ตรวจสอบอาการผิดปกติของสับปะรดที่คล้ายกับอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสโรคเหี่ยวคลอสเทลโรไวรัส (*Pineapple mealybug wilt-associated viruses*, PMWaVs) ในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในแปลงปลูกจังหวัดเพชรบุรี พบอาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้ปิด ใบด่างเหลืองอ่อนนิ่มสีน้ำตาล และผลสับปะรดมีขนาดเล็กลง และอาการในสับปะรดจากแปลงที่นำมาปลูกไว้ในโรงเรือน รวม 21 ตัวอย่าง จำนวน 5 พันธุ์ คือ พันธุ์ปัตตาเวีย พันธุ์ศรีราชา พันธุ์นางแล พันธุ์ตราดสีทอง และพันธุ์ภูเก็ต พบว่า สับปะรดพันธุ์ศรีราชา จากจังหวัดชลบุรี 4 ตัวอย่าง (Chb1, Chb2, Chb3 และ Chb6) แสดงอาการ 3 แบบ คือ อาการเส้นใบมีสีแดง อาการแผลจุดตาย และอาการใบด่างประ พันธุ์นางแล 1 ตัวอย่าง (Nal1) และพันธุ์ปัตตาเวีย 3 ตัวอย่าง (Pbu1, Pbu2 และ Pbu3) แสดงอาการใบด่าง พันธุ์ภูเก็ต 1 ตัวอย่าง (Phu1) แสดงอาการแผลไหม้ขนาดใหญ่ รวมทั้งมีพันธุ์ศรีราชา 4 ตัวอย่าง (H1, H2, H3, HO) ที่ไม่แสดงอาการผิดปกติหรืออาการของโรค พัฒนาวิธีตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวในตัวอย่างสับปะรดข้างต้น ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณยีน Heat shock protein homologous (HSP70) บางส่วน ขนาด 590 คู่เบส และ 610 คู่เบส ของไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 ตามลำดับ พบว่าตัวอย่างสับปะรดที่เพิ่มปริมาณยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ได้เพียงชนิดเดียว ได้แก่ H1, H3 และ CO ตัวอย่างที่พบยีน HSP70 ของ PMWaV-2 ชนิดเดียว ได้แก่ Chb1-KU, Chb02-DOA, Chb03-DOA, Chb06-DOA, Tr01-DOA และ Phu1-KU และที่พบทั้ง PMWaV-1 และ -2 ร่วมกันมี 7 ตัวอย่าง ได้แก่ HO, H2, Chb2-KU, Chb01-DOA, Chb02-DOA, Chb03-DOA และ Pch03-DOA เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน HSP70 ของไวรัส PMWaV-1 จากสับปะรดพันธุ์ศรีราชา HO และไวรัส PMWaV-2 จากสับปะรด Chb2-KU พบว่ามีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 ไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 ที่มีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกา ร้อยละ 97 และ 98 ตามลำดับ

เพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (CP gene) ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 จากตัวอย่างสับปะรด HO พันธุ์ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ด้วยเทคนิค RT-PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาด 772 คู่เบส ที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 257 เรซิดิวส์ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน คล้ายกับ CP gene ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 จากประเทศสหรัฐอเมริกา (US isolate of PMWaV-1, GenBank accession number AF414119) ที่ระดับ 98 และ 99 % identity ตามลำดับ ทำการโคลน CP gene ที่เพิ่มปริมาณได้ เข้าสู่ pGEX-2T expression vector และย้ายพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียอีโคไล (*E. coli* DH5α) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-1 จากสับปะรดของประเทศไทย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28.3 กิโลดาลตัน

The examination of pineapple plants showing symptoms similar to those caused by *Pineapple mealy bug wilt associated viruses*, PMWaVs, was conducted, and virus diagnostic method was developed. Symptoms found on Pattavia pineapple in Petchaburi province planting field were vein reddening, twist and blight leaf tip, yellow mosaic of leaf with collapsed browning tissue, and decreased size of fruit. In addition, symptoms of 21 pineapple plants of five economically important varieties maintained in screen house were observed. Four samples of Sriracha varieties (Chb1, Chb2, Chb3, Chb6) showed leaf reddening, necrotic lesion and leaf mottling. One plant of Nang Lae variety (Nal1) and 3 plants of Pattavia variety (Pbu1, Pbu2, Pbu3) exhibited mosaic symptom while a sample of Phuket variety (Phu1) showed necrotic patches on leaves. On the contrary, four plants of Sriracha Pineapple (H1, H2, H3, HO) did not show any symptom. The diagnostic method of PMWaVs was developed by using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with primers specific to Heat shock protein homologous (HSP70) gene of PMWaV-1 and PMWaV-2, yielding fragments of HSP70 gene sizes of 590 and 610 bp, respectively. By RT-PCR, the pineapples H1, H3 และ CO were found to contained PMWaV-1, whereas Chb1-KU, Chb02-DOA, Chb03-DOA, Chb06-DOA, Tr01-DOA and Phu1-KU contained PMWaV-2. Samples that contained both viruses were HO, H2, Chb2-KU, Chb01-DOA, Chb02-DOA, Chb03-DOA and Pch03-DOA. Analysis of HSP70 gene fragments of PMWaVs-1 and -2 from the HO and Chb2-KU Sriracha pineapple revealed their homology to those of PMWaV-1 and -2 from the US at 97 and 98 percent, respectively.

The amplification, cloning and sequencing of PMWaV-1 coat protein (CP) gene was performed, followed by gene expression in *E.coli* DH5α bacterial cell. By RT-PCR using RNA template from HO Sriracha pineapple with a pair of designed CP primers, the 772 bp cDNA fragment of CP gene was obtained. This Thai isolate of PMWaV-1 contained 257 residues of the deduced amino acid. Analysis of the nucleotide and amino acid sequences exhibited their similarities to those of the US isolate of PMWaV-1, GenBank accession number AF414119, at 98 and 99 % identity. The expressed recombinant CP of Thai PMWaV-1 has molecular weight of 28.3 kilodaltons as determined by SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis.