บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

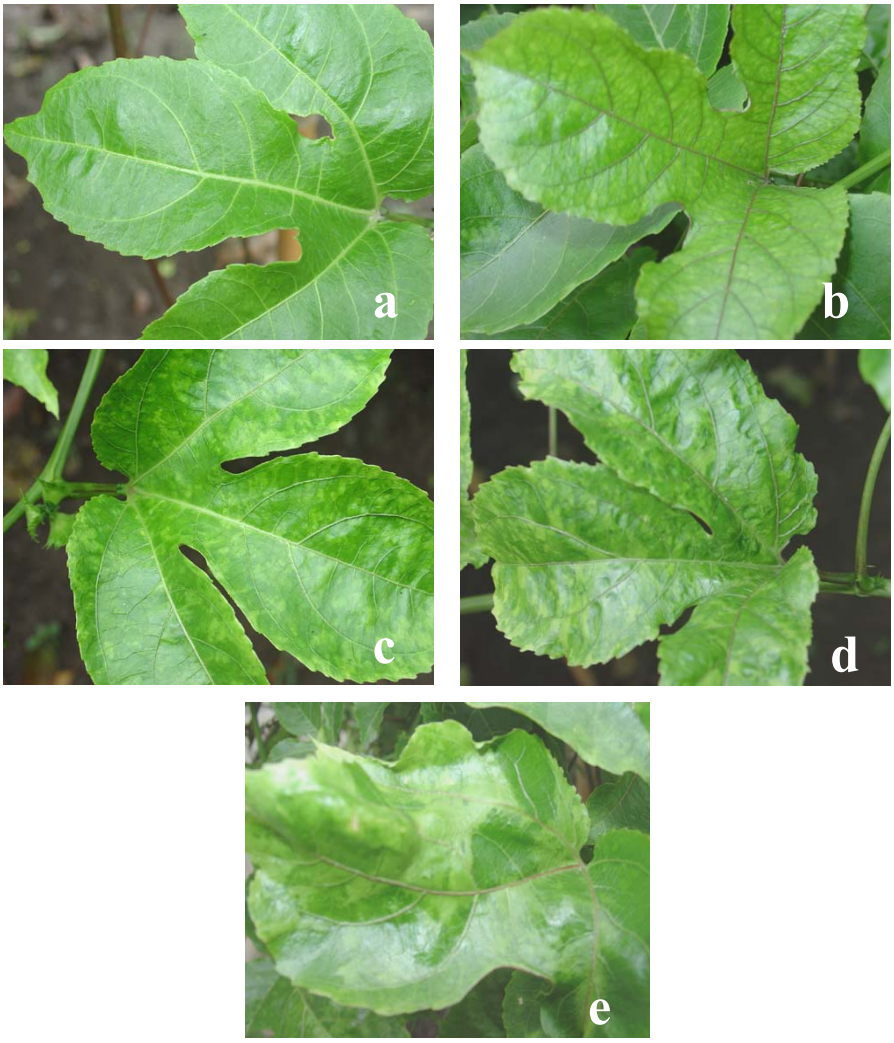
3.1 การสำรวจโรคไวรัสในแปลงปลูกแพสชั่นฟรุ้ต และการถ่ายทอดเชื้อ

3.1.1 สำรวจลักษณะอาการโรคไวรัส และประเมินระดับความรุนแรงของโรคไวรัสในแพสชั่นฟรุ้ต

สุ่มสำรวจพื้นที่แปลงปลูกแพสชั่นฟรุ้ตของเกษตรกรในอำเภอปะทิวจังหวัดชุมพร จำนวน 15 แปลง สำรวจ และบันทึกอาการของโรคไวรัสทั้งหมด และประเมินระดับความรุนแรงของโรค โดยการสุ่มอย่างมีระบบแปลงละ 1 ไร่ ไร่ละ 50 ต้น (โดยการกำหนดให้หมายเลขลำดับแต่ละต้นก่อน ซึ่งปกติ 1 ไร่ มีต้นแพสชั่นฟรุ้ตประมาณ 200 ต้น คือ ลำดับเลข 1- 200 ต้องการกลุ่มตัวอย่าง 50 ต้น (200 ÷ 50 = 4) ต้องสุ่มหมายเลข 1 – 4 ออกมาก่อนหนึ่งหมายเลข เพราะต้องสุ่มหาต้นแรกในการเริ่มต้น เมื่อสุ่มได้แล้วกำหนดต้นที่สุ่มได้เป็นต้นที่ 1 จากนั้นนับต่อไปอีกทีละ 4 ต้น จนได้กลุ่มตัวอย่างครบ 50 ต้น) ซึ่งกำหนดระดับความรุนแรงของโรคโดยรวมในแต่ละต้น แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าในทางสถิติ ซึ่งแบ่งระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ คือระดับ 0 ถึง ระดับ 4 ดังแสดงในภาพที่3.1 ซึ่งดัดแปลงมาจาก Moshe *et al*. (2001)

3.1.2 การถ่ายทอดเชื้อและ เพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส

เก็บใบอ่อนของแพสชั่นฟรุ้ตที่แสดงอาการของโรคไวรัส จากแปลงปลูกของเกษตรกรมาทำการถ่ายทอด และเก็บรักษาเชื้อ เพื่อศึกษาต่อในสภาพโรงเรือนทดลองโดยถ่ายทอดเชื้อด้วยน้ำคั้น (mechanical sap transmission) ลงในต้นกล้าแพสชั่นฟรุ้ตที่มีอายุประมาณ 1 เดือน โดยก่อนปลูกเชื้อต้องคลุมต้นกล้าด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้พืชมีสภาพอ่อนแอเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ นำใบอ่อนที่แสดงอาการของโรคไวรัสที่ชัดเจน และคาดว่ามีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อสูง บดให้ละเอียดด้วยสารละลาย Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 M pH 7.2 ในโกร่งที่แช่เย็น อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อ buffer 2 มิลลิลิตร และใส่ผง celite ลงไปด้วยเพื่อทำให้พืชเกิดบาดแผล เชื้อไวรัสสามารถผ่านเข้าไปในพืชได้ง่าย ใช้นิ้วมือที่สะอาดจุ่มทาน้ำคั้นเบาเบาไปยังใบอ่อนของต้นกล้าแพสชั่นฟรุ้ต ทำสัญลักษณ์ลงบนใบที่ทาน้ำคั้นเพื่อให้ทราบว่าเป็นใบที่ปลูกเชื้อ หลังจากนั้นพรมน้ำเล็กน้อยลงบนใบพืชเพื่อล้างเศษพืชที่อาจเป็นพิษออกจากใบพืชแล้วคลุมพืชทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงจึงเอาวัสดุคลุมออก แยกต้นพืชที่ปลูกเชื้อไปไว้ในเรือนทดลองกันแมลง รดน้ำทุกวัน สังเกตอาการ และบันทึกผล



