··H··T··S··P··C··V··L··G·
+3fr: ·A··E··Y··S··F··P··*··Q··S··D··M··R··T··L··L··R··V··F··*··G·

DNA: gaaatggtcaatagattgcgcrcagtcgtacacaaaaatattgtacttttcaacggatta
+1fr: ·E··M··V··N··R··L··R··X··V··V··H··K··N··I··V··L··F··N··G··L·
+2fr: ·K··W··S··I··D··C··A··Q··S··Y··T··K··I··L··Y··F··S··T··D··*·
+3fr: ·N··G··Q··*··I··A··X··S··R··T··Q··K··Y··C··T··F··Q··R··I··K·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: agttttgaagaatttgctgatcagttgagcgcggcgcttaacgatgagtcaattgatacg
+1fr: ·S··F··E··E··F··A··D··Q··L··S··A··A··L··N··D··E··S··I··D··T·
+2fr: ·V··L··K··N··L··L··I··S··*··A··R··R··L··T··M··S··Q··L··I··R·
+3fr: ·F··*··R··I··C··*··S··V··E··R··G··A··*··R··*··V··N··*··Y··V·

DNA: ttcaattgtgacgaggtagacatatctaaatacgacaaatcccaatccacgttcacaaaa
+1fr: ·F··N··C··D··E··V··D··I··S··K··Y··D··K··S··Q··S··T··F··T··K·
+2fr: ·S··I··V··T··R··*··T··Y··L··N··T··T··N··P··N··P··R··S··Q··K·
+3fr: ·Q··L··*··R··G··R··H··I··*··I··R··Q··I··P··I··H··V··H··K··S·

DNA: gccgtagaattggaaatctacaggaggttaggtttaccagaaaagattcttcaagtctgg
+1fr: ·A··V··E··L··E··I··Y··R··R··L··G··L··P··E··K··I··L··Q··V··W·
+2fr: ·P··*··N··W··K··S··T··G··G··*··V··Y··Q··K··R··F··F··K··S··G·
+3fr: ·R··R··I··G··N··L··Q··E··V··R··F··T··R··K··D··S··S··S··L··G·

DNA: gcagccagcgagttctttggcaaagctgttactaataagaggtcattttctgcggaggtg
+1fr: ·A··A··S··E··F··F··G··K··A··V··T··N··K··R··S··F··S··A··E··V·
+2fr: ·Q··P··A··S··S··L··A··K··L··L··L··I··R··G··H··F··L··R··R··C·
+3fr: ·S··Q··R··V··L··W··Q··S··C··Y··*··*··E··V··I··F··C··G··G··V·

DNA: tatgcccaacgtcgcacaggtgctgcgaatacgtggataggaaacactgtaatcaacatg
+1fr: ·Y··A··Q··R··R··T··G··A··A··N··T··W··I··G··N··T··V··I··N··M·
+2fr: ·M··P··N··V··A··Q··V··L··R··I··R··G··*··E··T··L··*··S··T··*·
+3fr: ·C··P··T··S··H··R··C··C··E··Y··V··D··R··K··H··C··N··Q··H··D·

DNA: atgttgctttcacagagtgtagacgtgacatcattgaacgcagtctgttttgccggtgat
+1fr: ·M··L··L··S··Q··S··V··D··V··T··S··L··N··A··V··C··F··A··G··D·
+2fr: ·C··C··F··H··R··V··*··T··*··H··H··*··T··Q··S··V··L··P··V··M·
+3fr: ·V··A··F··T··E··C··R··R··D··I··I··E··R··S··L··F··C··R··*··*·

DNA: gactcactgattctcaagaaaggtgttcctggcgttaatttygatgtctacgatttgaag
+1fr: ·D··S··L··I··L··K··K··G··V··P··G··V··N··F··D··V··Y··D··L··K·
+2fr: ·T··H··*··F··S··R··K··V··F··L··A··L··I··X··M··S··T··I··*··S·
+3fr: ·L··T··D··S··Q··E··R··C··S··W··R··*··F··X··C··L··R··F··E··V·

DNA: tatgagttcgatgtcaaatactttgattgtgcctccaaatatttttgtggtaagttttta
+1fr: ·Y··E··F··D··V··K··Y··F··D··C··A··S··K··Y··F··C··G··K··F··L·
+2fr: ·M··S··S··M··S··N··T··L··I··V··P··P··N··I··F··V··V··S··F··*·
+3fr: ·*··V··R··C··Q··I··L··*··L··C··L··Q··I··F··L··W··*··V··F··N·

DNA: attgaaaactcgggaaagattaaagtgatgcctgatccttttaaaatttttgtgaagttc
+1fr: ·I··E··N··S··G··K··I··K··V··M··P··D··P··F··K··I··F··V··K··F·
+2fr: ·L··K··T··R··E··R··L··K··*··C··L··I··L··L··K··F··L··*··S··S·
+3fr: ·*··K··L··G··K··D··*··S··D··A··*··S··F··*··N··F··C··E··V··R·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

```
DNA: ggtaaagaacgaccggaaacagataagattttgttggagtcagtggcagtccttttctga
+1fr: ·G··K··E··R··P··E··T··D··K··I··L··L··E··S··V··A··V··L··F··*·
+2fr: ·V··K··N··D··R··K··Q··I··R··F··C··W··S··Q··W··Q··S··F··S··D·
+3fr: ·*··R··T··T··G··N··R··*··D··F··V··G··V··S··G··S··P··F··L··I·


DNA: ttcgggccgaagcttacacttcggacgcgaaca
+1fr: ·F··G··P··K··L··T··L··R··T··R··T·
+2fr: ·S··G··R··S··L··H··F··G··R··E·
+3fr: ·R··A··E··A··Y··T··S··D··A··N·
```

ภาพที่ 30 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์ผลการทดลอง

ตรวจสอบการระบาดของโรคเหี่ยวสับปะรดที่เกิดจากเชื้อไวรัสในประเทศไทย

จากการสำรวจโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทยในแต่ละพื้นที่ได้แก่ ภาคเหนือประกอบไปด้วยจังหวัด เชียงราย ลำปาง และอุตรดิตถ์ ภาคตะวันออก ประกอบไปด้วยจังหวัดชลบุรี ภาคตะวันตกประกอบไปด้วยจังหวัดเพชรบุรี และภาคใต้คือด้วยจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบสับปะรดแสดงอาการของโรคเหี่ยวในลักษณะที่คล้ายกันในทุกพื้นที่ที่ทำการตรวจสอบ ได้แก่ อาการใบแดง ใบด่าง ลำต้นเหี่ยว และลำต้นแคระแกร็น โดยลักษณะอาการที่พบได้โดยทั่วไปคือ อาการใบแดง สุ่มเก็บตัวอย่างต้นสับปะรดในแต่ละพื้นที่นำมาตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าเชื้อไวรัส PMaV1 และ PMWaV 2 ในทุกภาคของประเทศไทยที่มีการปลูกสับปะรดและสามารถพบเชื้อไวรัส PMWaV ได้ทุกพันธุ์ที่ปลูก ได้แก่พันธุ์ปัตตาเวีย พันธุ์ห้วยมุ่น และพันธุ์นางแล ลักษณะการแสดงออกของโรคนั้นคล้ายคลึงกันในทุกภาค โดยสับปะรดที่ถูกเชื้อไวรัส PMWaV1 เข้าทำลายเพียงชนิดเดียวจะไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวให้เห็น แต่ในต้นสับปะรดที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวชัดเจนพบว่า เมื่อตรวจด้วยสอบด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าให้ผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ทั้ง 2 ชนิด (Sheter และ Hu, 2002)

ตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากเชื้อไวรัสในประเทศไทยด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, PMWaV4 และ PMWaV5 พบว่าในประเทศไทยพบเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวได้ในสับปะรดเพียงแค่ 2 ชนิดคือ PMWaV1 และ PMWaV2 ยังไม่มีการตรวจพบเชื้อไวรัสสายพันธ์อื่น ๆ ที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของสับปะรดภายในประเทศไทย

การสำรวจแปลงปลูกสับปะรด ณ จังหวัดชลบุรีและจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

