



วิทยานิพนธ์

การตรวจสอบและการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค
ไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย

THE DETECTION AND COAT PROTEIN GENE EXPRESSION
OF PINEAPPLE MEALYBUG WILT-ASSOCIATED VIRUSES
(PMWAVS) IN THAILAND

นางสาวอัจฉราพร ศรีจุฑานุ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2549



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
ปริญญา

โรคพืช สาขา
โรคพืช ภาควิชา

เรื่อง การตรวจสอบและการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส
สาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย

The Detection and Coat Protein Gene Expression of Pineapple Mealybug
Wilt - associated Viruses (PMWaVs) in Thailand

นามผู้วิจัย นางสาวอัจฉราพร ศรีจุฑานุ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์อำไพวรรณ ภราดรวัฒน์, วท.ด.)

กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสรณ เจียมสมบัติ, Dr.Agr.)

กรรมการ (อ.บว. บิณ)

กรรมการ (รองศาสตราจารย์กวีศรี วานิชกุล, Dr.agr)

หัวหน้าภาควิชา (รองศาสตราจารย์ณรงค์ สิงห์บุระอุดม, M.S.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ๕ เดือน เมษายน พ.ศ. ๒๕๔๖

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจสอบและการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสสาเหตุ
โรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย

The Detection and Coat Protein Gene Expression of Pineapple Mealybug
Wilt - associated Viruses (PMWaVs) in Thailand

โดย

นางสาวอัจฉราพร ศรีจุฑานุ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
พ.ศ. 2549

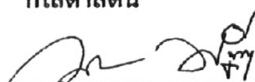
ISBN 974-16-1043-2

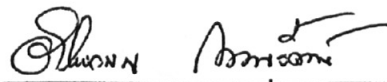
อัญญาพร ศรีจุฑา 2549: การตรวจสอบและการแสดงออกของยีนโปรตีนท่อหุ้มอนุภาคไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช ประสานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์อำไพวรรณ ภราดรวันน์, วท.ด.
66 หน้า

ISBN 974-16-1043-2

ตรวจสอบอาการผิดปกติของสับปะรดที่คล้ายกับอาการของโรคที่เกิดจากไวรัสโรคเหี่ยวคลอสเทลโรไวรัส (Pineapple mealybug wilt-associated viruses, PMWaVs) ในสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในแปลงปลูกจังหวัดเพชรบุรี พบอาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้บิด ใบด่างเหลืองอ่อนมีน้ำน้ำตาล และผลสับปะรดมีขนาดเล็กและอาการในสับปะรดจากแปลงที่นำมาปลูกไว้ในโรงเรือน 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 อาการผลจุกตาย และอาการใบด่างประ พันธ์นางแล 1 ตัวอย่าง (Nal1) และพันธุ์ปัตตาเวีย 3 ตัวอย่าง (Pbu1, Pbu2 และ Pbu3) แสดงอาการใบด่าง พันธุ์ภูเก็ต 1 ตัวอย่าง (Phu1) แสดงอาการผลไหม้ขนาดใหญ่ รวมทั้งมีพันธุ์ศรีราชา 4 ตัวอย่าง (H1, H2, H3, HO) ที่ไม่แสดงอาการผิดปกติหรืออาการของโรค พัฒนาวีธีตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวในตัวอย่างสับปะรดข้างต้น 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

เพิ่มปริมาณยีนโปรตีนท่อหุ้มอนุภาคไวรัส (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* DH5 α) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีน แล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis พบว่าโปรตีนท่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaV-1 จากสับปะรดของประเทศไทย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 28.3 กิโลดาลตัน


ลายมือชื่อนิสิต


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

20 / 56 / 2549

Atcharaporn Srijudanu 2006: The Detection and Coat Protein Gene Expression of Pineapple Mealybug Wilt-associated Viruses (PMWaVs) in Thailand. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Associate Professor Ampaiwan Paradornuwat, Ph.D. 66 pages.
ISBN 974-16-1043-2

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 and 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* DH5 α 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.

Atcharaporn Srijudanu Ampaiwan Paradornuwat 20 / 03 / 2006
Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. อำไพวรรณ ภราดร นุวัฒน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา ให้ทุนการศึกษาด้านการเรียน และในการทำงานวิจัย กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิสสุวรรณ เจริญสมบัติ กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก อาจารย์ ดร. ศรีเมฆ ชาวโพรงพาง กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รศ.ดร. กวิศร์ วานิชกุล กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่ให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ตลอดจนตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องจนกระทั่งวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ประภา ศรีพิจิตต์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. นิพนธ์ ทวีชัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ สารเคมี ในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณดวงแข กาญจนโสภณ ที่ให้คำปรึกษาการวางแผน และขั้นตอนของการทำงานวิจัยทดลอง

ขอขอบพระคุณ ดร.วันเพ็ญ ศรีทองชัย ดร.เกลียวพันธุ์ สุวรรณรักษ์ กรมวิชาการเกษตร บริษัท อาหารสยาม จำกัด ดร.ศาลักษณ์ พรรณศิริ ศูนย์เครื่องมือและวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และสำนักงานเกษตรจังหวัดภูเก็ต และภานุภา อยู่อุ่นพะเนา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างสับปะรดเพื่อใช้ในการวิจัย ขอขอบคุณ คุณสุวรรณา กลัดพันธุ์ ศูนย์เครื่องมือและวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ได้อนุเคราะห์แอนติซีรั่ม anti PiWV จากประเทศออสเตรเลีย

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ซึ่งได้สนับสนุนเงินทุนสนับสนุนงานวิจัยภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี พ.ศ. 2548

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้ให้ความรัก กำลังใจ และการสนับสนุน การศึกษามาโดยตลอด ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ สมาชิกทุกคนของห้องปฏิบัติการ 523 ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

อัจฉราพร ศรีจุฑานุ

มีนาคม 2549

สารบัญ

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	33
สรุป	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	62
ภาคผนวก	65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สัปปะรดแสดงอาการผิดปกติในลักษณะต่างๆ ที่คล้ายอาการของโรคเหี่ยว ซึ่งเกิดจากโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสัปปะรด	35
2	ผลการตรวจสอบตัวอย่างสัปปะรดเป็นโรคด้วยวิธี RT-PCR	40

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างจีโนมของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เป็น single strand, positive-sense RNA แสดงส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดต่าง ๆ จากปลาย 5' ไปสู่ปลาย 3'	13
2	ต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ปลูกในจังหวัดเพชรบุรีแสดงอาการผิดปกติคล้ายไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด	36
3	อาการผิดปกติของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ที่เกิดจากการเข้าทำลายของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด	37
4	อาการผิดปกติที่เกิดจากการเข้าทำลายของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด	38
5	แผนที่แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการโคลนยีนและการเพิ่มปริมาณยีน HSP 70 ด้วยวิธี RT-PCR	42
6	ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน HSP 70 ของ PMWaV-1 (590 คู่เบส) และ PMWaV-2 (610 คู่เบส) ด้วยวิธี One-step RT-PCR จากตัวอย่างสับปะรดที่มาจากแหล่งเพาะปลูกจังหวัดชลบุรี บน 0.7% TBE agarose gel	43
7	ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน HSP 70 ของ PMWaV-1 (590 คู่เบส) และ PMWaV-2 (610 คู่เบส) ด้วยวิธี Two-step RT-PCR จากตัวอย่างสับปะรดที่มาจากแหล่งเพาะปลูกต่างๆ ในประเทศไทยบน 0.7% TBE agarose gel	44
8	การเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HSP70 ของเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด PMWaV-1 ที่อยู่ใน pGEM-T Easy แสดงตำแหน่งการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม VECTOR NTI (Invitrogen)	46
9	การเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HSP70 ของเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด PMWaV-2 ที่อยู่ใน pGEM-T Easy แสดงตำแหน่งการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยโปรแกรม VECTOR NTI (Invitrogen)	47
10	ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยพลาสมิดสายผสม pGEM-T Easy/CP ของ PMWaV-1 ที่แยกได้จากสับปะรด และย่อยด้วยเอนไซม์ EcoRI พบแถบดีเอ็นเอขนาด 941 คู่เบส บน 1% TBE agarose gel	49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
11	ผลการวิเคราะห์พลัสไมด์สายผสม pGEM-T Easy/CP ของ PMWaV-1 ที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Pv1CP1E/Pc1CP2S พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 771 คู่เบส เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย 0.8% TBE agarose gel	50
12	เปรียบเทียบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน CP ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ระหว่าง Thailand isolated ที่สกัดได้จากสับประรดพันธุ์ศรีราชา Chb1-KU จังหวัดชลบุรี ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEX-2T Expression vector และ US isolated (AF283103) ด้วยโปรแกรม VECTOR NTI (Invitrogen) ขนาด 774 นิวคลีโอไทด์ พบว่า ต่างกัน 8 ตำแหน่ง คิดเป็น 98 % identity	52
13	การเรียงตัวของกรดอะมิโนแอซิดใน CP gene ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ที่สกัดได้จาก Thailand isolated สับประรดพันธุ์ศรีราชา Chb1-KU จังหวัดชลบุรี โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ขนาด 255 เรซิดิวส์ พบว่า ต่างกัน 1 ตำแหน่ง คิดเป็น 99 % identity	53
14	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน CP gene ของไวรัส PMWaV-1 ในเวกเตอร์ pGEX-2T Expression vector รีคอมบิแนนท์โปรตีน pW772/CP1 S-E โคลนที่ 1.5 ที่ผลิตได้ในระบบแบคทีเรีย <i>Escherichia coli</i> สายพันธุ์ DH5 α บน 15% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	55
15	การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากโคลน GST induced (2 ชม.) และ GST-CP1 (pW772/CP1 S-E 1.5) induced (2 ชม.) ในอัตราเจือจางต่างๆ เปรียบเทียบกับน้ำคั้นจากพืชเป็นโรค โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีของ anti-PMWaV-1 ชนิด supernatant (Agdia, สหรัฐอเมริกา) ในอัตรา 1:10 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิค Dot blot analysis	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากโคลน GST induced (2 ชม.) และ GST-CP1 (pW772/CP1 S-E 1.5) induced (2 ชม.) T ₂ ในอัตราเจือจางโปรตีน : บัฟเฟอร์หนึ่งฆ่าเชื้อต่าง ๆ เปรียบเทียบกับน้ำคั้นจากพืชเป็นโรค โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี anti-PMWaV-1 ในอัตรา 1:10,000 มิลลิตร) ด้วยเทคนิค Dot blot analysis	58

สารบัญภาพผนวก

ภาพผนวกที่		หน้า
1	แผนที่แสดงตำแหน่งตัดจำเพาะต่าง ๆ และยีนที่สำคัญบนพลาสมิด pGEX-2T 6xHis- tag Expression vector	66

การตรวจสอบและการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยว ของสับปะรดในประเทศไทย

The Detection and Coat Protein Gene Expression of Pineapple Mealybug Wilt-associated Viruses (PMWaVs) in Thailand

คำนำ

สับปะรด (pineapple) เป็นไม้ผลในตระกูลสับปะรด (Bromeliad family) หรือวงศ์ Bromeliaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ananas comosus* (L.) Merr. เป็นผลไม้ที่มีรสหวานอมเปรี้ยวเล็กน้อย จึงได้รับความนิยมอย่างสูง นิยมรับประทานในลักษณะของผลสด สับปะรดมีถิ่นอยู่ในแถบอเมริกาใต้ ในประเทศไทยเริ่มมีการนำสับปะรดมาทดลองปลูกครั้งแรกเมื่อปี พุทธศักราช 2456 โดยแขกปาตาน้นำสับปะรดพันธุ์ “ปัตตาเวีย” หรือ สับปะรดพันธุ์ศรีราชาพันธุ์ปรานบุรี หรือพันธุ์สามร้อยยอด เข้ามาปลูกที่อำเภอปรานบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ พันธุ์ดังกล่าวมาจากเกาะปีนัง หรือเกาะหมาก ประเทศมาเลเซียในปัจจุบัน (สุรินทร์, 2544) หลังจากนั้น 7-8 ปี ต่อมา สับปะรดพันธุ์ดังกล่าวได้แพร่ขยายไปยังพื้นที่ใกล้เคียง ปัจจุบันพื้นที่เพาะปลูกของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียส่วนใหญ่จึงอยู่ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดเพชรบุรี เกษตรกรนิยมปลูกพันธุ์ปัตตาเวียมาก เนื่องจากสามารถขายในลักษณะของผลเพื่อรับประทานผลสด และสำหรับส่งโรงงานอุตสาหกรรมทำสับปะรดกระป๋องเพื่อส่งออก ที่สามารถทำรายได้เข้าประเทศปีละหลายล้านบาท สับปะรดถือได้ว่าเป็นผลไม้เศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ที่ได้รับการส่งเสริมให้ปลูกกันมากขึ้น อย่างไรก็ตามการเพาะปลูกสับปะรดพันธุ์ดังกล่าวมักประสบปัญหาสำคัญ โดยเฉพาะโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (Pineapple mealybug wilt : PMW) ซึ่งมีสาเหตุจากไวรัสพืช *Pineapple mealybug wilt-associated viruses* (PMWaVs) ทำให้เกิดความเสียหายแก่พื้นที่ปลูกเป็นจำนวนมาก การควบคุมโดยวิธีกำจัดโรคไวรัสนี้ให้หมดไปทำได้ยากเนื่องจากโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดมีการถ่ายทอดโรคโดยมีแมลงพวกเพลี้ยแป้ง ชนิด *Pseudococcus brevipes* หรือชนิด *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) เป็นพาหะ และมีมดหัวโต (*Solenopsis geminata* และ *Pheidole megacephala*) เป็นตัวนำพาเพลี้ยแป้ง (ชำนานู และคณะ, 2542; Beardsley, 1993; Ronald, 2005) ทำให้โรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น และกำลังแพร่ระบาดหนักในแหล่งเพาะปลูกสับปะรดที่สำคัญของประเทศไทยในขณะนี้ ดังนั้นหากมีการระบาดของโรคนี้ในแปลงจะทำให้เกิดความสูญเสียได้อย่างสูง (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2547)

นอกจากนี้การปลูกสับปะรดในประเทศไทยนิยมใช้หน่อ ตะเกียง และจุกเป็นส่วนขยายพันธุ์ และไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรด สามารถติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ดังกล่าวได้ ซึ่งทำให้การแพร่ระบาดของโรคเป็นไปอย่างกว้างขวางและรวดเร็วเช่นเดียวกัน

ดังนั้นการตรวจสอบและการวินิจฉัยโรคไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดด้วยวิธีการที่รวดเร็วและแม่นยำ ทั้งสำหรับส่วนที่จะนำไปขยายพันธุ์เพื่อการเพาะปลูก และสำหรับแปลงปลูกของเกษตรกรหรือแปลงปลูกเพื่ออุตสาหกรรมในระยะแรกเริ่มของการปลูก เพื่อให้การควบคุมโรคและการแพร่ระบาดของโรคมีประสิทธิภาพ เพื่อช่วยลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นนั้นจึงมีความสำคัญต่ออาชีพของเกษตรกรและอุตสาหกรรมสับปะรดของประเทศ

การวิจัยทดลองนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาวิธีการด้านเทคโนโลยีชีวภาพ หรือเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล ที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานการตรวจสอบโรคหรือการติดโรคของตัวอย่างสับปะรดจำนวนมากได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษารายละเอียดของการเกิดโรค และอาการของโรคเหี่ยวของสับปะรด ตลอดจนการก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตของสับปะรดพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าในแหล่งปลูกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ
2. เพื่อศึกษาวิธีการตรวจสอบและจำแนกชนิดไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวด้วยเทคนิค RT-PCR
3. เพื่อโคลนยีนและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรดในประเทศไทย
4. ศึกษาการแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส PMWaVs ในระบบแบคทีเรีย *E. coli*