ภาพที่3.1 การกำหนดระดับความรุนแรงของโรคซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 0 คือพืชปกติที่ไม่แสดงอาการของโรคหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 0 เปอร์เซ็นต์ (a); ระดับ 1 คือ ใบอ่อนแสดงเฉพาะอาการด่างเล็กน้อยหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 1 - 25 เปอร์เซ็นต์ (b); ระดับ 2 คือ ใบอ่อน แสดงอาการด่าง และหงิกเล็กน้อยหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ (c); ระดับ 3 คือ ใบอ่อนแสดงอาการด่าง และหงิกเพิ่มมากขึ้น แต่ใบอ่อนยังมีการเจริญเติบโตหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 51-75 เปอร์เซ็นต์ (d); และระดับ 4 คือ ใบอ่อนแสดงอาการด่างและหงิกรุนแรง ใบอ่อนหยุดชะงักการเจริญ เติบโตหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 76-100 เปอร์เซ็นต์ (e)

3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแพสชั่นฟรุ้ต

3.2.1 การทดสอบศึกษาพืชอาศัย (host range) ชนิดต่างๆ ของเชื้อไวรัสโดยการถ่ายทอดทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission)

ทดสอบพืชอาศัยชนิดต่างๆ ในวงศ์ Leguminosae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae และ Passifloraceae ดังแสดงในตารางที่3.1 โดยนำเมล็ด 3 - 4 เมล็ด ปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุดินลงไป 3 ใน 4 ส่วนของกระถาง เขียนชื่อของพืชแต่ละชนิดติดลงบนกระถาง ดูแลรดน้ำจนพืชงอกงามถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ จากนั้นนำมาคลุมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำให้พืชอ่อนแอ ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อ เมื่อครบระยะเวลานำกระดาษหนังสือพิมพ์ที่คลุมออก และทำการปลูกเชื้อไวรัสด้วยน้ำคั้น (mechanical sap transmission) โดยนำใบแพสชั่นฟรุ้ตที่แสดงอาการของโรคมาบดให้ละเอียดในโกร่งแช่เย็น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกับสารละลาย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 M pH 7.2 อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อ buffer 2 มิลลิลิตร ใส่ผง celite ใช้มือจุ่มน้ำคั้นแล้วนำไปทาลงบนใบพืชทดสอบเพื่อเป็นตัวทำให้เกิดแผลบนใบพืช หลังจากนั้นพรมน้ำเล็กน้อยลงบนใบพืชเพื่อล้างเศษพืชออก ติดป้ายบันทึกวันที่ และชนิดของพืชที่ปลูกเชื้อ แล้วคลุมพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ชุ่มน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเอาวัสดุคลุมออก เก็บพืชที่ปลูกเชื้อแล้วในกรงกันแมลง รดน้ำทุกวัน สังเกต และบันทึกลักษณะอาการที่เกิดขึ้นหลังการปลูกเชื้อ 7 - 30 วัน เปรียบเทียบลักษณะอาการที่พบกับต้นเปรียบเทียบ (control) ชนิดละ 5 ต้น

ตารางที่ 3.1 วงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ และอายุของพืชที่ใช้ในการทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสโดยการถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยน้ำคั้น (mechanical sap transmission)

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	อายุที่ใช้ทดลอง(วัน)
Chenopodiaceae	*Chenopodium amaranticolor*	Goosefoot	45
Leguminosae	*Phaseolus aureus* Roxb	ถั่วเขียว	5-7
	Vigna sesquipedalis Wight	ถั่วฝักยาว	5-7
Cucurbitaceae	*Cucumis sativus* L	แตงกวา	5-7
Amaranthaceae	*Gomphrena globosa*	บานไม่รู้โรย	28-35
Passifloraceae	*Passiflora edulis* Sims	แพสชั่นฟรุ้ต	35-40
	Passiflora foetida L	กระทกรกป่า	35-40

3.2.2 การวินิจฉัยเชื้อไวรัสโดยการตรวจสอบกรดนิวคลิอิค

การนำเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction) มาใช้ในการตรวจสอบ และวินิจฉัยเชื้อไวรัส ซึ่งส่วนใหญ่ไวรัสมีหน่วยพันธุกรรมเป็น RNA ซึ่งการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสจะมีช่วงการทวีจำนวนของเชื้อ (multiplication) มีการเกิด double stranded RNA (dsRNA) จึงทำการแยกสกัด total RNA ออกมา ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ 2 วิธีในการแยกสกัดเพราะว่าชุดสกัดที่ใช้ในตอนแรกบริษัทที่นำเข้าไม่มีการนำเข้ามาขายอีก คือ การใช้ชุด Ultra Clean ™ Plant RNA Isolation Kit ของบริษัท MO BIO Laboratories.Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา และการใช้ Plant concert solution ของบริษัท Invitrogen

3.2.2.1 การแยกสกัดกรดนิวคลิอิคของเชื้อไวรัส

แยกสกัดจากใบพืชที่เป็นโรค โดยใช้ชุดสกัด Ultra Clean ™ Plant RNA Isolation Kit. ของบริษัท MO BIO Laboratories.Inc. ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ดังภาพที่3.2 โดยมีขั้นตอนการแยกสกัดดังต่อไปนี้

1. บดใบพืชที่แสดงอาการของเชื้อไวรัสชัดเจนน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม ด้วย ไนโตรเจนเหลว เติมสารละลาย PMR1 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

2. ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสปริมาตรอย่างน้อย 600 ไมโครลิตร เติมสารละลาย PMR2 500 ไมโครลิตร และเติม สารละลาย PMR 3 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดไปมา แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย PMR4 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

4. ดูดสารละลายจากข้อ 3. ใส่ในหลอดที่มี spin filter ให้ได้ปริมาตร 650 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทิ้งน้ำใสเก็บตะกอน

5. เติมสารละลาย PMR5 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที หลังจากนั้นเทน้ำใสทิ้ง นำหลอดที่มี spin filter ไป หมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายที่ยังค้างอยู่บน filter ไหลผ่านลงมาจนหมด

6. นำ spin filter จากข้อ 5. มาใส่ในหลอดใหม่เติมสารละลาย PMR6 ปริมาตร 30 - 50 ไมโครลิตร ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 30 วินาที เพื่อละลายตะกอน RNA ที่ได้จากการสกัดทั้งหมด (total RNA) เก็บ RNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

การแยกสกัดโดยใช้น้ำยา Plant concert solution ของบริษัท Invitrogen ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ดังภาพที่3.3 โดยมีขั้นตอนในการสกัดดังต่อไปนี้

1. บดใบพืชที่แสดงอาการชัดเจนน้ำหนักประมาณ 0.1- 0.3 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลว เติมน้ำยา Plant concert solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex ปั่นเป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที โดยการเอียงหลอด หลังจากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2. ดูดน้ำใสใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 M ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรและเติม Chloroform ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. ดูดน้ำใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ ก่อนเติม Isopropyl alcohol เท่ากับปริมาณน้ำใสที่ได้ หลังจากนั้น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 นาที

4. ทิ้งน้ำใส เก็บตะกอน ก่อนเติม ethanol ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

5. ทิ้งน้ำใสแล้วนำหลอดผึ่งให้แห้ง (air-dry) ตะกอนที่ได้คือ RNA รวม (total RNA) ก่อนเติม RNAse free water ปริมาตร 10 – 30 ไมโครลิตรเก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

3.2.2.2 จำแนกชนิดของเชื้อไวรัส โดยการตรวจสอบ ds RNA ของเชื้อไวรัส (Double stranded RNA detection)

การตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อไวรัสที่ทำการแยกสกัด ในข้อ 3.2.2.1 โดยนำ total RNA ใน RNAse free water ที่ได้ไปทำการแยกด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวกลาง electrophoresis buffer ที่ใช้คือ Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (TAE) buffer ซึ่ง TAE buffer (50 X) ซึ่งประกอบด้วย (Tris 242 กรัม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร และ EDTA 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5M pH 8.0) อุปกรณ์การเตรียม gel electrophoresis ดังแสดงในภาพที่3.4

ขั้นตอนการเตรียม agarose gel

เตรียม TAE buffer (10x) จาก TAE buffer (50 X) โดยใช้ TAE buffer (50 X) 50 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำ 50 มิลลิลิตร มาละลาย agarose gel ซึ่งมีน้ำหนัก 0.4 กรัม ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเตาไมโครเวฟ ไม่ควรให้เดือดเพราะจะเกิดการ

ระเหยทำให้ปริมาตรเปลี่ยนแปลงไป หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้อุ่นพอดีที่สามารถจับด้วยมือเปล่าได้จึงนำไปเทใน gel chamber ก่อนเท gel ลงใน gel chamber ใส่หวี (comb) โดยให้ปลายซี่หวีอยู่สูงจากฐานประมาณ 2 มิลลิลิตร แล้วเท agarose gel ที่อุ่นลงไป ทิ้งไว้ 15-20 นาที จนแข็งตัวจึงค่อยๆ ดึงหวีออก เท buffer ที่เหลืออีก 450 มิลลิลิตร ลงไปให้ท่วม gel สูงประมาณ 1 - 3 มิลลิลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยหยอดตัวอย่างของ total RNA ที่สกัดได้จากใบพืชเป็นโรคทำโดยการผสม total RNA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับ gel loading buffer (Blue juice 10X จากบริษัท Invitrogen) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ก่อนหยอดลงในแต่ละหลุมของ agarose gel สำหรับตัวเปรียบเทียบมาตรฐานคือ Lambda DNA ที่ถูกย่อยด้วย enzyme Hind III เมื่อให้กระแสไฟฟ้าครบ 2 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบ และวิเคราะห์ผล โดยนำ gel มาย้อมสีด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เป็น เวลา 5 นาที เพื่อดูลักษณะการเคลื่อนที่ของ dsRNA โดยใช้กล่องแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 260 – 302 นาโนเมตร จากลักษณะการเคลื่อนที่ของ band dsRNA ที่ตรวจสอบได้นั้น สามารถนำมาเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานที่ใช้ แล้วคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างที่ต้อง การโดยเปรียบเทียบกับ linear curve การยืนยันผลว่า band ที่ได้เป็น dsRNA ทำโดยนำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.15 M ที่มี enzyme RNAse เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วนำมาตรวจสอบบนกล่องแสง ultraviolet อีกครั้ง ซึ่งแถบ band ของ dsRNA จะยังคงอยู่ไม่ถูกย่อยสลาย

วิธีการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดย linear curve ดังแสดงในภาพที่3.5

1. การหาสมการ linear ของตัวมาตรฐานหรือตัวเปรียบเทียบจากการเคลื่อนที่ใน gel electrophoresis

1.1 วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐาน (marker) แต่ละ band จากจุดกึ่งกลางหลุม gel electrophoresis ไปยังแต่ละ band ของ Lane marker

1.2 จากนั้นหาค่า log ของ น้ำหนักโมเลกุลตัวมาตรฐาน (marker เป็นตัวที่รู้น้ำหนักโมเลกุลของแต่ละ band แล้ว)

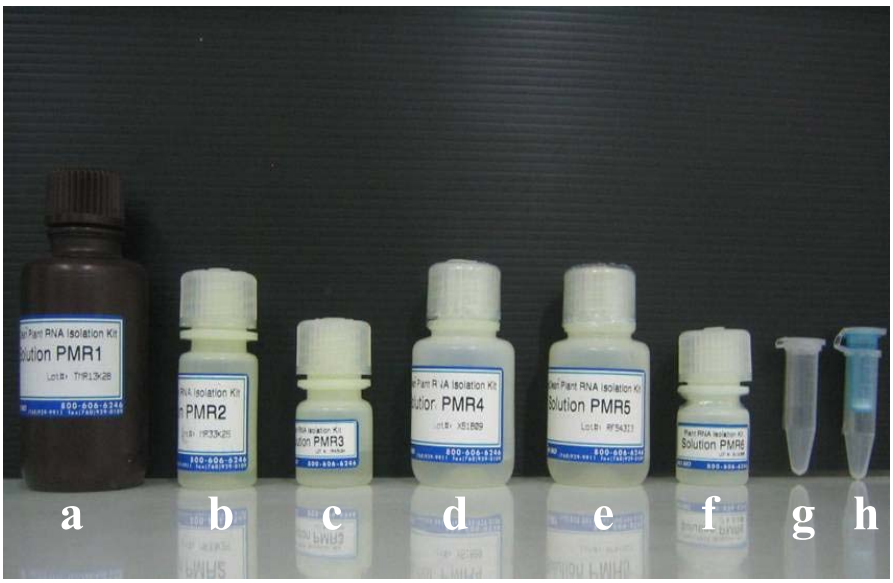
1.3 แล้วนำค่าที่ได้คือ ค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของแต่ละ band กับ ค่า log น้ำหนักโมเลกุลมาสร้างแผนภูมิในโปรแกรม Microsoft Excel

1.4 จากนั้นนำมาคำนวณหา สมการเชิงเส้นและ ค่า R- squared ให้เลือกที่ option เส้นแนวโน้มในโปรแกรม

2. วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวอย่างที่เราต้องการทราบแต่ละ Lane ทุก band ที่สังเกตเห็นโดยวัดระยะทางจากจุดกึ่งกลางหลุม gel electrophoresis ในแต่ละ Lane ไปยังแต่ละ band ของแต่ละตัวอย่าง

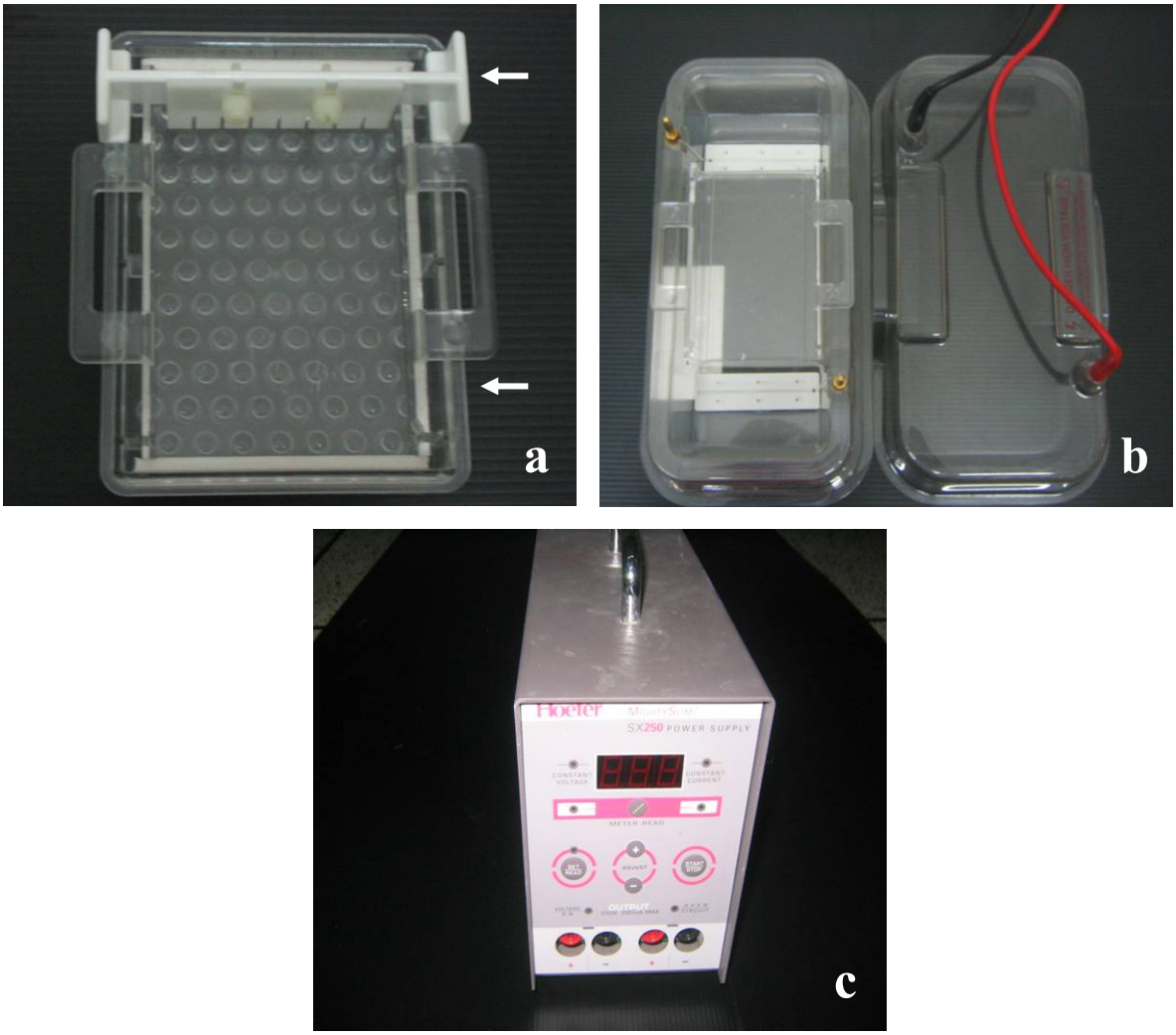
2.1 นำค่าระยะทางที่วัดได้มาแทนค่าเป็นค่า X ในสมการเชิงเส้นที่ได้จากการไปสร้างแผนภูมิ ก็จะคำนวณได้เป็นค่า log น้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างแต่ละ band