จากการสำรวจแปลงปลูกสับปะรดในแปลงปลูกทั้ง 2 จังหวัดพบว่า มีอาการคล้ายลักษณะของอาการของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม Closterovirus ได้แก่ Pinapple Mealybug Wilt-assiciated Virus 1 และ Pinapple Mealybug Wilt-assiciated Virus 2 เชื้อทั้งสองชนิดนี้ก่อให้เกิด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาการเบื้องต้นได้แก่ ปลายใบแห้งตาย (Tip dieback) อาการใบแดง (Reddening leaves) ขอบใบโค้งงอเป็นหยัก (Downward curling leaves) อาการใบเหี่ยว (Wilting leaves) และอาการลำต้นแคระแกร็น (Dwaft) ซึ่งสับปะรดที่พบอาการเหล่านี้เมื่อนำมาตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าต้นสับปะรดที่มีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส PMWaV1 เพียงชนิดเดียวนั้นไม่มีการพัฒนาอาการของโรคให้เห็น แต่เมื่อตรวจต้นสับปะรดที่มีการเข้าทำลายร่วมกันระหว่างเชื้อ PMWaV1 ร่วมกับ PMWaV2 และ PMWaV2 เพียงชนิดเดียว ต้นสับปะรดเหล่านั้นแสดงอาการของโรคเหี่ยวให้เห็นอย่างชัดเจน ซึ่งจากลักษณะดังกล่าวตรงกับรายงานของ (Sheter และ Hu, 2002) พบว่าเมื่อมีการตรวรสอบตัวอย่างที่มีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส PMWaV2 ก็จะแสดงอาการของโรคได้ โดยเชื้อไวรัสจะเกี่ยวข้องกับการพัฒนาอาการของโรค รายงานการทดลองนี้พบว่าเมื่อเก็บตัวอย่างที่มีการเข้าทำลายทั้งเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ก็จะแสดงอาการของโรคให้เห็นเช่นกัน แต่ลักษณะอาการของโรคนั้นไม่ได้มีการพัฒนาโดยต้นสับปะรดนั้นปราศจากไวรัสทั้ง 2 ชนิดหรือพบเพียงเชื้อไวรัส PMWaV1 เพียงชนิดเดียว Sheter และ Hu, (2002) ได้ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทดลองโดยปล่อยเพลี้ยแป้งจำนวน 100 ตัวลงไปในต้นสับปะรดที่ปลอดโรค สับปะรดที่ถูกเชื้อไวรัส PMWaV2 และ PMWaV1 ร่วมกับ PMWaV2 จะแสดงอาการของโรคตั้งแต่ใบอ่อนของต้นภายใน 4-7 สัปดาห์ ซึ่งตรวจสอบโดยใช้เทคนิค RT-PCR

อาการของโรคเหี่ยวนั้นจะส่งผลกระทบทำให้ผลสับปะรดมีขนาดเล็กลง ผลสุกเร็วกว่ากำหนด หรืออาจจะไม่ให้ผลเลย ต้นสับปะรดที่ติดเชื้อจะให้หน่อขยายพันธุ์ที่มีขนาดเล็กตามไปด้วย เมื่อติดเชื้อไวรัส PMWaV1 ร่วมกับ PMWaV2 และ PMWaV2 เพียงชนิดเดียว เมื่อนำส่วนขยายพันธุ์ที่ติดเชื้อไปปลูกก็จะเป็นการแพร่ระบาดออกไป ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญมากในแปลงปลูก (Sheter และ Hu, 2002)

จากการตรวจสอบเชื้อไวรัสในงานทดลองนี้ได้มีการใช้เทคนิค RT-PCR โดยมีการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน Coat Protein ซึ่งได้ฐานข้อมูลลำดับเบสจาก Genbank (JN995532 และ EU769116) พบว่าไพรเมอร์มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ซึ่งสามารถใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคเหี่ยวของสับปะรดได้ทั้งในหน่อ จุก ใบ จากต้นสับปะรดที่ขยายพันธุ์ผ่านทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และเพลี้ยแป้ง ต้นสับปะรดที่แสดงอาการโรคเหี่ยวนั้นสามารถตรวจพบเชื้อไวรัส PMWaV2 ได้ทุกตัวอย่างที่นำมาตรวจและในบางครั้งอาจพบเชื้อไวรัส PMWaV1 เข้าร่วมด้วย แต่จะพบเชื้อไวรัส PWaV1 เพียงชนิดเดียวในต้นที่ไม่แสดงอาการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของโรคเหี่ยว นอกจากการตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR แล้ว ยังมีเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้อีกเช่น เทคนิค TBIA (Tissue Blotting Immuno Assay), ISEM (Immuno Scanning Electron Microscopy), ELISA (Enzym-linked Immuno Sorbent Assay), Northern Hybridization Assay อีกด้วย

จากการสำรวจแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดชลบุรี พบว่ามีมดกระจายตัวอยู่ทั่วไปในแปลงสับปะรดที่มีการระบาดของโรคเหี่ยว ซึ่งจากรายงานพบว่ามดมีความเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายของเพลี้ยแป้งในแปลงปลูกสับปะรด โดยมดจะใช้ประโยชน์จากน้ำหวานที่เพลี้ยแป้งสร้างขึ้นและมดสามารถนำพาเพลี้ยแป้งจากต้นสับปะรดที่เป็นโรคไปยังต้นที่ไม่เป็นโรคได้ ซึ่งทำให้มีการแพร่ระบาดและขยายเป็นวงกว้างมากขึ้นภายในแปลงปลูก การควบคุมโรคนั้นทำได้โดยการควบคุมและกำจัดปริมาณมดภายในแปลงปลูก ซึ่งปริมาณของมดจะแปรผันตรงกับปริมาณของเพลี้ยแป้ง (Rohrback, 1988)

การตรวจนับเพลี้ยแป้งในแปลงปลูกพบว่าแปลงปลูกสับปะรดพบว่า เพลี้ยแป้งจะระบาดมากในช่วงที่สภาพอากาศค่อนข้างแห้งและไม่มีฝนตก ซึ่งการตรวจพบเพลี้ยแป้งบนต้นสับปะรดนั้นจะพบว่า ต้นสับปะรดที่ถูกดูดกินน้ำเลี้ยงจากเพลี้ยแป้งจะมีอาการโทรมให้เห็นอย่างชัดเจนและมีอาการของโรคเหี่ยวให้เห็นร่วมด้วย เมื่อนำต้นสับปะรดที่ถูกดูดน้ำเลี้ยงด้วยเพลี้ยแป้งมาตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ให้ผลบวกทั้ง 2 ชนิด (Carter, 1963) การพบเพลี้ยแป้งในแปลงปลูกนั้นเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโรคเหี่ยวของสับปะรดซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส โดยที่เพลี้ยแป้งจะมีการดูดกินน้ำเลี้ยงจากต้นสับปะรดที่ติดเชื้อและสามารถถ่ายเชื้อไปยังต้นอื่น ๆ ได้โดยอาการจะแสดงให้เห็นที่ใบใหม่ที่แตกออกมาจาก และต้นที่ถูกดูดกินน้ำเลี้ยงจะพบอาการจุดขียว (Green spotting) เข้าร่วมด้วยซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากการดูดน้ำเลี้ยงของเพลี้ยแป้งไม่ใช่จากเชื้อไวรัส

จากการทดลองนี้พบว่าในช่วงเดือนมีนาคมของปีจะพบอาการของโรคเหี่ยวที่เกิดจากเชื้อไวรัสรุนแรงที่สุดและเมื่อกลับไปสำรวจอีกครั้งในตั้งแต่เดือนสิงหาคมเป็นต้นไปพบว่าอาการดังกล่าวลดน้อยลง ต้นสับปะรดแข็งแรงมากขึ้น Sheter และ Hu, (2002) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากพืชมีกระบวนการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในขณะที่ปรากฏอาการและนำไปสู่กระบวนการยับยั้งการแสดงอาการของโรคเหี่ยว ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ อายุของพืช จำนวนเพลี้ยแป้ง ปริมาณของไวรัส หรือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการแสดงออกของโรค ซึ่งทำให้พืชมีกระบวนฟื้นตัวเองจากอาการของโรคเหี่ยวสับปะรด