การตรวจเอกสาร

สับปะรด

สับปะรด (pineapple; *Ananas comosus* (L.) Merr; syn., *A. sativus* Schult. F., *Ananassa sativa* Lindl., *Bromelia ananas* L., *B. comosa* L.) ชื่อสามัญว่า pina สเปน) abacaxi (โปรตุเกส) ananas (เนเธอร์แลนด์, ฝรั่งเศส) เป็นไม้ผลในวงศ์สับปะรด หรือวงศ์ Bromeliaceae ในสกุลต้นแบบ คือ *Bromelia* ที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Ananas* (*A. bracteatus* (Brazil), *A. arvensis*, *A. comosus*, *A. erectifolius*, *A. genesio-linesii*, *A. guaraniticus* (Argentina, Paraguay), *A. guaraniticus*, *A. macrodontes*, *A. microcephalus*, *A. mordilona*, *A. pancheanus* (Columbia), *A. parguazensis*, *A. pyramidalis*, *A. sativus* (tropical America), *A. strictus*, *A. viridis*) ได้แก่ สับปะรด (pineapple; *A. comosus*) เป็นพืชล้มลุกอายุหลายปี (herbaceous perennial) อาจเป็นพืชบก (terrestrial plant) ที่ทนแล้งได้ดี เพราะใบมีเนื้อเยื่อเก็บสะสมน้ำ หรือเป็นพืชอิงอาศัย (epiphyte) ใบมีขนาดใหญ่แข็งและหนา (tough leaves) รูปแหลม เรียวยาวออกเป็นพุ่ม (rosette) มีกลุ่มใบขนาดเล็กที่เกิดเป็นจุก (crown) อยู่บนยอดของผล ผล (pseudocarp fruit) เป็นผลรวมที่ประกอบด้วยผลย่อยที่เป็นผลเดี่ยวแบบมีเนื้อ (หลายเมล็ด) จำนวน 100–200 ผล อัดและเชื่อมกันสนิทอยู่บนแกนหรือก้านช่อดอก ผลรูปร่างกลม ทรงกระบอก เรียวยาว หรือรูปถังเบียร์ ขนาดเล็กประมาณ 0.5 กิโลกรัม ขนาดใหญ่ประมาณ 3.5 กิโลกรัม มีดอกแบบสมบูรณ์เพศ เมื่อผสมติดเมล็ดก็ขยายพันธุ์ต่ออีก หน่อ (sucker) เป็นส่วนยอดที่เกิดจากลำต้นจริง หน่อตะเกียง (slip) งอกมาจากลำต้นใต้ผล หน่อตะเกียงที่ติดอยู่กับต้นเดิมจะไม่ออกผล และงอกราก สับปะรดขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้

พันธุ์สับปะรดที่ปลูกเป็นการค้า

ประเทศไทยมีพันธุ์สับปะรดที่รับประทานผลสดและมีการปลูกเป็นการค้าแบ่งออกได้เป็น 5 กลุ่ม คือ Smooth Cayenne, Queen, Red Spanish, Abacaxi และ Pernambuco ใน 5 กลุ่มนี้ 3 กลุ่มแรก คือ Smooth Cayenne, Queen และ Red Spanish มีความแตกต่างกันทางด้านรูปร่างลักษณะค่อนข้างชัดเจน และมีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่สม่ำเสมอว่ากลุ่ม 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 ใบมีสีเขียวเข้มด้านบน เป็นมัน และมักมีเหลืองสีแดงในฤดูที่มีแสงแดดจัด ผลมีรูปร่างค่อนข้างทรงกระบอก แต่ถ้าผลมีขนาดใหญ่ก็จะมีส่วนปลายผลเล็กกว่าส่วนโคน (conical shape) น้ำหนักของผลประมาณ 1.0–2.5 กิโลกรัม เนื้อข้างในมีสีเหลือง มีเส้นใย (fiber) ปานกลาง มีปริมาณกรด 0.3–0.7 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณน้ำตาล 12–16 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะประจำพันธุ์ดั้งเดิมจะมีตะเกียง 1–2 ตะเกียง แต่ในสภาพแวดล้อมของประเทศไทยมักไม่สร้างตะเกียง ตัวอย่างของสับปะรดในกลุ่มนี้ในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์ปัตตาเวีย (กัลกัตตา หรือ สมุทรแคยีน) หรือสับปะรดศรีราชา และพันธุ์นางแล (จินดารัฐ, 2541)

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

กลุ่ม Red Spanish: สับปะรดในกลุ่มนี้มีขนาดของต้นและผลอยู่ระหว่างกลางของ Cayenne และ Queen แต่ใบบางกว่าพันธุ์ปัตตาเวีย ขอบใบมีหนามแหลมรูปโค้งงอ ผลมีรูปร่างกลม น้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 1.0–1.5 กิโลกรัม ตาขนาดของตาใหญ่กว่าพวก Cayenne เนื้อข้างในมีสีเหลืองจาง และมีปริมาณ fiber ปานกลาง แก่นผลเหนียว กลิ่นและรสแตกต่างออกไปจากสองกลุ่มแรก ตัวอย่างของสับปะรดในกลุ่มนี้ในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์อินทรีชิต (เทพรส หรือ อินทรีชิตแดง) พันธุ์ขาว (อินทรีชิตขาว) (จารุพันธ์, 2526; จินดารัฐ, 2541)

ความสำคัญทางเศรษฐกิจของสับปะรด

ประเทศไทยจัดได้ว่าเป็นแหล่งเพาะปลูกสับปะรดที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก จากสถิติในปี พ.ศ. 2547 ประเทศไทยส่งออกสับปะรดในรูปผลิตภัณฑ์ต่างๆ ปริมาณสูงถึง 624,127 เมตริกตัน คิดเป็นมูลค่า 17,951.08 ล้านบาท และส่งออกสับปะรดในรูปผลสดคิดเป็นมูลค่า 50.34 ล้านบาท พื้นที่เพาะปลูกและเก็บเกี่ยวสับปะรดมีประมาณ 552,302 ไร่ ผลผลิตรวม 1.9 ล้านเมตริกตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2548) พันธุ์ที่นิยมปลูกกันมาก ได้แก่ พันธุ์ปัตตาเวีย หรือพันธุ์สมุทรแคยีน

แหล่งเพาะปลูกของสับปะรดที่สำคัญต่าง ๆ ในประเทศไทย

เนื่องจากสับปะรดเป็นพืชที่ทนทานต่อสภาพแห้งแล้งได้ดี ชอบดินร่วนปนทราย ดินค่อนข้างเป็นกรด สามารถเจริญเติบโตได้ดีในเขตร้อน 30 องศาเหนือและ 30 องศาใต้ ไม่ทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูงจนถึงจุดน้ำค้างแข็ง พื้นที่เพาะปลูกสับปะรดส่วนใหญ่จึงอยู่ใกล้ชายทะเลซึ่งมีอุณหภูมิและความชื้นไม่แปรปรวนมากนัก แต่ในเมืองไทยแล้วสามารถเพาะปลูกได้ทุกภาค (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2520) พื้นที่เพาะปลูกและเก็บเกี่ยวสับปะรดมีปริมาณสูงขึ้นทุกปี พื้นที่เพาะปลูกสับปะรดทั่วประเทศไทย ที่แบ่งตามปริมาณผลผลิตที่ป้อนสู่โรงงาน ดังนี้ 1) เขตที่ 1 ทางภาคตะวันตก ในเขตจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดเพชรบุรี มีการปลูกพันธุ์ปัตตาเวียกันมาก และมีสับปะรดเกินความต้องการของโรงงาน 2) เขตที่ 2 มีสับปะรดไม่เพียงพอต่อความต้องการของโรงงานส่วนใหญ่มักบริโภคผลสด คือ ภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดชลบุรี (ศรราชา) จังหวัดระยอง และภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดลำปาง และจังหวัดเชียงราย และ 3) เขตที่ 3 คือขาดแคลนสับปะรดป้อนโรงงานอย่างรุนแรง ทางภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดภูเก็ต สำหรับพันธุ์ภูเก็ต (สวี) ปลูกกันมากทางภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดภูเก็ต (ปลูกที่อำเภอหลังสวน และอำเภอสวี) เป็นพันธุ์ที่นำเข้ามาจากประเทศมาเลเซีย (จินดารัฐ, 2541) และพันธุ์ภูเก็ต ปลูกมากบริเวณภาคใต้ ได้แก่ ภูเก็ต พังงา และชุมพร อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมสับปะรดกระป๋องยังคงประสบปัญหาด้านวัตถุดิบซึ่งมีปริมาณไม่แน่นอน คุณภาพและขนาดของสับปะรดกระป๋องไม่ตรงตามความต้องการของโรงงาน ขณะเดียวกันปัญหาเรื่องไวรัสโรคเหี่ยวในสับปะรดเป็นปัญหาสำคัญที่กำลังประสบอยู่ในแหล่งปลูกทางภาคตะวันออก ทำให้ไม่สามารถเก็บผลผลิตได้

ไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรด

ไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคของสับปะรด ได้แก่ Badnavirus และ Tomato spotted wilt virus ในแหล่งผลิตสับปะรดปัตตาเวียพันธุ์ ส่งโรงงานในเขตจังหวัดชลบุรี จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์นั้น โรคที่สำคัญและทำความเสียหายแก่สับปะรดอย่างหนึ่ง คือ โรคเหี่ยวของสับปะรด (Pineapple mealybug wilt; PMW) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Pineapple mealybug wilt-associated viruses* (PMWaVs) จากรายงานการค้นพบโรคเหี่ยว (mealybug wilt) ครั้งแรกในฮาวาย ประมาณปี ค.ศ. 1910 โดย Larsen (Carter , 1933; Carter, 1951) ซึ่งมีสมมุติฐานว่าลักษณะอาการของโรคเหี่ยวของสับปะรด น่าจะเกิดจากการดูดน้ำเลี้ยงของแมลงพวกเพลี้ยแป้ง (*Dysmicoccus brevipes* (Cockerell)) ในช่วงอายุพืชที่มีความแตกต่างกัน ต่อมาพบโรคนี้ในเม็กซิโก เปอร์โตริโก ศรีลังกา และอีกหลายประเทศทั่วโลก และนอกจากนี้ยังพบว่าการที่สับปะรดได้รับปุ๋ยไนโตรเจนมาก จะทำให้เพลี้ยแป้งมาดูดกินน้ำเลี้ยงที่ต้นพืชมาก ทำให้สับปะรดปรากฏลักษณะอาการของโรคเหี่ยวเพิ่มขึ้น หรืออาจเกิดจากมีเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดเข้าทำลาย (Hu et al., 1997) ต่อมาเมื่อ Carter (1932, 1944a, 1944b, and 1951) ได้ศึกษาอาการ

ของโรคเหี่ยวและโรคใบจุดเหี่ยวของสับปะรดและศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะอาการดังกล่าวอีก พบว่าเพลี้ยแป้ง (*Dysmicoccus* sp.) และไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (Pineapple wilt virus: PiWV; *Pineapple mealybug wilt-associated viruses*: PMWaVs) เป็นสาเหตุของอาการเหี่ยว (mealybug wilt) และอาการจุดเหี่ยว (green spot) ของสับปะรด โดยสร้างความเสียหายให้กับการเพาะปลูกสับปะรดที่รัฐฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นอย่างมาก โรคเหี่ยวที่เกิดจากการทำลายของเพลี้ยแป้งนี้เป็นโรคที่ร้ายแรง และมีการระบาดแพร่หลายในแหล่งปลูกสับปะรดใหญ่ๆ หลายแห่ง เช่น ฮาวาย เม็กซิโก เปอร์โตริโก (Carter 1944a, 1944b, and 1951) คิวบา (Boroto,1998) ออสเตรเลีย (Wakman,1995) รวมทั้งในประเทศไทย สุวรรณและคณะ (2536) ได้สำรวจและบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี พบว่าในแปลงที่เพาะปลูกสับปะรดที่อายุ 1 ปีที่ผ่านการบังคับให้ต้นสับปะรดออกดอกด้วยสารเคมีนั้นพืชจะแสดงอาการของโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากเชื้อไวรัส PMWaV ให้เห็นชัดเจน และปริมาณของต้นเป็นโรคมียาจำนวนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ยังไม่บังคับให้ออกดอกหรือต้นที่มีอายุน้อย

สมบัติของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรด PMWaVs

ลักษณะอาการ

สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย อาการเริ่มแรกปรากฏที่ระบบรากซึ่งเป็นส่วนที่อยู่ใต้ดิน ทำให้สังเกตเห็นได้ยาก โดยระบบรากจะหยุดการเจริญเติบโต และเน่าตายไป หลังจากนั้นจึงจะสังเกตเห็นอาการที่ใบ โดยใบวงที่ 3-4 จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมชมพู ปลายใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือมีรอยแผลแห้งและม้วนเข้า ความเต่งของใบลดลง (จินดารัฐ, 2541) ต่อจากนั้นใบวงที่ 4 และ 5 มีมุมชันลดลง ขนาดของต้นจะเล็กกว่าปกติ ระยะต่อไปใบส่วนยอดจะตั้งตรงมากขึ้น แต่มีความเต่งน้อยกว่าปกติ ปลายใบแห้งและม้วนลง สีของใบเหล่านี้จะเปลี่ยนเป็นสีเขียวซีด สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียเป็นพันธุ์ที่อ่อนแอต่อโรคนี้ แสดงอาการใบอ่อนนิ่มมีสีเขียวหรือเหลือง ปลายใบแห้ง ภายในเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดง ลามเข้าสู่โคนใบ ใบร่วงและแผ่นใบไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตาย รากกุด ผลสับปะรดหยุดการเจริญเติบโตและเก็บเกี่ยวผลผลิตไม่ได้ ลำต้นสับปะรดที่แข็งแรงและการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจะแสดงอาการของโรคได้เร็วและชัดเจนกว่าต้นที่มีการเจริญเติบโตช้า (Carter, 1933)

ความคงทนในน้ำคั้น

ความคงทนต่อความร้อน (Thermal inactivation point, TIP) 16-55

องศาเซลเซียส, 40-49 องศาเซลเซียส

ความคงทนเมื่อทำให้เจือจาง (Dilution end point, DEP) $\log 10^{-3} - 10^{-5}$

ความคงทนในสภาพอุณหภูมิห้อง (Longevity in vitro, LIV) 1-5 วัน ค่าการ
ล่อยตัวใน CsSO_4 เท่ากับ 1.2 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ค่าการล่อยตัวใน CsSO_4 เท่ากับ 1.2 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ค่าการ
ตกตะกอน 110-125-140 S , 80-85-90 S , A_{260}/A_{280} ratio เท่ากับ 1.44-1.61-1.73

พืชอาศัยและพืชทดสอบ

พืชอาศัยและพืชทดสอบของเชื้อไวรัส PMWaVs ได้แก่ สับปะรด (*A. comosus*)
ทำให้ใบอ่อนแสดงอาการเหลือง อ่อนนิ่ม ปลายใบไหม้เป็นสีน้ำตาล และพืชเหี่ยวตายในที่สุด
อาการเกิดขึ้นกับพืชทั้งต้น (whole plants)