2.2 ถอดค่า log น้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างแต่ละ band ออกก็จะได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างแต่ละ band (การถอดค่า log คำนวณโดยใช้ 10 ไปยกกำลังค่าของตัวอย่างที่ได้)

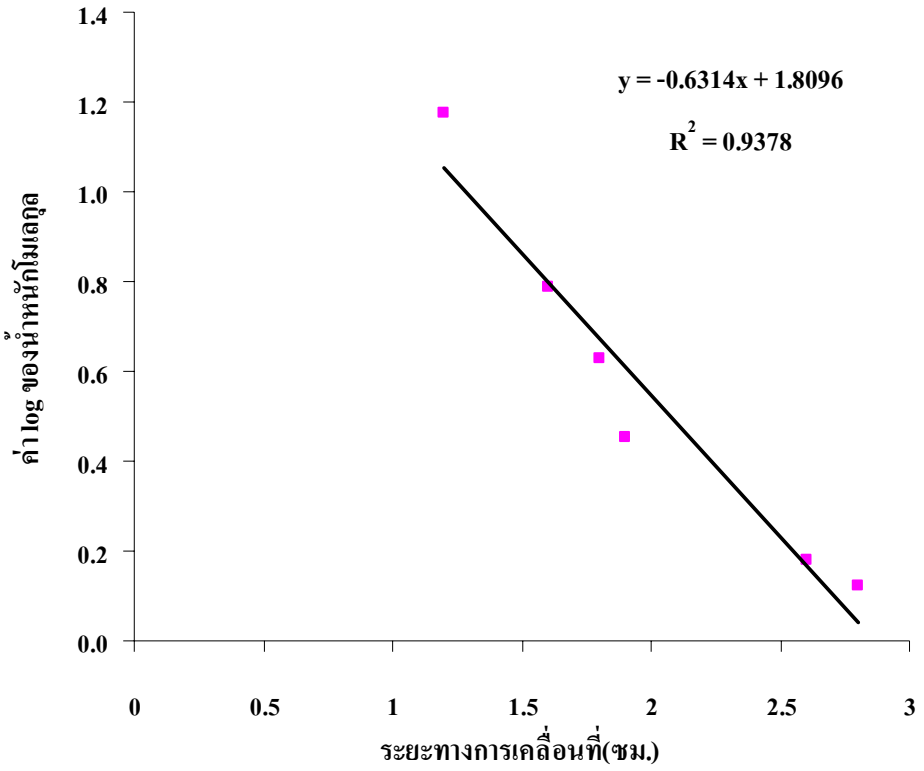


ภาพที่ 3.2 แสดงชุดสกัด Ultra Clean ™ Plant RNA Isolation Kit. ประกอบด้วย Solution PMR1 (a); PMR2 (b); PMR3 (c); PMR4 (d); PMR5 (e); PMR6 (f); microtube (g); และ microtube (h); ที่มี spin filter (หลอดสีฟ้า)

ภาพที่ 3.3 แสดงชุดสกัดโดยใช้น้ำยา Plant concert solution ประกอบด้วย chloroform (a); ethanol absolute (b); 2 – propanol (c); distilled water (DNAse RNAse Free) (d); และ plant RNA purification solution (e)



ภาพที่3.4 แสดงอุปกรณ์การเตรียม gel electrophoresis ประกอบด้วยการเตรียม agarose gel ซึ่งประกอบด้วย หวี (comb) (a); และ gel chamber (ตามลูกศรชี้) ชุดสำหรับการ run gelelectrophoresis (b); เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 50 โวลต์ (c)



ภาพที่3.5 สมการเชิงเส้น และค่า R-squared จากการคำนวณโดยใช้ระยะทางเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐาน และ ค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลในโปรแกรม Microsoft Excel

3.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus โดยการใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

1. การหา temperature gradient PCR ที่เหมาะสม

ศึกษา temperature gradient PCR ในช่วงอุณหภูมิ 45 - 65 องศาเซลเซียส จำนวน 5 อุณหภูมิ คือที่ 45, 51.5, 56.2, 60.9 และ 65 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเพิ่มทวีจำนวนของชิ้น DNA

2. การเตรียม Primer mix (one – step) ของบริษัท

ประกอบด้วย 2 x buffer 12.5 µl primer pot1 (5' – 3') ATTBTCDATRCACCA 0.5 µl primer pot2 (5' – 3') TGYGAYGCBGATGGYTC 0.5 ไมโครลิตร น้ำ 0.5 ไมโครลิตร Template 10 ไมโครลิตร และ Supersript III RT 1 ไมโครลิตร แบ่ง Master mix ใส่หลอด microtube ผสม RNA template ตัวอย่างอาการไวรัสของแพสชั่นฟรุ้ตแต่ละชนิดลงในหลอด microtube ที่เตรียม Master mix เรียบร้อย เตรียมเข้าเครื่อง PCR ต่อไป

3. การเตรียม cDNA โดยการใช้ Superscript ^{tm} III First – Strand Synthesis System for RT – PCR

การเตรียม primer mix โดยผสม Template RNA 5 ไมโครลิตร Reverse primer ความเข้มข้น 5 M 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix 1 ไมโครลิตร และ DEPC – treated water 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดย briefly centrifuge บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้น แช่น้ำแข็งอย่างน้อย 1 นาที

การเตรียม cDNA Synthesis MIX โดยการผสม 10x RT Buffer 2 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 4 ไมโครลิตร 0.1 M DTT 2 ไมโครลิตร Rnase OUT^{TM} 1 ไมโครลิตร และ SuperScript III RT 1 ไมโครลิตร โดยการใส่เรียงตามลำดับ ผสม primer mix กับ cDNA Synthesis mix โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เท่ากันผสมโดยการ briefly centrifuge บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที และที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นแช่น้ำแข็งเติม Rnase H 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

4. การเตรียม Platinum PCR supermix

โดยใช้ PCR mix 22 ไมโครลิตร primer pot1(5' – 3') ATTBTCDATRCACCA 0.5 ไมโครลิตร primer pot2 (5' – 3') TGYGAYGCBGATGGYTC 0.5 ไมโครลิตร และ Template DNA 5 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอด microtube แต่ละหลอดเตรียมเข้าเครื่อง PCR ใส่หลอดไมโครทิวป์ลงในเครื่อง Programable DNA Thermal Cycle ตามเงื่อนไขดังนี้

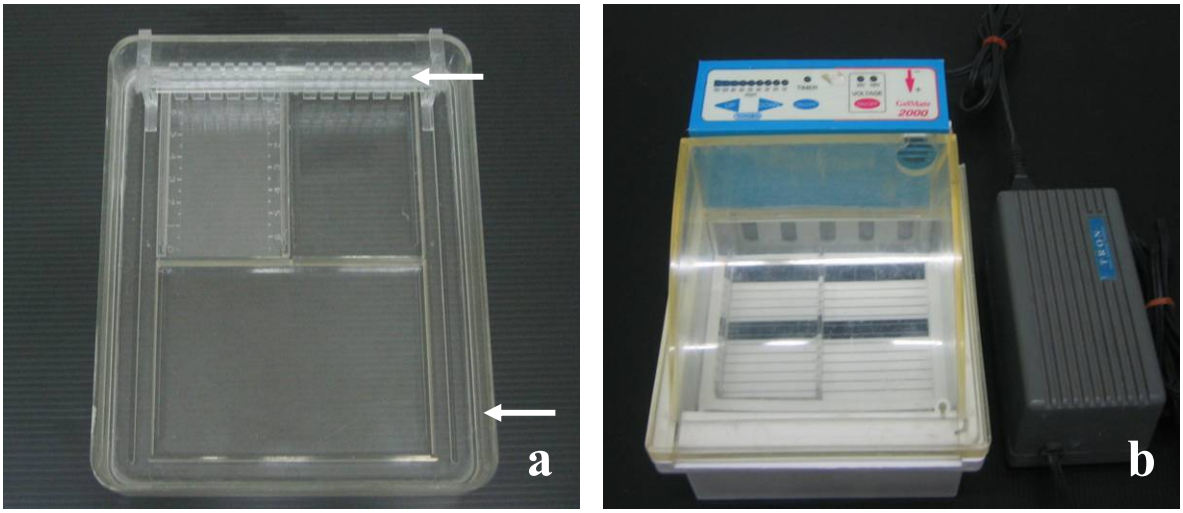
โปรแกรม PCR ของ เชื้อกลุ่ม potyvirus

94 องศาเซลเซียส	15 นาที		1 รอบ
94 องศาเซลเซียส	45 วินาที	}	
50 องศาเซลเซียส	30 วินาที	}	40 รอบ
72 องศาเซลเซียส	2 นาที	}	
72 องศาเซลเซียส	10 นาที		1 รอบ

3.2.4 การใช้กระแสไฟฟ้า (gel eletrophoresis) ในการแยก RT-PCR product ของเชื้อไวรัส

เตรียม electrophoresis buffer โดยใช้ TBE buffer (50x) ซึ่งประกอบ ด้วย Tris 242 กรัม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร และ EDTA 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5 M pH 8.0 อุปกรณ์การเตรียม gel eletrophoresis ดังแสดงในภาพที่3.6

ขั้นตอนการเตรียม agarose gel เตรียม TBE buffer (10x) จาก TBE buffer (50 X) โดยใช้ TBE buffer (50 X) 50 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำ 50 มิลลิลิตร มาละลาย agarose gel ซึ่งมีน้ำหนัก 0.4 กรัม ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน หยดสารตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลุมที่เตรียมไว้ เท buffer ที่เหลืออีก 450 มิลลิลิตร ลงไปให้ท่วม gel สูงประมาณ 1-3 มิลลิลิตร เตรียม loading dye ที่เข้มข้นประมาณ 10 เท่า ผสมกับ ethidium bromide ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อต้องการใช้จะผสมกับ PCR product ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 แล้วนำไปหยดลงในหลุมบน agarose gel ที่เตรียมไว้แต่ละหลุม โดยมีตัวเปรียบเทียบคือ DNA มาตรฐานซึ่งหยดลงในหลุม agarose gel ด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน ใช้ไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 50 นาที แล้วนำถาด gel ไปตรวจสอบภายใต้รังสี ultraviolet ด้วยเครื่อง Gel Photodocumentation System ซึ่งสามารถมองเห็นแถบสีของ RNA product ซึ่งเคลื่อนที่ไปจากขั้วลบไปยังขั้วบวกแล้ว จากนั้นทำการบันทึกภาพ และ นำไปวิเคราะห์ผล



ภาพที่3.6 แสดงอุปกรณ์การเตรียม gel electrophoresis ประกอบด้วย การเตรียม agarose gel ซึ่งประกอบด้วยหวี (comb) (a); และ gel chamber (ตามลูกศรชี้) ชุดสำหรับการ run gelelectrophoresis (b)

3.3 การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด (seed transmission)

ศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ดโดยการนำเมล็ดพันธุ์แพสชั่นฟรุ้ตที่มีการจำหน่ายในท้องตลาดมาทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ โดยใช้เมล็ดพันธุ์จำนวน 100 เมล็ด มาเพาะในกระถางโดยใช้ดินที่ปราศจากเชื้อ รดน้ำทุกวัน และเก็บไว้ในโรงเรือนป้องกันแมลง หลังจากนั้นสังเกตอาการของเชื้อไวรัสในต้นพืช ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนกระทั่งต้นกล้ามีอายุ 1 เดือน

3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัสโดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (Electron microscope)