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเกิดโรค รวมถึงประชากรของเพลี้ยแป้ง ชนิดพันธุ์ของสับปะรด พื้นที่ปลูกสับปะรด โดยทั่วไปการปลูกสับปะรดส่วนมากจะเป็นการปลูกแบบชั่วคราว ดินจึงเป็นปัจจัยที่มีผลน้อยที่สุดกับการเกิดโรค Corbett และ Pagden, (1941) การระบาดของโรคเหี่ยวสับปะรดสมารถแพร่ได้ดีกว่าในพื้นที่ปลูกที่ปืนดินทราย เนื่องสภาพของดินมีความเหมาะสมต่อการอาศัยของเพลี้ยแป้งได้ดีกว่าดินร่วน ในขณะที่ดินที่มีธาตุอาหารสูงก็ยังพบต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวอยู่ ในทางเดียวกันทางตะวันออกของแอฟริกา ดินที่ขาดธาตุอาหาร อยู่ในช่วงฝนตก และอุณหภูมิสูง อาการของโรคเหี่ยวของสับปะรดก็ถูกจำกัดโดยปัจจัยที่กล่าวมา ทำให้การเกิดโรคนั้นต่ำลงไปด้วย

Carter, (1942) ในช่วงอุณหภูมิต่ำมีผลต่อการลดจำนวนประชากรของเพลี้ยแป้ง และในช่วงที่อุณหภูมิสูงขึ้นประชากรของเพลี้ยแป้งจะเพิ่มขึ้น อัตราการเกิดโรคจึงสูงขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่ช่วงที่ฝนตกหนักจะทำให้ประชากรบนใบลดลง แต่จะทำให้เพลี้ยแป้งนั้นเข้าไปอยู่บริเวณกาบใบและเพิ่มปริมาณตัวเองทำให้จำนวนปริมาณของเพลี้ยแป้งเพิ่มมากขึ้น ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมานั้นก็ให้เกิดอัตราการเกิดโรคน้อยที่สุด Jepson และ wishy, (1939) รายงานว่าเพลี้ยแป้งนั้นอาศัยอยู่ในสับปะรดได้เป็นระยะเวลานานก่อนที่สับปะรดจะแสดงอาการและแพร่กระจายไปยังพื้นที่อื่นๆ เดือนสิงหาคมในประเทศไต้หวันมีการปลูกสับปะรดมากที่สุดเนื่องจากเป็นช่วงหน้าแล้ง ซึ่งในระหว่างนี้ประชากรของเพลี้ยแป้งมีการเพิ่มประชากรอย่างรวดเร็วและต่อเนื่องไปจนถึงฤดูฝนและจะลดลง เมื่อถึงฤดูร้อนในปีถัดไปประชากรของเพลี้ยแป้งก็จะเพิ่มปริมาณเป็นทวีคูณและจะเกิดเช่นนี้อยู่เสมอ

จากผลการทดลองจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และจังหวัดชลบุรีอาการไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดที่ปลูกในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์มีลักษณะอาการใบด่างเพิ่มมากขึ้นซึ่งได้มีการศึกษาสำรวจลักษณะอาการตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์ จนถึงเดือน พฤศจิกายน 2553 และสภาพอุณหภูมิในระหว่างเดือนในแปลงปลูกจะอยู่ในช่วง 27°C - 30°C ลักษณะอาการใบแดงจะลดลงตั้งแต่เดือนมิถุนายนจนถึงเดือนพฤศจิกายน ส่วนอาการใบเหี่ยวและอาการต้นแคระแกรนนั้นจะสำรวจพบได้ตั้งแต่ในเดือนตุลาคมถึงเดือนพฤศจิกายน และจากการสำรวจในครั้งนี้พบว่าลักษณะอาการใบเหี่ยว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และอาการต้นแคระแกรนจะแสดงอาการได้ต้องมีอุณหูมิ $\geq$ 27°C ซึ่งจากการพบลักษณะอาการที่เพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากในช่วงเดือน กันยายนเป็นต้นไปซึ่งเป็นช่วงที่เกษตรกรมีการหยอดแก๊ส (เอทิฟอน) เพื่อให้สับปะรดมีการพัฒนาเพื่อสร้างผล และพืชอาจมีการอ่อนแอทำให้ไวรัสสามารถพัฒนาอาการได้มากขึ้นและมีอาการที่รุนแรงมากขึ้น ส่วนปริมาณความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศจะอยู่ในช่วง 71-81 และจากการสำรวจพบลัษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวทั้ง 4 อาการจะมีความชื้นสัมพัทธ์ค่อนข้างสูงโดยจะพบในเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน เช่นเดียวกับค่าปริมาณน้ำฝนและปริมาณแสงต่อวัน พบว่าในช่วงปลายฤดูฝน (กันยายนถึงตุลาคม) จะพบลักษณะอาการของโรคเหี่ยวที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องโดยในช่วงที่ปลายฤดูฝนเข้าสู่ต้นฤดูหนาวจะสำรวจพบลักษณะอาการของโรคทั้ง 4 อาการ อาจเนื่องมาจากสภาพภูมิอากาศในช่วงที่กล่าวมานี้เหมาะสมต่อการพัฒนาลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทยที่ปลูกในแถบจังหวัดภาคใต้

การสำรวจลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่ปลูกในเขตภาคตะวันออกคือจังหวัดชลบุรีในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนพฤศจิกายน 2553 และเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนสิงหาคม 2554 ซึ่งจากการสำรวจลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดพบว่าสับปะรดจะแสดงลักษณะอาการใบแดง (Reddening leaves) อาการเหี่ยว (wilt) อาการใบด่าง (mottling leaves) และอาการต้นแคระแกรน (dwaft) ในช่วงปลายฤดูฝนจนถึงต้นฤดูหนาวเหมือนกับการสำรวจในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ แต่ในแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดชลบุรีพบว่าในช่วงฤดูร้อนสับปะรดจะแสดงอาการที่รุนแรงได้เช่นเดียวกับช่วงปลายฤดูฝนจนถึงต้นฤดูหนาว คือในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนเมษายน โดยอุณหภูมิเฉลี่ยอยู่ในช่วง 27°C - 29°C และข้อสังเกตที่พบคือในช่วงฤดูร้อน (เดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคม) สับปะรดจะแสดงอาการใบแดงในปริมาณมากขึ้นโดยมีปริมาณความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 74-75 แต่ในช่วงฤดูฝน (เดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม) จะไม่พบลักษณะอาการต้นแคระแกรนในแปลงปลูกสับปะรด และลักษณะอาการอื่นๆก็ลดน้อยลงด้วยเช่นเดียวกัน โดยในช่วงเดือนเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม จะพบว่ามีปริมาณน้ำฝนและปริมาณแสงต่อวัน ที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่าในแต่ละช่วงฤดูกาลการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ปริมาณน้ำฝน และปริมาณแสงต่อวัน นั้นจะมีผลต่อการพัฒนาลักษณะอาการของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยที่เอื้อต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อในต้นสับปะรดด้วย ซึ่งผลการทดลองตรงกับที่ได้มีการรายงานไว้ข้างต้น และอีกเหตุหนึ่งที่ต้นสับปะรดแสดงอาการของโรคน้อยลงเป็นเพราะแปลงปลูกสับปะรดจังหวัดชลบุรีไม่มีการหยอดแก๊ส (เอทิฟอน) เพื่อบังคับให้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สับปะรดออกดอกพร้อมกัน สับปะรดในแปลงปลูกนี้จึงไม่แสดงอาการที่บ่งชี้ว่าเป็นโรคเหี่ยวให้เห็นอย่างชัดเจนเช่นเดียวกับแปลงปลูกในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดโดยเพลี้ยแป้งสับปะรด

เก็บตัวอย่างหน่อสับปะรดจากต้นที่ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวสับปะรดที่มีน้ำหนักประมาณ 400-600 กรัม จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งเป็นหน่อขนาดกลางที่นิยมใช้ในการปลูกสับปะรดอุตสาหกรรมเพื่อนำมาปลูกเป็นพืชทดสอบในโรงเรือนและนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 90 วัน เพื่อยืนยันความปลอดเชื้อไวรัสก่อนนำไปทำการปลูกเชื้อด้วยแมลง นำเพลี้ยแป้งที่ผ่านการดูดน้ำเลี้ยงจากต้นสับปะรดที่มีเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 อยู่ ทำการปลูกเชื้อลงบนต้นสับปะรดที่ปลอดโรคเพื่อหาจำนวนเพลี้ยแป้งที่น้อยที่สุดที่สามารถก่อให้เกิดโรคกับหน่อสับปะรดขนาดกลางได้ โดยใช้เพลี้ยแป้งเริ่มต้นที่ 1,3,5 และ 7 ตัว ตามลำดับ หลังจากแมลงได้มีการถ่ายทอดเชื้อไวรัสให้กับต้นสับปะรดแล้วเป็นเวลา 4 เดือน ตรวจสอบหาเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า สับปะรดเริ่มติดเชื้อไวรัสโดยให้ผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ตั้งแต่การปล่อยแมลงลงบนต้นสับปะรดที่ปลอดเชื้อจำนวน 5 ตัว และ 7 ตัว แต่ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยปล่อยลงบนต้นสับปะรดที่ปลอดเชื้อจำนวน 1 และ 3 ตัว หลังจากการถ่ายทอดโรคสับปะรดเป็นเวลา 3 เดือนต้นสับปะรดเริ่มแสดงอาการเหี่ยวและอาการลำต้นแคระแกร็นให้เห็น

S.J. Singh , (1996) ทำการทดลองการถ่ายทอดเชื้อไวรัส PMWaV ผ่านทางเพลี้ยแป้งสับปะรดและเพลี้ยแป้งสีเทา (*Dysmicoccus Brevipes*. และ *Dysmicoccus Neobrevipes*.) โดยการปล่อยเพลี้ยบนต้นสับปะรดที่โตเต็มที่ซึ่งเป็นต้นที่ปราศจากเชื้อไวรัส PMWaV พบว่าเพลี้ยแป้งจำนวน 20 ตัว สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัส PMWaV ได้และจะแสดงอาการของโรคให้เห็นหลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 50-60 วัน ต้นสับปะรดที่โตเต็มที่และพร้อมให้ผลผลิตจะมีน้ำหนักประมาณ 2500 – 2800 กรัม (กรมวิชาการเกษตร, 2541) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าจำนวนเพลี้ยแป้ง ขนาดและอายุของต้นสับปะรดมีผลต่อการถ่ายทอดโรค จำนวนเพลี้ยแป้งที่น้อยสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสให้กับต้นสับปะรดที่มีอายุน้อยได้ ในทางกลับกันจำนวนเพลี้ยแป้งที่น้อยนั้นไม่สามารถถ่ายยทอดเชื้อไวรัสให้กับต้นสับปะรดที่มีอายุมากและขนาดใหญ่กว่าได้ เนื่องมาจากปริมาณไวรัสนั้นไม่มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาณมากพอที่จะก่อให้เกิดโรคกับพืชได้ ดังนั้นการทดลองจึงสอดคล้องกับงานทดลองของ S.J. singh

การถ่ายทอดไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดผ่านการขยายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการเก็บตัวอย่างของสับปะรดที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวให้เห็นในแปลงปลูกได้แก่ อาการใบแดง ใบด่าง เหี่ยว และลำต้นแคระแกร็น ภายในแปลงปลูกมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้บริเวณตาของหน่อสับปะรด ซึ่งเป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการขยายพันธุ์ของพืชชนิดนนี้ โดยก่อนทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้มีการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค RT-PCR เพื่อยืนยันการติดเชื้อของหน่อสับปะรด จากนั้นนำหน่อที่ตรวจพบว่ามีการติดเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต่อไป

เมื่อต้นสับปะรดผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและมีขนาดของต้นสับปะรดประมาณ 4 นิ้ว จึงนำมาตรวจสอบการถ่ายทอดโรคผ่านทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าสับปะรดที่มีการเจริญมาจากตามีการถ่ายทอดเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 โดยอัตราการถ่ายทอดโรคนั้นจะเกิดขึ้นสูงเมื่อทำการตรวจสอบต้นสับปะรดที่เจริญออกมาจากตาโดยตรง แต่อัตราการถ่ายทอดเชื้อนั้นเกิดน้อยลงเมื่อตรวจสอบต้นสับปะรดที่ผ่านการ Subculture จากแคลลัสมากกว่า 1 ครั้งขึ้นไป

Thomas et al., (1995) ได้ทำการทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัส Banana Bunchy Top Virus (BBTV) ที่ก่อให้เกิดโรคยอดกระจุกของกล้วยพันธุ์เล็บมือนาง (Lady's finger banana) ผ่านทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการเก็บตัวอย่างของกล้วยในแปลงปลูกที่แสดงอาการโรคที่ถูกเชื้อไวรัส BBTV เข้าทำลายและนำมาตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยเทคนิค Sandwich ELISA โดยใช้ Monoclonal ชนิด BT-1 และ BT-2 ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส BBTV ก่อนนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ เมื่อเพาะเลี้ยงกล้วยในห้องปฏิบัติการกระทั่งมีอายุประมาณ 15 เดือน จึงนำมาตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสอีกครั้งด้วยเทคนิค ELISA พบว่าเชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดไปยังกล้วยที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างรวดเร็ว ต้นกล้วยที่อยู่ภายในหลอดอาหารแสดงอาการของโรคให้เห็นอย่างชัดเจนได้แก่ อาการลำต้นแคระแกร็น ใบม้วนงอ ใบมีรอยขีดสีเขียว อาการรอยขีดสีดำบนใบแก่ และรากมีปริมาณน้อย ยังสามารถตรวจพบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ในต้นกล้วยที่ไม่แสดงอาการให้เห็นอีกด้วย หลังจากการ subculture ทั้งหมด 7 ครั้งพบว่าต้นกล้วยที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เลี้ยงไว้ในหลอดอาหารไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสให้เห็นและเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA พบว่าให้ผลที่เป็นลบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง แต่ในการทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัส PMWaV โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อในสับปะรดทำการ Subculture เพียง 3 ครั้งจึงยังทำให้ต้นสับปะรดที่ได้นั้นยังไม่ปราศจากเชื้อไวรัสอย่างสมบูรณ์ และยังมีถ่ายทอดเชื้อไวรัสอยู่

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นสามารถทำพืชให้ปลอดจากเชื้อไวรัส แบคทีเรีย และเชื้อรา โดยการส่วนที่เรียกว่า “Meristem” ซึ่งเป็นส่วนเนื้อเยื่อเจริญที่ยังไม่มีการพัฒนาท่อน้ำ ท่ออาหาร การใช้เนื้อเยื่อบริเวณนี้นำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้พืชที่ได้นั้นปลอดเชื้อ การนำเนื้อเยื่อบริเวณนี้ไปเพาะเลี้ยงต้องผ่านการตัดภายใต้กล้องที่มีกำลังขยายสูงและควรตัดให้ขนาดของชิ้นเนื้อเยื่อเจริญมาขนาดเล็กพอที่จะสามารถนำไปวางบนอาหารและสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ (Miasar et at., 2011)ได้ทำการทดสอบผลิตมันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* L.) ให้ปลอดจากชื้อไวรัสและเชื้อไวรอยด์ได้แก่ Potato Leaf Roll Virus (PLRV), Potato Virus A (PVA), Potato Virus M (PVM), Potato Virus S (PVS), Potato Virus X (PVX), Potato Virus Y (PVY) และ Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) โดยเก็บมันฝรั่งที่ปลูกในแปลที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสและไวรอยด์ทั้งหมด 210 ตัวอย่างโดยแบ่งเป็น 3 พื้นที่ พื้นที่ละ 70 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบหาเชื้อไวรัสและไวรอยด์ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้ Monoclonal ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสและไวรอยด์ที่กล่าวมา พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับเชื้อไวรัส PVY จำนวน 21.4%, 15.7% และ 12.8% จากนั้นนำตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการใช้ Meristem จากยอดของต้นมันฝรั่งไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร Murashige and skoog โดยไม่มีการเติมฮอร์โมน เมื่อต้นมันฝรั่งมีอายุได้ 4 เดือนจึงย้านลงบนอาหารที่มีการ (0.5mg/L) Napthalene acetic acid และ (0.5mg/L) Idole butylic acid เพื่อชักนำให้เกิดการพัฒนาของรากและลำต้น เลี้ยงต้นมันฝรั่งต่อไปอีก 5 สัปดาห์จึงนำไปตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่ามันฝรั่งที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อผ่าน Meristem นั้นให้ผลเป็นลบต่อไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PVY อีกทางหนึ่งที่สามารถผลิตพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสนั้นทำได้โดยการคัดเลือกพืชที่ปราศจากไวรัส รวมไปถึงการใช้ความร้อน (Heat theraoy) เพื่อทำลายเชื้อไวรัสในส่วนขยายพันธุ์ก่อนนำมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Ramos and Zamora, 1990) โดยความร้อนที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถทำลายเชื้อไวรัสได้และยังคงไม่ทำให้เนื้อเยื่อพืชเสียหายคือ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 50 องศาสเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Ullman et at., 1991)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบ partial genome ของเชื้อไวรัส PMWaV1