การถ่ายทอดโรค

PMWaVs ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีสัมผัสหรือผ่านเมล็ด แต่ถ่ายทอดได้ดีด้วย
แมลงพวกเพลี้ยแป้ง แมลงที่เป็นพาหะในสับปะรด มี 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยแป้งสีชมพู
(*Dysmicoccus brevipes*) เพลี้ยแป้งสีเทา (*Dysmicoccus neobrevipes*) และ longtail mealybug
(*Pseudococcus longispinus*) อยู่ในวงศ์ *Pseudococcidae* (Carter, 1933; Beardsley, 1993)
Bos (1999) รายงานว่า Beet yellows virus (BYV) ไม่ถ่ายทอดโรคด้วยวิธีกล (mechanical
transmission) ในธรรมชาติส่วนใหญ่แพร่ระบาดโดยแมลงพาหะ ได้แก่ เพลี้ยอ่อน (aphids)
เพลี้ยแป้ง (mealybug) เพลี้ยไก่แจ้ (psyllids) และแมลงหมีขาว (*Trialeurodes*) เชื้อสาเหตุมี
ความสัมพันธ์กับแมลงในลักษณะ semi-persistent ระยะก่อนวางไข่ (prior starvation period)
เพลี้ยแป้ง 1 ตัว มีช่วงระยะเวลารับเชื้อ (acquisition feeding period) นาน 5 - 7 ชั่วโมง ช่วง
ระยะเวลาฟักตัวของเชื้อ นาน 48-72 ชั่วโมง (2 ถึง 3 วัน) (Sether and Hu , 2002a, 2002b)
และช่วงระยะเวลาก่อโรคเชื้อ นาน 15 วินาที หรือน้อยกว่านั้น ถ้าเพิ่มระยะเวลาเป็น 3-4
ชั่วโมง ก็จะเพิ่มความสามารถในการเกิดโรคได้ดีขึ้น (ศิริพรรณ, 2538; Walkey, 1991) รวมมี
ระยะเวลาการถ่ายทอดเชื้อไวรัส 3 ถึง 4 วัน เพลี้ยแป้งตัวอ่อน (nymphs) ถ่ายทอดโรคไวรัสได้
ดีกว่าตัวเต็มวัย (adults) ลักษณะอาการที่เกิดจากแมลงพวกเพลี้ยแป้ง (*Dysmicoccus* sp.) ที่
เป็นสาเหตุทำให้ต้น สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ปลูกเป็นการค้า แสดงอาการของโรคเหี่ยวอย่าง
ชัดเจน (Ronald, 2005) คือ 1) ลักษณะอาการที่คาดว่าเป็นไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจาก
มีแมลงพวกเพลี้ยแป้งเป็นพาหะนำโรคไวรัส อาการที่พบคือ สับปะรดแสดงอาการความเต่งของ
ใบลดลง ปลายใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือมีรอยแผลแห้ง และม้วนเข้า ปลายใบแห้ง ลูกกลามมาสู่

โคนใบ (mealybug wilt และ edge-wilt) 2) อาการโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เกิดจากมีเพลี้ยแป้งดูดน้ำเลี้ยงของต้นสับปะรดเป็นระยะเวลานาน และไม่ถ่ายทอดเชื้อไวรัส คือ สับปะรดแสดงอาการใบด่าง ใบมีจุดประสีเหลืองอ่อนสลับสีเขียว 3) อาการที่เกิดจากประชากรของเพลี้ยแป้งจำนวนมากดูดน้ำเลี้ยงของสับปะรด ทั้งที่พบกลุ่มของเพลี้ยแป้งดูดน้ำเลี้ยงบริเวณฐานใบสีขาวที่อยู่ติดกับราก แสดงอาการแผลจุดแห้งตาย แผลยุบตัวอ่อนนุ่มมีสีน้ำตาล และถ้าพบกลุ่มประชากรของเพลี้ยแป้งจำนวนมากทำลายที่ผล สับปะรดแสดงอาการผลมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆ (rotting หรืออาการ leaking of fruits) 4) อาการ mealybug stripe เป็นอาการเฉพาะจุด คือ อาการที่เกิดจากเพลี้ยแป้งจำนวน 3-4 ตัว มาดูดน้ำเลี้ยงของสับปะรด และไม่ถ่ายทอดเชื้อไวรัส สับปะรดแสดงอาการใบเปลี่ยนจากสีเขียวชืดเป็นสีเหลืองอ่อน เกิดอาการใบด่างขีด (streak) เกิดแผลยุบตัวระหว่างรอย streak

การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (parthenogenesis) ของเพลี้ยแป้ง เริ่มจากไข่ (eggs) ฟักออกมาเป็นตัวอ่อนในระยะแรก (first larval instar) เป็นเพศเมีย (female) ทั้งหมด ให้กำเนิดเพศเมีย (female) โดยปราศจากการผสมพันธุ์กับเพศผู้ (male) เรียกว่า “crawlers” ประมาณ 1,000 ตัว และถ้าในประชากรที่ฟักออกมาใหม่นั้น เกิดทั้งเป็นเพศผู้ (male) และเพศเมีย (female) ก็จะพบการขยายพันธุ์ของเพลี้ยแป้งทั้งสองแบบ และให้กำเนิดลูกที่เป็นทั้งสองเพศ คือ 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 จากการสำรวจพบว่าเพลี้ยแป้งสีชมพูอาศัยอยู่บริเวณลำต้นส่วนล่างที่อยู่ติดกับผิวดิน ตรงบริเวณฐานใบสีขาวของสับปะรด (white portion) พืชอาหารของเพลี้ยแป้งสีชมพูที่พบอีก ได้แก่ น้อยหน่า กล้วย ผักขึ้นฉ่าย ส้ม กาแฟ ฝ้าย Euphorbia Gliricidia ชบา (Hibiscus) Hilo grass ต้นหม่อน หนุ่ย natal soursop หนุ่ย nutgrass กล้วยไม้ สับปะรด และ Straussia (Ronald, 2005) และเพลี้ยแป้งสีเทามักจะอาศัยอยู่บริเวณส่วนจุกและผลของสับปะรด ในขณะที่ longtail mealybug ไม่อาจจะบุพืชและตำแหน่งอาศัยได้ ในประเทศไทย longtail mealybug ไม่ระบุว่ามดพาเคลื่อนย้ายอีกด้วย (ชำนาญ, 2542; Ronald, 2005) จึงอาจไม่ใช่แมลงพาหะที่สำคัญของโรค

การจัดจำแนกไวรัสในวงศ์ Closteroviridae

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) ประกอบด้วย กรดนิวคลีอิก 5 เพอร์เซ็นต์ โปรตีน 95 เพอร์เซ็นต์ ไม่มีลิปิดเป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีการจำแนกออกเป็น 2 จินัส ตามจำนวนของ genomic RNA ดังนี้ ได้แก่ จินัส *Closterovirus* มีจีโนมเป็นแบบ monopartite genome โดยมี Beet yellows virus (BYV) เป็น type member ในธรรมชาติส่วนใหญ่แพร่ระบาดโดยแมลงพาหะ และการจำแนกชนิดไวรัสตามแมลงพาหะที่ถ่ายทอด มีกลุ่มของไวรัสที่จำแนกชนิดแล้ว ดังนี้ ไวรัสที่ถ่ายทอดโดยแมลงพวกเพลี้ยอ่อน (aphids) ได้แก่ Beet yellow stunt virus (BYSV), Burdock yellows virus (BuYV), Carnation necrotic fleck virus (CNFV), Carrot yellow leaf virus (CYLFV), Citrus tristeza virus (CTV) และ Wheat yellows leaf virus (WYLV) ที่ถ่ายทอดโดยแมลงพวกเพลี้ยแป้ง (mealybug) ได้แก่ Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), Little cherry virus (LChV) ที่ถ่ายทอดโดยแมลงหมีขาว (white fly) ได้แก่ Beet pseudo yellows virus (BPYV) และกลุ่มที่ยังไม่ทราบชนิดของแมลงพาหะ ได้แก่ Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2) กลุ่มที่จัดเป็นสปีชีส์ชั่วคราว (tentative species) ที่ถ่ายทอดโดยแมลงพวกเพลี้ยอ่อน (aphids) ได้แก่ Broad bean severe chlorosis virus, Clover yellows virus (CYV), *Dendrobium* vein necrosis virus (DVNV), Heracleum virus 6 (HV-6) ไวรัสที่ถ่ายทอดโดยแมลงพวกเพลี้ยแป้ง (mealybug) ได้แก่ Grapevine stem pitting associated virus, Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 (PMWaV-1) และ Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 (PMWaV-2) Sugarcane mild mosaic virus (SMMV) ไวรัสที่ถ่ายทอดโดยแมลงหมีขาว (white fly) ได้แก่ Cucumber chlorotic spot virus (CCSV), *Diodia* vein chlorosis virus (DVCV) และที่ยังไม่ทราบพาหะ ได้แก่ Alligatorweed stunting virus (AWSV), Cassia severe mosaic virus, *Festuca* necrosis virus (FNV), Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1), Grapevine leafroll-associated virus 4 (GLRaV-4), Grapevine leafroll-associated virus 5 (GLRaV-5), Grapevine leafroll-associated virus 6 (GLRaV-6) และ Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7) Megakepasma mosaic virus (MeMV) และ Peat yellow leaf virus