ตรวจสอบด้วยกล้องอิเลคตรอน Hitachi Model HU-12A ในฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง) สถาบันวิจัย และพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน โดยวิธี Leaf dip technique โดยการบดตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคในสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.5 ที่แช่เย็น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (w/v) แยกตะกอนเศษพืชออกแล้วหยดน้ำคั้นของพืชเป็นโรคที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น parafilm ที่สะอาด นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh ที่เคลือบด้วยสารละลาย formwar ที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ใน chloroform (w/v) และ carbon coat ซึ่งทำลายประจุผิวหน้ากริดแล้ว วางกริดคว่ำลงบนหยดน้ำคั้นประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นล้างกริดด้วยสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1M pH 7.5 ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร ซับขอบกริดด้วยกระดาษกรองให้แห้งพอหมาด ย้อมสีด้วย uranyl acetate (UA) 2 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 0.3 มิลลิลิตร ซับขอบกริดให้แห้งอีกครั้งก่อนนำไปตรวจดูด้วยกล้อง electron microscope (EM) เพื่อตรวจหาอนุภาคของเชื้อไวรัส ขนาด และรูปร่างของอนุภาค

3.5 การใช้วิธีการแบบผสมผสานในการป้องกันกำจัดโรคไวรัสของแพสชั่นฟรุ้ต

ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไวรัสในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกรเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยเปรียบเทียบ 3 วิธีการ คือ 1) การใช้วิธีแบบผสมผสาน 2) การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงเพียงอย่างเดียว และ 3) แปลงปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งพื้นที่แปลงทดลองแต่ละแปลงมีขนาด 3 ไร่ และแปลงทดลองแต่ละแปลงตั้งอยู่ในบริเวณที่แตกต่างกันคือ แปลงที่ 1 ตั้งอยู่บริเวณเชิงเขา โดยพื้นที่แปลงครึ่งหนึ่งเป็นพื้นที่ราบ และอีกครึ่งหนึ่งลาดเทขึ้นบนเนินเขา แปลงที่ 2 ตั้งอยู่บนภูเขา คือพื้นที่แปลงปลูกทั้งหมดตั้งอยู่บนภูเขา และแปลงที่ 3 เป็นแปลงปลูกที่ตั้งอยู่บนพื้นที่ราบทั้งหมด เริ่มทำการทดลองหลังจากการย้ายต้นกล้าแพสชั่นฟรุ้ตลงแปลงปลูก ขณะแพสชั่นฟรุ้ตมีอายุประมาณ 2 เดือนไปจนถึงการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) มี 10 ซ้ำ (ซ้ำละ 20 ต้น) ประกอบด้วย 3 วิธีการดังแสดงในภาพที่3.7 ซึ่งแต่ละวิธีการ มีการจัดการที่แตกต่างกันดังนี้คือ

วิธีที่1 การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงเพียงอย่างเดียว

ใช้สาร imidacloprid ควบคุมแมลงพาหะพวกเพลี้ยอ่อนในอัตรา 20 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับสารจับใบฉีดพ่นทางใบ 5 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นให้ทั่วแปลงทุกๆ 15 วัน

วิธีที่2 การใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน

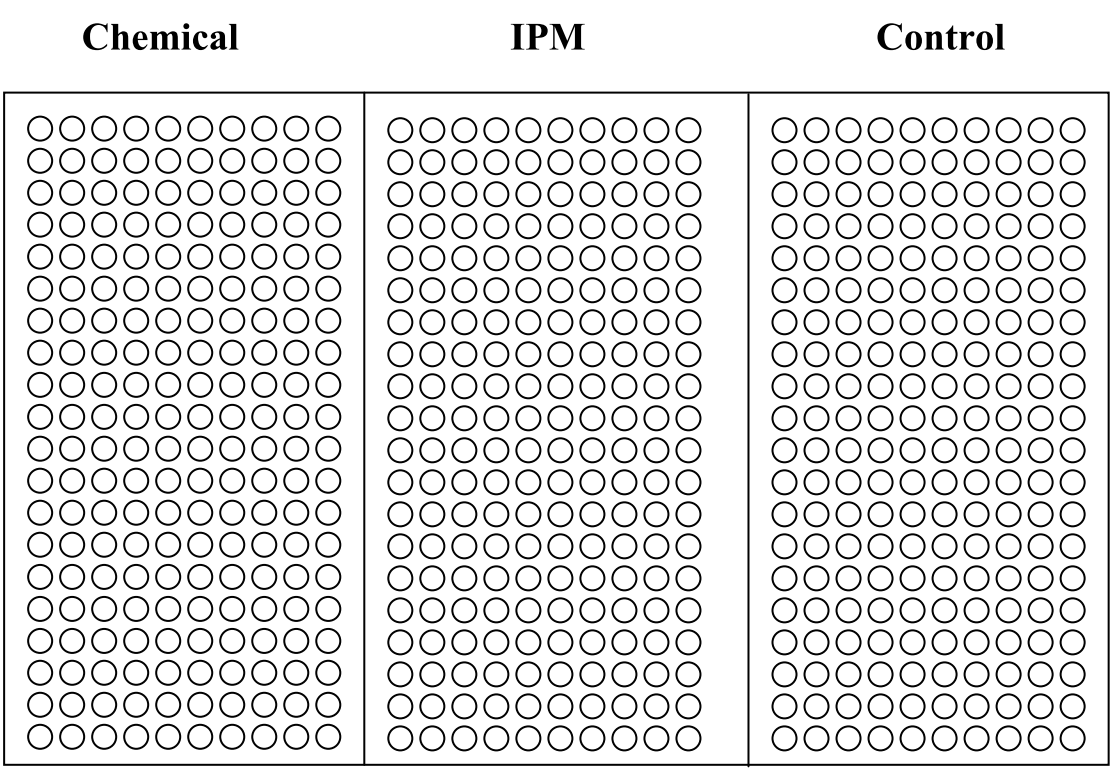
วิธีการนี้ใช้หลายวิธีการร่วมกันคือ การใช้กับดักกาวเหนียว การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง และการใช้น้ำมันปิโตรเลียมป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยการผูกกับดักกาวเหนียวสีเหลืองซึ่งเป็นสีที่มีการทดสอบ และรายงานว่าเป็นสีที่ดึงดูดแมลงพวก เพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการติดตามประเมินดูความหนาแน่นของประชากรแมลง ผูกติดกับค้างต้นแพสชั่นฟรุ้ตกระจายทั่วแปลงปลูกเฉพาะแปลงที่ใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานเท่านั้น โดยทากาวเหนียวใหม่ทุกๆ 15 วัน สำหรับน้ำมันปิโตรเลียมป้องกันกำจัดศัตรูพืช (White oil) ใช้ในอัตรา 5 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ใช้ร่วมกับสารเคมีกำจัดแมลง imidacloprid ที่อัตรา 20 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร และสารจับใบอัตรา 5 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นให้ทั่วแปลงทุกๆ 15 วัน

วิธีที่3 แปลงปลูกตามธรรมชาติ (Control)

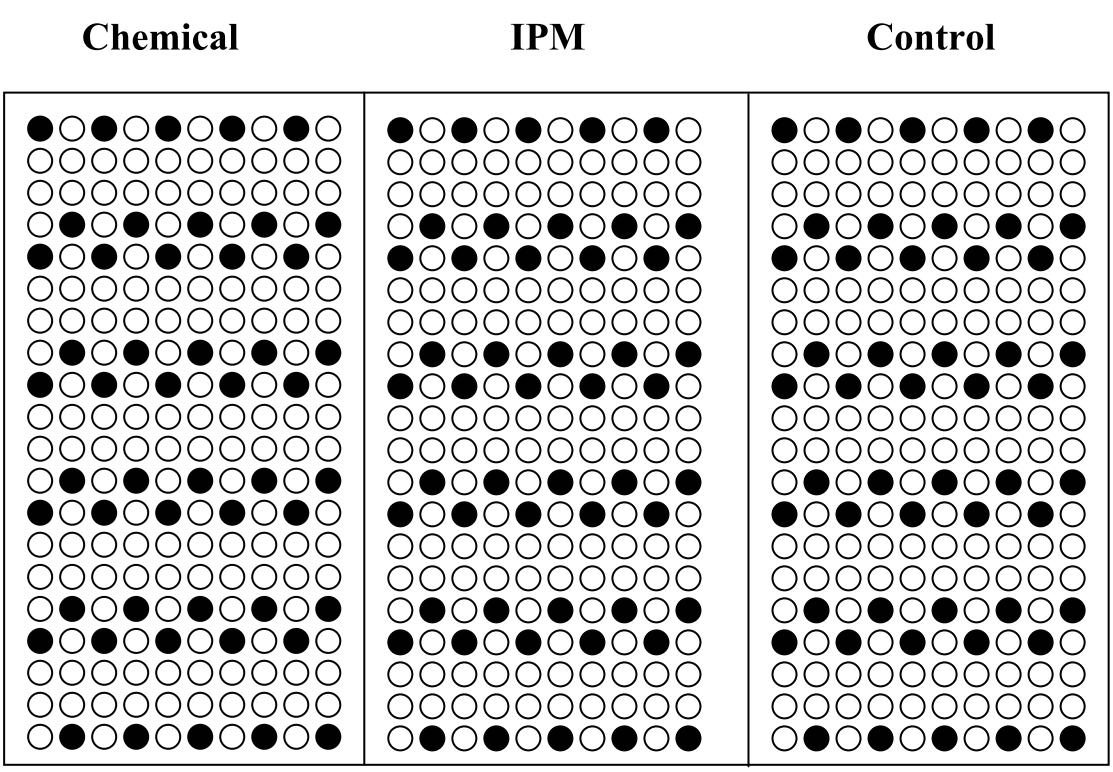
เป็นแปลงปลูกที่ใช้เปรียบเทียบ โดยการปลูกตามธรรมชาติ และให้น้ำตามปกติ

3.6 การประเมินระดับความรุนแรงของโรค เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และผลผลิตที่ได้

ประเมินระดับความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคในทุกวิธีการ โดยการสุ่มประเมิน อย่างมีระบบวิธีการละ 50 ต้น ทุกๆ 30 วัน กำหนดระดับการเกิดโรคแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 0 ถึง ระดับ 4 (ดังแสดงในข้อ 3.1.1) แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อแพสชั่นฟรุ้ตให้ผลผลิต เก็บผลผลิตที่ได้ในแต่ละวิธีการ มาชั่งบันทึกข้อมูลจำนวนน้ำหนักของผลผลิต และนำข้อมูลไปวิเคราะห์เปรียบ เทียบความแตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างแปลงที่ใช้สารเคมีกำจัดแมลงเพียงอย่างเดียว แปลงที่ใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน และแปลงปลูกตามธรรมชาติ ดังแสดงในภาพที่3.8



ภาพที่3.7 แสดงขนาดพื้นที่ 1 ไร่ ซึ่งมีจำนวนต้นแพสชั่นฟรุ้ตประมาณ 200 ต้นและ ระยะปลูก ขนาด 2 X 2 เมตร และการวางแผนผังการทดลองแต่ละวิธีการในสภาพพื้นที่แต่ละแปลงทดลอง



ภาพที่3.8 แสดงการวางแผนผังในการสุ่มต้นแพสชั่นฟรุ้ตอย่างมีระบบในการประเมินระดับความรุนแรงของโรคและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแต่ละวิธีการในสภาพพื้นที่แต่ละแปลงทดลอง

3.7 สำรวจชนิดของแมลงพาหะในแปลงปลูกแพสชั่นฟรุ้ต

สำรวจชนิดของแมลงที่พบในแปลงปลูกแพสชั่นฟรุ้ต ของเกษตรกรในพื้นที่แปลง 3 สภาพพื้นที่ คือ แปลงปลูกเชิงเขา แปลงปลูกบนภูเขา และแปลงปลูกบนพื้นที่ราบในวิธีการที่ใช้การจัดการแบบผสมผสานที่มีการใช้กับดักกาวเหนียว โดยสุ่มตรวจนับจำนวนของแมลงที่ติดอยู่บนกับดักกาวเหนียวจำนวน 15 กับดักต่อแปลง ทุกๆ 30 วัน

3.8 สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. โรงเรือนเพาะเลี้ยงของภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
3. ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
4. ห้องปฏิบัติการ ADB คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
5. ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง) สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

3.9 ระยะเวลาในการทดลอง

2 ปี