การจำแนกลักษณะเฉพาะของไวรัส PWaV1 ใช้หลายตัวแปรในการจำแนกชนิดและคุณลักษณะเฉพาะจากกลุ่มของ Ampelovirus โดยมีพื้นฐานมาจาก partial sequence ที่มีรายงานไว้ใน Genbank ซึ่งในปัจจุบันนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์จีโนมของ plum bark necrosis stem pitting associated virus (PBNSPaV) มีค่าความเหมือนที่ใกล้เคียงกับ PWaV1 และบางตำแหน่งมีการ share นิวคลีโอไทด์ร่วมกันแต่ไม่ใช่ทั้งหมด (Alwahnih *et al.,* 2007) โดยพบลักษณะเฉพาะของตำแหน่ง intergenic region ระหว่างยีน RdRp และยีน p6 ORF1 ของ genus Ampelovirus แต่ไม่พบใน PWaV1 (Karasev, 2000) เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน CP CPm และ Hsp70h ของไวรัส PWaV3 และไวรัสอื่นๆที่อยู่ในกลุ่ม Ampelovirus พบว่ามีค่าความแตกต่างกันร้อยละ 10 (Buchen-Osmond, 2008) โดยทั่วไปล้วยีน Hsp70h จะมีตำแหน่ง conserve กับ ORF ของไวรัสในกลุ่ม Ampelovirus ค่าความเหมือนของยีน Hsp70h ที่สมบูรณ์ของไวรัส PMWaV1, PMWaV2, PMWaV4 และPatial gene ของ PMWaV5 มีความเหมือนกับ PMWaV3 อย่างน้อย 72 % ซึ่งข้อเท็จจริงดังกล่าวทำสัณนิฐานได้ว่า PMWaV3 เป็นไวรัสสายพันธุ์ใหม่ (Sether et. Al., 2009) โดย MTR region ของ PMWaV3 จะแบ่งปันค่าความเหมือนกับเชื้อไวรัส PMWaV1 58% และ 44% กับเชื้อไวรัส PMWaV2 ซึ่ง ORF1 มีความเกี่ยวข้องกับ +1 ribosomal frame shift ในเชื้อไวรัส PMWaV1 (Melzer et. At., 2008)

จากรายงานพบว่า ORF1 A จะมีจุดซ้อนทับ ORF1 B ซึ่งมีกรดอะมิโนที่ตรงกันมีจำนวน 525 อะมิโนแอซิดและบริเวณตำแหน่งนี้มีค่าความเหมือน 93.3% - 99% และเมื่อเปรียบเทียบแล้วพบว่ามีค่าความเหมือนกับเชื้อไวรัส PMWaV3 ที่มีรายงานในประเทศออสเตเรีย ซึ่งค่าความเหมือนของกรดอะมิโนของไวรัสกลุ่ม Ampelovirus โดยเฉพาะตำแหน่ง MTR HEL และ RdRp น้อยกว่า 74% และมีค่าความเหมือนน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับเชื้อไวรัส PMWaV2 เชื้อไวรัส PBNSPaV เป็นไวรัสเพียงชนิดเดียวที่อยู่ใน Ampelovirus ที่มีตำแหน่งทับซ้อนกับเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 (Alwahnih *et al.,* 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผลการทดลอง

การสำรวจการระบาดโรคเหี่ยวของสับปะรดและการระบาดของเพลี้ยแป้งซึ่งเป็นแมลงพาหะในประเทศไทยได้แก่ ภาคเหนือ ประกอบไปด้วยจังหวัด เชียงราย ลำปาง และอุตรดิตถ์ ภาคตะวันออก ประกอบไปด้วยจังหวัดชลบุรี ภาคตะวันตกประกอบไปด้วยจังหวัดเพชรบุรี และภาคใต้ประกอบไปด้วยจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พบการระบาดของโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* 1 และ *Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus* 2 ในทุกพื้นที่ที่ทำการตรวจสอบโดยสามารถพบอาการที่บ่งชี้ลักษณะของโรคเหี่ยวได้แก่ อาการใบแดง (Reddening leaves) อาการใบด่าง (Mottling leaves) อาการเหี่ยว (Wilt) อาการลำต้นแคระแกร็น (Dwarft) และเมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสทั้ง 2 ชนิด พบว่าต้นสับปะรดที่แสดงอาการดังกล่าวสามารถตรวจพบเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ได้ทั้ง 2 ชนิด แต่ต้นสับปะรดที่ไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวให้เห็นเมื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าเกิดผลบวกกับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 เพียงชนิดเดียวเท่านั้น การตรวจสอบโรคเหี่ยวของสับปะรดด้วยเทคนิค RT-PCR และการตรวจสอบโรคด้วยตาเปล่า ทำให้ทราบว่าต้นสับปะรดที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวนั้นเกิดจากการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดคือ PMWaV1 และ PMWaV2 แต่ต้นสับปะรดจะไม่แสดงอาการของโรคเหี่ยวให้เห็นเมื่อมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส PMWaV1 เพียงชนิดเดียว อีกกรณีหนึ่งที่บ่งชี้ว่าเป็นอาการของโรคเหี่ยวนั้นจะแสดงให้เห็นได้ชัดเจนในช่วงที่ต้นสับปะรดผ่านการหยอดแก๊สแคลเซียมคาร์ไบด์ หรือ เอทิฟอน อาการดังกล่าวจะชัดเจนมากก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งอาการดังกล่าวมีสาเหตุมาจากพืชเกิดความเครียดหลังจากได้รับการกระตุ้นด้วยแก๊สเอทิลีน และอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อาการของโรคแสดงได้อย่างชัดเจนคือสภาพอากาศของแต่ละพื้นที่ปลูกนั้น ๆ พื้นที่ที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดปีสูง มีความชื้นสัมพัทธ์ต่ำ และมีปริมาณแสงแดดต่อวันสูง อาการของโรคก็จะแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนเช่นอาการของแปลงปลูกสับปะรดในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ในทางเดียวกันในแปลงปลูกสับปะรดจังหวัดชลบุรีมีอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดปีต่ำกว่าจึงส่งผลให้การแสดงออกของอาการโรคเหี่ยวไม่มาก ประกอบกับไม่มีการหยอดแก๊สเอทิฟอนเพื่อเร่งให้สับปะรดออกดอก อาการของโรคจึงไม่แสดงให้เห็นชัดเจนเหมือนกับแปลงปลูกจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรวจสอบการระบาดของเชื้อไวรัส PMWaV1, PMWaV2, PMWaV3, PMWaV4 และ PMWaV5 ด้วยเทคนิค RT-PCR กับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัสทั้ง 5 ชนิด พบว่าในประเทศไทยอาการโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากเชื้อไวรัสมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 เท่านั้น แต่ได้มีการรายงานว่าพบเชื้อไวรัส PMWaV3 (accession number : HE583227) แล้วที่จังหวัดสงขลา ประเทศไทย ซึ่งการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อื่น ๆ พบในประเทศแถบอเมริกากลางและประเทศไต้หวันพบการระบาดของเชื้อไวรัส PMWaV3 และ PMWaV 4 และมีการระบาดของเชื้อ PMWaV5 ในประเทศออสเตเรีย

การสำรวจการระบาดของเพลี้ยแป้งและมดในแปลงปลูกสับปะรดในประเทศไทยพบว่าเพลี้ยแป้งมีการระบาดหนักในช่วงที่อากาศแห้งและไม่มีฝนตกติดต่อกันเป็นเวลานาน การระบาดของเพลี้ยแป้งนั้นมีมดเข้ามาเกี่ยวข้องโดยที่มดจะใช้ประโยชน์จากน้ำหวานที่เพลี้ยแป้งผลิตออกมาและนำพาเพลี้ยแป้งกระจายไปยังบริเวณอื่น ๆ ภายในแปลงปลูกซึ่งเป็นการขยายขอบเขตของโรคเหี่ยวภายในแปลงปลูกให้กว้างมากขึ้น หากต้องการจำกัดขอบเขตและการระบาดของโรคเหี่ยวนั้นสามารถทำได้โดยการควบคุมปริมาณมดและเพลี้ยแป้งภายในแปลงปลูกสับปะรด

ทำการโคลนยีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (Coat protein gene) ทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยใช้เทคนิค RT-PCR ทำการตรวจสอบความจำเพาะของไพรเมอร์พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณของ CP gene ของเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* ทั้ง 2 ชนิด ที่เป็นสาเหตุของโรคเหี่ยวสับปะรดในประเทศไทยได้แถบดีเอ็นเอขนาดเดี่ยวประมาณ 774 คู่เบส และ 909 คู่เบส ของเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จาก RT-PCR เชื่อมต่อเข้ากับพลาสมิด pCR®8/GW/TOPO® ซึ่งเป็น TA cloning vector (Invitrogen™) การเชื่อมผลิตภัณฑ์ RT-PCR กับเวคเตอร์เกิดได้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่ได้หลังจากการทำ RT-PCR จะมีปลายทางด้าน 3' เป็นเบส Adenine ซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ Taq DNA polymerase โดยจะเกิด nontemplate-dependent activity ทำให้มีการเติม deoxyadenosine (A) จำนวน 1 เบส เข้าบริเวณส่วนปลาย 3' ของผลิตภัณฑ์ PCR ส่วนเวคเตอร์จะถูกออกแบบให้มีปลาย 3' เป็น deoxythymidine (T) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR ส่วนของยีน coat protein และ pCR®8/GW/TOPO® สามารถเชื่อกันได้โดยการจับกันของเบส Adenine และ Thymidine ด้วยพันธะฟอสโฟไดเอสเตอร์ (phosphodiester bond)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากนั้นนำพลาสมิด pCR®8/GW/TOPO® ที่ถูกแทรกด้วยยีน coat protein ของไวรัส PWaV1 (TOPO- PWaV1) และ พลาสมิด pCR®8/GW/TOPO® ที่ถูกแทรกด้วยยีน coat protein ของไวรัส PWaV2 (TOPO- PWaV2) เข้าสู่ *E. coli* สายพันธุ์ DH5α โดยวิธี transformation คัดเลือก *E. coli* ที่มีพลาสมิดสายผสม (transformant) ที่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารปฏิชีวะนะ spectinomycin โดยโคโลนีที่ได้รับพลาสมิด TOPO- PWaV1 และ TOPO- PWaV2 จะมีสีขาว ส่วนโคโลนีที่ไม่ได้รับพลาสมิดสายผสมก็จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาตรวจสอบยืนยันว่ามียีน coat protein ของ PWaV1 และ PWaV2 สอดแทรกอยู่จริงโดยนำโคลีนีมาตรวจสอบเบื้องต้นโดยใช้เทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ PMWaV1-CPF และ PMWaV1-CPR ที่จำเพาะต่อ PWaV1 และไพรเมอร์ PMWaV2-CPF และ PMWaV2-CPR ที่จำเพาะต่อ PWaV2 ตามลำดับ และตรวจสอบโดย 1% agarose gel electrophoresis พบว่าได้ผลิตภัณฑ์ PCR ขนาด774 คู่เบส และ 909 คู่เบส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของยีน coat protein ของไวรัส PWaV1 และ PWaV2 ตามลำดับ นำโคโลนีที่มีพลาสมิดสายผสมยีน coat protein แทรกอยู่มาเลี้ยงบนอาหารเหลว 2XYT ที่มีการเติมสารปฏิชีวนะ spectinomycin ข้ามคืน และสกัดพลาสมิดโดยวิธี alkaline lysis method (Birmboim and Doy, 1979) และจากการตรวจสอบใน 1% agarose gel electrophoresis พบว่าพลาสมิด TOPO- PWaV1 มีขนาดประมาณ 3,591 คู่เบส และ พลาสมิด TOPO- PWaV2 มีขนาดประมาณ 3,726 คู่เบส ตามลำดับ จากนั้นตัด พลาสมิด TOPO- PWaV1 และ พลาสมิด TOPO- PWaV2 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoR*I และนำพลาสมิดที่ได้ไปตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี autosequencing (ของบริษัทที่ส่ง sequence) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน coat protein ของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดของประเทศไทยพบว่า มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน coat protein ประมาณ 774 คู่เบส ของไวรัส PWaV1 และในไวรัส PWaV2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน coat protein ประมาณ 909 คู่เบส จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับยีน coat protein ของโรคเหี่ยวสับปะรดที่มีรายงานแล้วใน Genbank โดยใช้โปรแกรม Blast และ Vector NTI 11 (invitrogen) พบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน coat protein ของไวรัส PWaV1 และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน coat protein ของไวรัส PWaV2 ทั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในประเทศไทยกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการรายงานไว้ใน Genbank และยืนยันความถูกต้องของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ เนื่องจากไพรเมอร์ทั้ง 2 ชนิดนั้นต้องใช้ในการตรวจสอบการระบาดของโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย การหาลำดับนิวคลีโอไทด์จึงมีความจำเป็นอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูงเพื่อให้แน่ใจว่าการสังเคราะห์ดีเอ็นเอของไพรเมอร์นั้นสามารถสังเคราะห์ได้ตรงตามยีนเป้าหมายที่ต้องการ

ทดสอบความสามารถของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเพลี้ยแป้งโดยทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่อาศัยอยู่ในเพลี้ยแป้งด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยการใช้ตัวอย่างเพลี้ยแป้งจำนวน 1 ตัว 3 ตัว 5 ตัว และ 7 ตัว ตามลำดับ เพื่อตรวจสอบว่าในเพลี้ยแป้ง 1 ตัวนั้นมีเชื้อสาเหตุของโรคเหี่ยวก่อนนำไปถ่ายเชื้อลงสู่ต้นสับปะรดที่ปลอดโรค การถ่ายทอดโรคผ่านทางเพลี้ยแป้งจำนวน 1 ตัว 3 ตัว 5 ตัว และ 7 ตัว บนหน่อสับปะรดที่ปลอดโรคขนาดกลางน้ำหนัก 400-600 กรัม ซึ่งเป็นขนาดที่นิยมใช้ปลูกในวงการอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋อง พบว่าจำนวนเพลี้ยแป้งที่น้อยที่สุดที่สามารถก่อให้เกิดโรคเหี่ยวได้บนหน่อขนาดกลางคือจำนวน 5 ตัว (ตารางที่ 4) ซึ่งสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ทั้ง 2 ชนิดคือ PMWaV1 และ PMWaV2

ตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* ผ่านทางการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยเก็บตัวอย่างของสับปะรดที่แสดงอาการของโรคเหี่ยวให้เห็นในแปลงปลูก ได้แก่ (Reddening leaves) อาการใบด่าง (Mottling leaves) อาการเหี่ยว (Wilt) อาการลำต้นแคระแกร็น (Dwaft) ภายในแปลงปลูกมาทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้บริเวณตาของหน่อสับปะรด ซึ่งเป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการขยายพันธุ์ของพืชชนิดนนี้ โดยก่อนทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้มีการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค RT-PCR เพื่อยืนยันการติดเชื้อของหน่อสับปะรด จากนั้นนำหน่อที่ตรวจพบว่ามีการติดเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วจึงตรวจสอบการถ่ายทอดโรคจากต้นสับปะรดที่เจริญออกมาใหม่ด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าต้นสับปะรดที่เจริญออกมาใหม่มีการถ่ายทอดเชื้อไวรัสมาจากท่อนพันธุ์เดิม อัตราการถ่ายทอดโรคเกิดขึ้นสูงเมื่อตรวจสอบต้นสับปะรดที่เจริญออกมาจากตาโดยตรง และอัตราการถ่ายทอดโรคจะเริ่มลดลงเมื่อมีการ subculture จากต้นสับปะรดที่แตกออกจากตาโดยตรง หากต้องการให้สับปะรดปลอดจากเชื้อไวรัสควรมีการ subculture มากกว่า 7 ครั้งขึ้นไป (Thomas et al., 1995) ต้นสับปะรดที่ได้จึงจะปราศจากเชื้อไวรัส หรืออีกทางหนึ่งเพื่อการผลิตพืชปลอดโรคควรใช้ส่วนของพืชที่เรียกว่า “Meristem” ซึ่งเป็นส่วนเนื้อเยื่อเจริญที่ยังไม่มีการพัฒนาท่อน้ำ ท่ออาหาร การใช้เนื้อเยื่อบริเวณนี้นำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะทำให้พืชที่ได้นั้นปราศจากเชื้อไวรัสได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2541.**การจัดการโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย.** กองวิจัยการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2520. **การแปรรูปสับปะรด**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

จารุพันธ์ ทองแถม. 2526. **สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

จินดารัฐ วีระวุฒิ. 2541. **สับปะรดและสรีรวิทยาของสับปะรด**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ชำนาญ พิทักษ์, อนุวัฒน์ จันทรสุวรรณ และอรนุช กองกาญจนะ. 2542. **การป้องกันและกำจัดมดในไร่สับปะรด**. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่น ๆ กองกีฏและสัตววิทยา.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2539. **บทปฏิบัติการไวรัสพืชเบื้องต้น**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชัย ก่อประดิษฐ์สกุลชัย และ จารุวรรณ คุณาบุตร. 2546. **เทคโนโลยีการผลิตและการแปรรูปสับปะรด. เทคโนโลยีการผลิตสับปะรดรับรองคุณภาพ**.

วัญเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว:ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. **วารสารโรคพืช 17** (1-2) : 48-53.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิริพรรณ ตันตาคม. 2538. **บทปฏิบัติการแมลงนำโรคมาสู่พืช.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

สุวรรณา กลัดพันธุ์ รุจิพร ประทีปเสน และอุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. 2536. **รายงานผลการวิจัย เรื่อง การสำรวจโรคไวรัสในสับปะรดในประเทศไทย โครงการวิจัย รหัส มผ.5.36**. 11 น.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2543. **การกำหนดเขตเกษตรเศรษฐกิจสำหรับสับปะรดโรงงาน.** กองวิจัยการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สำนักงานเกษตรและสหกรณ์. 2550.**สับปะรดในประเทศไทย.**กองวิจัยการเกษตร สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,หนองคาย.

อัจฉราพร ศรีจุดานุ. 2541.**การตรวจสอบและการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย**.ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alrwahnih, J.K., B.W. Uyemoto and A. Falk. 2007. Molecular characterization and detection of plum bark necrosis stem pitting-associated virus**. Arch Virology** 152:2197-2206**.**

Alrwahnih, J.K.. B.W. Uyemoto, A. Falk. and Rowhani.2006. **Arch Virology**. 152, 2197-2206. doi: 10.1007/s00705-007-1064-4.

Beardsley, J.W. 1993a. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. **Acta-horticulture**. Wageningen: International Society for Horticultural Science. Oct. 1993, 334: 383–386.

Beardsley, J. W. 1993b. Exotic terrestrial arthropods in the Hawaiian Islands: origins and impacts**.** Micronesia. Mangilao: University of Guam. June 1993 (suppl. 4) p. 11–15.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Beardsley, J.W. 1959. On the taxonomy of pineapple mealybugs in Hawaii, with description of previously unnamed species (Homoptera: Pseudococcidae),Proc**. Hawaii Entomology Society. 17: 29-37.**

Bos, L. 1999. Ecology of viruses *in* plant viruses, unique and intriguing pathogens a textbook of plant virology. Backhuys Publishers, Leiden, Netherland.

Buchen-Osmond. 2006. Index of Viruses-Closteroviridae. **ICTCdB-the Universal Virus Database Version 4**., Columbia University, New York, USA

Carter, W. 1963. Mealybug wilt of pineapple; a reappraisal. **Annals of The New York Academy of Sciences** 105: 741–764.

Carter, W. 1951. The feeding sequence of *Pseudococcus brevipes* (CRL) in relation to mealybug wilt of pineapple in Hawaii. **Phytopathology**. 41: 769-793.

Carter, W. 1944a. Some etiological aspects of mealybug wilt. **Phytopathology**. 35: 305-315.

Carter, W. 1944b. The influence of plant nutrition on susceptibility of pineapple plants to mealybug wilt. **Phytopathology**. 35: 316-323.

Carter, W**.** 1934. Mealybug wilt and green spot in Jamaica and Central America. **Phytopathology** 24:424–426.

Carter, W. 1933. The pineapple mealy bug, *Pseudococcus brevipes*, and wilt of pineapples. **Phytopathology.** 23: 213-259.

Carter, W**.** 1933a. The pineapple mealybug*, Pseudococcus brevipes*, and wilt of pineapples. **Phytopathology** 23: 207–242.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Carter, W**.** 1933b. The spotting of pineapple leaves caused by *Pseudococcus brevipes*, the pineapple mealybug. **Phytopathology** 23: 243–259.

Carter, W. 1932. The pineapple mealy bug, *Pseudococcus brevipes*, and wilt of pineapples. **Phytopathology**. 23: 207-213.

Corbett,G.H. and Pagden, H.T. 1941**.** Ethiological and Epidermiological studies on the red leaves of pineapple . **African Crop Scince Journal** Vol.12. No.2

Collins, K.F. Baker, 1993. "Notes on the distribution and ecology of Ananas and Pseudananas in South America", **American Journal of Botany.**

Duval, M.F. and G.C. D' Eeckenbrugge. 1993. Genetic variability in the genus *Ananas*.**Acta Horticulture.** 334: 27-32.

Hu, J.S. and D.M. Sether. 1999a. Etiology of mealybug wilt of pineapple. Page 321 in: **Abstr. Xth Int. Conference Virology**. Sydney, Australia.

Hu, J.S. and D.M. Sether. 1999b. Mealybugs and pineapple mealybug wilt associated virus are both necessary for mealybug wilt (Abstr.). **Phytopathology** 89: S70.

Hu, J.S., D.M. Sether, X.P. Liu and M. Wang. 1997. Use of a tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple Closterovirus in Hawaii. **Plant Disease** .81: 1150-1154.

Hu, J.S., D.M. Sether, and D.E. Ullman. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. **Plant Pathology.** 45: 829–836.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hu, J.S., A. Gonsalves, D. Sether, and D.E. Ullman. 1993. Detection of pineapple closterovirus, a possible cause of mealybug wilt of pineapple. **Acta Horticulture** 334: 411–6.

Hull, R. Matthews and 2002. **Plant Virology**. Fourth edition. Academic Press, Norwich.

Kathryn, L., K. Hester, T. Madhusudhan and J, R, Sikath. 200. Catabolite repression control by Crc in 2xYT Medium is Mediated by Posttranscriptional Regulation of *bkdR* expression in *Pseudomonas putida.* **Journal of Bacteriology** 182(4): 1150-1153.

Karasev, AV. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. **Annual review Phytopathology** 38: 293-324.

Maloy, O.C. and T.D. Murry. 2001. **Encyclopedia of plant pathology**. Volume 1. John Wiley & Sons, Inc. America.

Melzer, D.M. Sether, A.V. Karasev, J.S. Hu.2008. Arch. **Virology**. 153, 704-714 . doi: 10.1007/s00705-008-0051-8.

Melzer, M.J., A.V. Karasev, D.M. Sether and J.S. Hu. 2001**.** Nucleocapside sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associate virus-2.. **J. Gen. Virology**. 82:1-7.

Rohrbach, K.G. Beardsley, J.W. German, T.L. Reimer, N.J. Sanford.1988**. Plant Disease [PLANT DIS.].** Vol. 72, no. 7, pp. 558-565.

Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory. New york.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sether, D.M., and J.S. Hu. 2002. Closterivirus infection and mealybug exposure are necessary forthe development of mealybug wilt of pineapple disease. **Phytopathology** 92: 928-935.

Sether, D.M. 2002. Yield impact and spread of pineapple mealybug wilt associated virus-2 and Mealybug Wilt of pineapple in Hawaii. **Plant Disease**. 86: 867-874.

Sether, D.M., A.V. Karasev, C. Okumura, C. Arakawa, F. Zee, M.M. Kislan, J.L. Busto and J.S. Hu. 2001. Differentiation, distribution, and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. **Plant Disease** 85: 856-864.

Singh, S. J. 1996. Advances in Diseases of Fruit Crops in India. (ed. SinghS. J.) Kalyani **Pineapple diseases**. In :Publishers., pp. 317-330.

Singh, S. J. and Sastry, K. S. M. 1974. Wilt of pineapple: a new virus disease in India**. Indian Phytopathology**., 27: 298-303.

Singh, S. J. and Sastry, K. S. M. 1972. Pineapple mealybug wilt- a new virus disease in India (Abstr.). Proc. III Inter. Symp. on Trop. and Subtrop. Horticulture., Bangalore, p. 125, 1972.

Thomas, J.E., M.K. Smith., A.F Kessling and S.D. Hamill. 1995. Inconsistent Transmission of Banana Bunchy Top Virus in Micropropagated Bananas and its Implication for Germplasm Screening. **Journal of Agriculture** 46, 663-71.