ต่อมา การจำแนกของ Domrachev *et al.* (2002) แบ่ง Closteroviridae ออกเป็น 3 จินัส คือ จินัส *Ampelovirus* ประกอบด้วยสมาชิก ได้แก่ Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1), Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3), Grapevine leafroll-

associated virus 4 (GLRaV-4), Grapevine leafroll-associated virus 5 (GLRaV-5), Grapevine leafroll-associated virus 6 (GLRaV-6) และ Grapevine leafroll-associated virus 8 (GLRaV-8), Little cherry virus 2 (LChV-2), Pineapple mealybug wilt-associated virus 1 (PMWaV-1), Pineapple mealybug wilt-associated virus 2 (PMWaV-2) และ Plum bark necrosis stem pitting virus จีโนส *Closterovirus* ประกอบด้วยสมาชิก ได้แก่ Apricot stem pitting associated virus, Beet yellow stunt virus (BYV), Citrus tristeza virus strain T36 (CTV-strain T36), Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2), Grapevine rootstock stem lesion associated virus และ Olive leaf yellowing associated virus ส่วนจีโนส *Crinivirus* ประกอบด้วยสมาชิก ได้แก่ Beet pseudo-yellows *closterovirus* (BPYV), Clover yellows virus (CYV), Cucurbit yellow stunting disorder virus, Lettuce infectious yellows virus, Potato yellow vein virus, Strawberry pallidosis associated virus, Sweet potato chlorotic stunt virus, Sweet potato sunken vein virus, Tomato chlorosis virus และ Tomato infectious chlorosis virus และกลุ่มที่จัดเป็นสปีชีส์ชั่วคราว (unassigned species) ได้แก่ Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7) และ Little cherry virus (LChV-1)

หน้าที่และโครงสร้างยีนของไวรัสในจีโนส *Closterovirus*

เชื้อไวรัสที่อยู่ในจีโนส *Closterovirus* มีจีโนมเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวแบบเส้นบวก (single stranded, positive sense RNA) มีทั้งที่เป็นแบบ monopartite และ bipartite มีขนาดจีโนมยาวประมาณ 700–2,000 นาโนเมตร ตำแหน่งแปลรหัสจากตำแหน่ง 5' ไป 3' มีการแสดงออกของโปรตีน ORF1a และ ORF1b แปลรหัส (translated) มาจาก genomic RNA ในขณะที่ ORF2 เป็นต้นไปจนกระทั่งสุดท้าย ORF 10 จะแปลรหัสมาจากโปรตีนย่อย subgenomic RNA ประกอบด้วยยีนซึ่งสังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่ ดังนี้

ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ Replicase enzyme เริ่มแปลรหัสเป็นโปรตีนจาก ORF1a ซึ่งให้ product คือ papain-like protease, methyltransferase และ helicase และ ORF1b จะเริ่มแปลรหัสจาก frame +1 ของ ORF1a (ribosomal frameshift) ให้ product คือ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) จาก ORF1a จนกระทั่งถึง ORF1b จะเริ่มต้นแปลรหัสได้เป็นกลุ่มโปรตีนเชื่อมต่อ (fusion protein) และแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาวขนาดมากถึง 348 กิโลดาลตัน

สำหรับยีน coat protein ประกอบด้วยโปรตีน 2 ขนาด ได้แก่ downstream coat protein (CP) โดยที่การแปลรหัสเป็นโปรตีนของไวรัส BYV จะเริ่มต้นแปลรหัสจาก ORFs 5 ถึง ORFs 6 สำหรับ CTV เริ่มต้นแปลรหัสจาก ORFs 6 ถึง ORFs 7 และ PMWaV-2 เริ่มต้นแปล

รหัสจาก ORFs 5 ถึง ORFs 6 ซึ่ง downstream CP เป็นยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคทั้งหมด (major coat protein) แพลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาวขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังมี upstream coat protein (CPm) เป็นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสที่เป็นองค์ประกอบรอง (minor coat protein) ของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสทั้งหมด ไวรัส PMWaV-2 เริ่มต้นแพลรหัสจาก ORFs 6 ถึง ORFs 7 แพลรหัสเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 56 กิโลดาลตัน องค์ประกอบนี้ให้ product เป็นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคที่ติดอยู่ปลายทางด้าน 5' end ของไวรัส อาจจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการถ่ายทอดโรคไวรัสโดยแมลงพาหะ

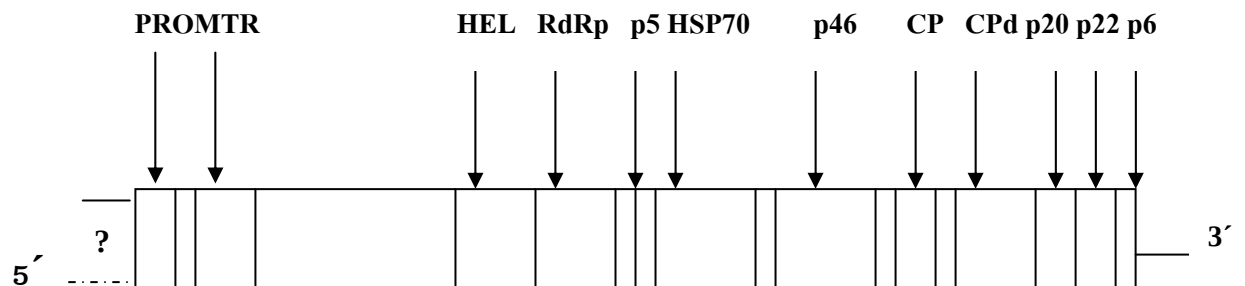
ยีนสังเคราะห์โปรตีนที่ช่วยในการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัส (movement protein) หรือยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัสภายในเซลล์พืช (cell-to-cell movement) ตัวอย่างเช่นไวรัส BYV ประกอบด้วยยีนโปรตีนย่อย 5 ชนิด ได้แก่ p6, Heat shock protein 70 homologue (HSP70), p64 ร่วมกับ CPm และ CP ทั้งหมดเป็นโปรตีนที่ช่วยในการเคลื่อนย้ายอนุภาคไวรัสระหว่างเซลล์พืช

ยีนสังเคราะห์โปรตีนอื่นๆ ทางด้าน C-terminal ได้แก่ C-terminal p21 ของ BYV ตรวจพบใน cytoplasmic และ cell wall fraction ของพืช และสำหรับ CTV มีองค์ประกอบด้าน C-terminal เป็น C-terminal 23 kDa แพลรหัสเป็นโปรตีนขนาด 23 กิโลดาลตัน

โครงสร้างยีนของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรด (PMWaVs)