Van Regenmortel, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. Mc Geoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner. 2000. Virus Taxonomy seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Presentation, San Diego. 1162 p

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Walkey, D.G.A. 1991. **Virus transmission by biological means in Applied plant virology**. Second edition. St Edmundsbury Press, Bery St Edmunds, Suffolk, Great Britain.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมของพืชและเชื้อไวรัสด้วย Trizol® Reagent (Life Technology)

<u>การสกัดอาร์เอ็นเอรวม</u>

บดตัวอย่างสับปะรดประมาณ 100 มิลลิกรัมด้วยไนโตรเจนเหลวให้อยู่ลักษณะของผงแป้ง แล้วเติม Trizol® Reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที แล้วเติม Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสนาน 3 นาที หลังจากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บส่วนใสด้านบน แล้วเติม Isopropanal อัตราส่วน 1:1 ของส่วนใส นำไปบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นตกตะกอนอีกรอบที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที ทิ้งส่วนใส แล้วล้างด้วย 70% Ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร 2 ครั้ง แล้วละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ Rnase-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ก1. เพิ่มปริมาณ cDNA ด้วย RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo scientific)

นำอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัด มาทำปฏิกริยา RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV แต่ละสายพันธุ์ (ตารางที่4) โดยใช้ปฏิกริยาดังนี้

RT-PCR profile

dH_2O	6 ไมโครลิตร
Primer Reverse (10 µm)	1 ไมโครลิตร
RNA template	5 ไมโครลิตร

นำไปบ่มในน้ำร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นนำไปแช่น้ำแข็งอีก 5 นาที

ใช้ชุด RevertAid Reverse Transcriptase ความเข้มข้น 100 u/µl

5X M-MuLV RT Buffer	5 ไมโครลิตร
10mM dNTP	2 ไมโครลิตร
RevertAid Reverse Transcriptase	1 ไมโครลิตร

นำไปบ่มในเครื่อง PCR ที่ 42 องศาเซียลเซียสนาน 60 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก1. (ต่อ) การตรวจหาเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ด้วยเทคนิค Duplex RT-PCR

Duplex PCR profile

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป็นการตรวจสอบหาไวรัสพร้อมกัน 2 ชนิดในการทำ PCR ครั้งเดียว โดยการเติมไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส PMWaV1 และ PMWaV2 ลงไปพร้อมกันก่อนนำดีเอ็นเอที่ได้ไปเพิ่มปริมาณ

ปริมาตรสุทธิ 50 µl

dH_2O	35 ไมโครลิตร
10X PCR buffer	5 ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	4 ไมโครลิตร
Primer F1 (10 µm)	1 ไมโครลิตร
Primer R1 (10 µm)	1 ไมโครลิตร
Primer F2 (10 µm)	1 ไมโครลิตร
Primer R2 (10 µm)	1 ไมโครลิตร
Template (ได้จากการทำ RT-PCR)	1 ไมโครลิตร
Taq polymerase	1 ไมโครลิตร

นำหลอด PCR ที่ผสมปฏิกริยาเรียบร้อยแล้วไปใส่เครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดตามรายละเอียดดังนี้ ปริมาตรสุทธิ 50 µl

Predenature	94 องศาเซลเซียส	นาน 5 นาที	
Denature	94 องศาเซลเซียส	นาน 1.5 นาที	35 รอบ
Anealing	70 องศาเซลเซียส	นาน 1.5 นาที	
Extension	72 องศาเซลเซียส	นาน 1.5 นาที	
Final extension	72 องศาเซลเซียส	นาน 10 นาที	

เมื่อสิ้นสุดปฏิกริยาจึงนำดีเอ็นเอที่ได้ไปตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่อยู่ใน TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท นานเป็นเวลา 30 นาที นำไปย้อมด้วย Ethidium bromide จากนั้นนำไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอภายใต้แสง Ultraviolet

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เก็บตัวอย่างสับปะรดจากแปลงปลูก ที่มีอาการบ่งชี้ว่าเป็นโรคเหี่ยวแล้วนำมาตรวจสอบหาเชื้อไวรัสภายในหน่อด้วยเทคนิค RT-PCR เมื่อพบว่าพบหน่อของสับปะรดมีการติดเชื้อจึงนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อนทดสอบการถ่ายเชื้อไวรัส PMWaV ผ่านทางวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

<u>การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ</u>

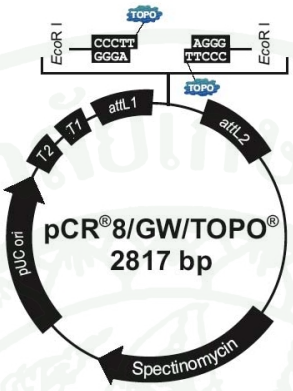
นำใบสับปะรดที่หุ้มหน่อออกให้หมดจากนั้นนำหน่อที่ได้ไปล้างด้วยน้ำเปล่านาน 10 นาที แบ่งหน่อออกเป็น 4 ชิ้นเท่า ๆ กันฟอกด้วย Clorox 20% นาน 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 30 นาที นำมาตัดตาสับปะรดออกจากหน่อให้มีขนาดประมาณ 1*1 เซนติเมตร แล้วฟอกด้วย Clorox 10% นาน 15 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 30 นาที หลังจากนั้นฟอกด้วย 70% alcohol นาน 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 30 นาที หลังจากนั้นวางชิ้นพืชให้แห้ง นาน 60 นาที แล้วนำไปวางบนอาหาร MS

หลังจากนำสับปะรดไปวางบนอาหารแข็ง MS แล้วประมาณ 3 เดือน ต้นสับปะรดจะมีการแตกออกจากตา มีขนาดต้นประมาณ 1 นิ้ว เพิ่มปริมาณต้นสับปะรดโดยการตัดยอดของสับปะรดแล้วนำไปวางบนอาหารแข็ง MS ที่มีการเติม ฮอร์โมน 3NAA และ 3BAP (alpha-napthalene acetic acid และ benzylaminopurine) เพื่อชักนำให้เกิดการแตกตาข้างและราก หลังจาก 5 เดือนต้นสับปะรดจะมีการแตกต้นใหม่จากตาเดิมในอัตราส่วน ต้นเดิม 1 ต้นจะแตกได้ต้นใหม่อีกประมาณ 20 ต้น หลังจากนั้นแยกสับปะรดมาวางบนอาหารแข็ง MS อีกครั้งเพื่อหยุดการแตกต้นใหม่และเพิ่มขนาดของต้นสับปะรดให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ และนำไปตรวจสอบหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค. แผนที่และลำดับนิวคลีโอไทด์ของ pCR®8/GW/TOPO® ซึ่งเป็น TA cloning vector (Invitrogen™)



Comments for pCR®8/GW/TOPO®
2817 nucleotides

*rrn*B T2 transcription termination sequence: bases 268-295
*rrn*B T1 transcription termination sequence: bases 427-470
M13 forward (-20) priming site: bases 537-552
*attL*1: bases 569-668
GW1 priming site: bases 607-631
TOPO® recognition site 1: bases 678-682
TOPO® recognition site 2: bases 683-687
*attL*2: bases 696-795
GW2 priming site: bases 733-757
T7 Promoter/priming site: 812-831 (c)
M13 reverse priming site: bases 836-852
Spectinomycin promoter: bases 930-1063
Spectinomycin resistance gene (Spn^R): 1064-2074
pUC origin: bases 2141-2814

ภาพผนวกที่ ค. แสดงโครงสร้างของ **pCR®8/GW/TOPO® cloning vector** และตำแหน่งของลำดับนิวคลีโอไทด์ต่าง ๆ ที่อยู่ vector

ภาคผนวก ง

ภาคผนวก ง. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

2XYT media (Kathryn et. Al., 2000)

Yeast Extract	10	กรัม	Nacl	5	กรัม
Tryptone	16	กรัม	Agar	15	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิกรัม			

ละลายส่วนผสมในน้ำ แบ่งใส่ขวดปิดฝา จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

สารปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน ละลายสารแอมพิซิลิน 1 กรัมในน้ำที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายดนุพล ไชยพงษ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	25 พฤศจิกายน พ.ศ. 2529
สถานที่เกิด	อำเภอเมืองจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (โรคพืช) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	–
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	–
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนผู้ช่วยนักวิจัยจากสถาบันวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปี พ.ศ. 2552 ถึงปี พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์