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, methyltransferase domain, helicase domain แพลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาวมากกว่า 204 กิโลดาลตัน ORF ที่ 1b ประกอบด้วยโปรตีน RNA-dependent RNA polymerase แพลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 65 กิโลดาลตัน ORF2 ประกอบด้วยโปรตีน hydrophobic protein แพลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 5 กิโลดาลตัน ORF3 ประกอบด้วยโปรตีน heat shock protein 70 homologue แพลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 59 กิโลดาลตัน ORF4 จะแปลรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 46 กิโลดาลตัน ORF5 ประกอบด้วยโปรตีน coat protein แพลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 34 กิโลดาลตัน ORF6 ประกอบด้วยโปรตีน diverged coat protein แพลรหัสเป็นโปรตีนที่มีสายยาว 56 กิโลดาลตัน ORF7 แพลรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 20 กิโลดาลตัน ORF8 แพล

รหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 22 กิโลดาลตัน ORF9 แปรรหัสได้โปรตีนที่มีขนาด 6 กิโลดาลตัน และตำแหน่งปลายสุดด้าน 3' เป็นส่วนที่ไม่แปรรหัสเป็นโปรตีน (3'- untranslated region) ประกอบด้วยลำดับเบส 132 นิวคลีโอไทด์ (Melzer *et al.*, 2001)



ภาพที่ 1 โครงสร้างจีโนมของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่เป็น single strand, positive-sense RNA) แสดงส่วนของยีนที่กำหนดการสร้างโปรตีนชนิดต่าง ๆ จากปลาย 5' ไปสู่ปลาย 3'

PRO	=	papain-like protease domain
MTR	=	methyltransferase domain
HEL	=	helicase domain hydrophobic protein
RdRp	=	RNA-dependent RNA polymerase
HSP70	=	cellular heat shock protein 70 homologue
CP	=	coat protein
CPd	=	coat protein duplicate
p20	=	p20
p22	=	p22
p6	=	p6
3'- UTR	=	3'- untranslated region (3'- UTR)

การพัฒนาวิธีการตรวจไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรด

1) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb)

งานวิจัยการตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่รัฐฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกา มีการศึกษากันมาก Hu *et al.* (1997) ตรวจสอบด้วยวิธี Tissue blot immunoassays (TBIA) เริ่มมีการทดลองใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ที่จำเพาะต่อ PMWaVs แต่ละชนิด ได้แก่ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 35-6-5 จำเพาะต่อ PMWaV-1 และ 63-2-2 จำเพาะต่อ PMWaV-2 และอีก 5 ปีถัดมา Sether and Hu (2002a, 2002b) ได้นำโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสทั้งสองชนิดมาใช้ในการตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด ด้วยวิธี Tissue blot immunoassays (TBIA) เช่นเดียวกัน และพบว่าโมโนโคลนอลแอนติบอดี 35-6-5 จำเพาะต่อ PMWaV-1 ส่วนโมโนโคลนอลแอนติบอดี 63-2-2 จำเพาะต่อ PMWaV-2

2) โดยการตรวจอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนร่วมกับการตกแต่งอนุภาคด้วยแอนติซีรัม (Immuosorbent electron microscope: ISEM)

ในประเทศไทย สุวรรณ และคณะ(2536) ใช้วิธีตรวจอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยวิธี IEM (Hsu *et al.* , 1984; Hu *et al.* , 1997; Sether and Hu, 2002a, 2002b) และวิธี Ultrathin section พบอนุภาคไวรัสเหี่ยวของสับปะรด ซึ่งในขณะนั้นเรียกว่า pineapple wilt virus (PiWV) มีรูปร่างท่อนยาวคดขนาด 1,200-1,500 นาโนเมตร อยู่ในกลุ่มเซลล์ท่ออาหาร (phloem) ของสับปะรดที่แสดงอาการโรคเหี่ยว และพบว่า PiWV มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับแอนติซีรัม จากประเทศออสเตรเลีย ที่ความเข้มข้นเจือจางของซีรัมของโรคเหี่ยวของสับปะรด PiWV อัตรา 1:100

3) โดยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เริ่มมีการศึกษาด้านอนุชีววิทยาร่วมกับวิธีระบาดวิทยาอย่างจริงจังเมื่อไม่นานนี้ โดย Sether and Hu (2002a, 2002b) ได้ศึกษาสาเหตุและการระบาดของโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่รัฐฮาวายประเทศสหรัฐอเมริกา ในการทดสอบในโรงเรือนและสภาพแปลงทดลองวางแผนการทดลองแบบ Randomize complete block design (RCBD) ปลุกเชื้อไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 โดยใช้แมลงพาหะ ได้แก่ เพลี้ยแป้งที่เป็น viruliferous และ non-viruliferous ถ่ายทอดเชื้อลงบนใบสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (*A. comosus*) พันธุ์การค้า 5 พันธุ์ ไม่ระบุชนิด พันธุ์การค้า และตรวจสอบไวรัสในห้องปฏิบัติการโดยวิธีรีเวิร์สทรานสคริปชันและโพลีเมอเรสเซน

รีเควชัน (reverse transcription polymerase chain reaction : RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่เฉพาะกับยีน HSP 70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 คู่ไพรเมอร์สำหรับ PMWaV-1 HSP70 (5'-CAG GAA GGA CAA CAC TCA C-3' และ 5'-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3') และคู่ไพรเมอร์สำหรับ PMWaV-1 HSP 70 (5'-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3' และ 5'-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3') เมื่อเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส PMWaVs โดยใช้ทั้ง 3 วิธีของ Sether and Hu (2002a) พบว่า วิธี Tissue blot immunoassays (TBIA) โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) ที่จำเพาะต่อ PMWaVs แต่ละชนิดให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบด้วยวิธี RT-PCR การทดสอบด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับ PMWaV-1 และ PMWaV-2 จะมีความเฉพาะเจาะจง แม้ตรวจไวรัสในปริมาณน้อยยังตรวจพบ และจำแนกเชื้อไวรัส PMWaVs ทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด

การกำจัดไวรัสโดยใช้ความร้อน

การควบคุมโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดโดยใช้ความร้อน (heat treatment) ประสบผลสำเร็จกับมันฝรั่งและอ้อย ทั้งที่ใช้ hot water และ hot air treatment ที่อุณหภูมิในช่วง 35- 54 องศาเซลเซียส โดยการนำจุลินทรีย์สับปะรดแช่ในน้ำร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ผลการศึกษาทดลองในครั้งนั้นยังไม่มีผลการทดลองซ้ำอีก อย่างไรก็ตามการทำการควบคุมโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดโดยใช้ความร้อน ต้องระวังการกลายพันธุ์ของไวรัสจนอาจเกิดการเข้าทำลายของไวรัสที่รุนแรงกว่าเดิม ถ้าสับปะรดที่นำมาแช่ในน้ำร้อนสามารถงอกได้ และเมื่อทำการควบคุมโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดโดยการแช่ในน้ำร้อนแล้วตรวจไม่พบอนุภาคไวรัส จึงจะถือว่าประสบความสำเร็จในการกำจัดไวรัส (Ullman *et al.*, 1991)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การสำรวจโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดและเก็บตัวอย่าง

1.1 พันธุ์สับปะรดที่ใช้ในการทดลอง คือ

ตัวอย่างสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย จังหวัดเพชรบุรี 3 ใบ และพันธุ์ปัตตาเวีย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 3 ใบ พันธุ์ศรีราชา จังหวัดชลบุรี 3 ใบ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร.วันเพ็ญ ศรีทองชัย และ ดร.เกลียวพันธุ์ สุวรรณรักษ์ กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และสับปะรดพันธุ์ภูเก็ต 1 ต้น ได้รับความอนุเคราะห์จากสำนักงานเกษตรจังหวัดภูเก็ต

ต้นสับปะรดปกติที่ใช้เพื่อการทดสอบเปรียบเทียบในงานวิจัยนี้ ได้แก่ ต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียซึ่งขยายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท อาหารสยาม จำกัด โดยผ่านทาง ดร.ศัลลักษณ์ พรรณศิริ ศูนย์เครื่องมือและวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน และผ่านการตรวจสอบการปลอดโรคโดยวิธี ELISA ด้วยแอนติบอดี anti PiWV จากประเทศออสเตรเลีย ซึ่งได้รับความกรุณาจาก คุณ สุวรรณ กลัดพันธุ์ ศูนย์เครื่องมือและวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

1.2 การสำรวจและเก็บตัวอย่างสับปะรดเพื่อนำมาปลูกในโรงเรือนทดสอบ

สำรวจตรวจสอบและบันทึกอาการผิดปกติที่คาดว่าเกิดจากไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดใน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดเพชรบุรี และเก็บตัวอย่างสับปะรดในแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย ทั้งแหล่งปลูกเพื่อการอุตสาหกรรม และแหล่งปลูกของเกษตรกรเพื่อบริโภคเป็นผลสด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี จังหวัดเชียงราย และจังหวัดลำปาง เก็บตัวอย่างต้นสับปะรดที่มีอาการผิดปกติและคาดว่าเกิดจากไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด และตัวอย่างต้นสับปะรดที่ไม่แสดงอาการผิดปกติ จำนวนอย่างละ 15 ต้น นำมาปลูกลงดินเพาะที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 นิ้ว ดูแลรักษาในโรงเรือนปลูกพืชทดลองของภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมของไวรัสและของสับปะรด

แยกสกัดอาร์เอ็นเอรวมของไวรัสและของสับปะรดโดยใช้ชุดน้ำยาสกัด RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยมีขั้นตอนตามคำแนะนำของบริษัท ดังนี้

2.1 การเตรียมชิ้นส่วนพืชเพื่อการสกัดอาร์เอ็นเอรวม

นำตัวอย่างใบสับปะรดสด ทั้งใบอ่อนและใบแก่ ตัวอย่างละ 1 ใบ ต่อดันมาชั่งน้ำหนักประมาณ 100 มิลลิกรัมต่อตัวอย่างตัดใบให้เป็นชิ้นเล็กละเอียดด้วยการกรไกรที่ชุบแอลกอฮอล์เพื่อเช็ดฆ่าเชื้อ นำมาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลวในโกร่ง แล้วตักใส่หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.2 การสกัดอาร์เอ็นเอรวม

เติม RLT Lysis buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (เติม mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร) ลงในหลอดไมโครทิวป์ที่ใส่ใบสับปะรดที่บดละเอียดแล้ว นำหลอดไมโครทิวป์ไปใส่ใน QIAshredder spin column วางซ้อนลงใน 2 มิลลิลิตร collection tube หมุนเหวี่ยงนาน 2 นาที นำของเหลวที่ผ่าน column เติม 96-100% ethanol ปริมาตร 225 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตต์ หลังจากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปผ่าน RNeasy mini spin column โดยการหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที ล้าง column ด้วย RW 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที นาน 15 วินาที ล้าง column ด้วย RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นาน 2 นาที

หลังจากนั้นย้าย column ไปวางซ้อนในไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อและปราศจาก Rnase (Rnase-free water) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อชะล้างอาร์เอ็นเอ แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจสอบโรค โดยการใส่ไพรเมอร์สำหรับ PMWaV-1 (AF414119) และไพรเมอร์สำหรับ PMWaV-2 (AF283103) ซึ่งรายงานไว้โดย Sether D.M. and J.S.Hu (2002) ไพรเมอร์สำหรับการตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่ใช้นี้ สังเคราะห์โดย KU-VECTOR (KU-Vector custom DNA synthesis unit, Public ศูนย์เครื่องมือและวิทยาศาสตร์กลางมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900) และเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยในขั้นต่อไป

3. การออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีนและการโคลนยีน HSP70

3.1 ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนและการโคลนยีน HSP70

ออกแบบไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณยีน Cellular heat shock protein 70 homologue ซึ่งในที่นี้จะเรียกว่ายีน HSP70 หรือ HSP70 gene ของไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 ซึ่งมีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกา และที่มีในฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

จากข้อมูลลำดับเบสในส่วนของยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 (AF414119) ยีนนี้เริ่มต้นจากตำแหน่ง 5,840 ถึง 7,369 จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 แบบครบยีน คือ ไพรเมอร์ Pv1hsp 5' ออกแบบในตำแหน่ง 5,958 ถึง 6,547 ของตำแหน่งจีโนมทั้งหมด มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ 5'-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC- 3' และไพรเมอร์ Pc1hsp3' ออกแบบในตำแหน่ง 8,155 ถึง 8,764 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ คือ 5'-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC- 3' ไพรเมอร์ Pv1hsp5' และไพรเมอร์ Pc1hsp3' ออกแบบให้มีความยาว 20 เบส ซึ่งตรงตามหลักการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความยาวเบสประมาณ 16-25 เบส ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 590 นิวคลีโอไทด์ GC content เท่ากับ 50 และ 45 เปอร์เซ็นต์ และ คู่ไพรเมอร์นี้มี annealing temperature เท่ากับ 48 องศาเซลเซียส ซึ่งการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบ น่าจะมีความจำเพาะสูงอีกด้วย (Sether D.M. and J.S.Hu, 2002)

ลำดับเบสในส่วนของยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-2 (AF283103) ยีนนี้เริ่มต้นจากตำแหน่ง 7,929 ถึง 9,554 จึงได้ออกแบบไพรเมอร์ให้มีความจำเพาะกับยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-2 แบบครบยีน เช่นเดียวกัน คือ ไพรเมอร์ Pv1hsp5' ออกแบบในตำแหน่ง 8,155 ถึง 8,764 ของตำแหน่งจีโนมทั้งหมด ลำดับนิวคลีโอไทด์มีดังนี้ 5'-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG- 3' และไพรเมอร์ Pc1hsp3' ลำดับนิวคลีโอไทด์มีดังนี้ 5'-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC- 3' ไพรเมอร์ Pv2hsp5' และไพรเมอร์ Pc2hsp3' ออกแบบให้มีความยาว 21 เบส และ 20 เบส ตามลำดับ ได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากับ 610 นิวคลีโอไทด์ GC content เท่ากับ 42 และ 40 เปอร์เซ็นต์ และคู่ไพรเมอร์นี้มี melting temperature เท่ากับ

42 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิของการเข้าจับของไพรเมอร์กับดีเอ็นเอต้นแบบต่ำ (Sether D.M. and J.S.Hu , 2002)

4. การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของยีน HSP70 ด้วยวิธี RT-PCR

4.1 วิธี One step RT-PCR

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของยีน HSP70 จากอาร์เอ็นเอของเชื้อ PMWaV ที่สกัดจากใบพืชที่เป็นโรคด้วยวิธี One step RT-PCR ตามวิธีของบริษัท QIAGEN สหรัฐอเมริกา มีวิธีการและขั้นตอน ดังนี้ คือ

4.1.1 นำอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้ใบสับปะรด ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด PCR tube เป็น template ใส่ RNase-free water ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร และใส่คู่ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้สำหรับ PMWaV-1 คือ Pv1hsp5' (5'-ACA GGA AGG ACA ACA CTC AC- 3') และ Pc1hsp3' (5'-CGC ACA AAC TTC AAG CAA TC-3') หรือใส่คู่ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้สำหรับ PMWaV-2 คือ Pv1hsp5' (5'-CAT ACG AAC TAG ACT CAT ACG-3') และ Pv1hsp3' (5'-CCA TCC ACC AAT TTT ACT AC-3') โดยแยกหลอด PCR tube จากนั้นจึงเติม 5x Reverse transcription buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10mM dNTP 2.5 ไมโครลิตร และ AMV reverse transcriptase ปริมาตร 3 ไมโครลิตร

4.1.2 จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยนำหลอด PCR tube จากข้อ 4.1.1 ไปใส่เครื่อง Peltier Thermal Cycler (Model PTC-200 MJ Research, Inc.) และกำหนดให้เกิดปฏิกิริยา ด้วยการเริ่มต้นขั้นแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denature) นาน 15 นาที ตามด้วย อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นเริ่มรอบปฏิกิริยาขั้นที่สอง โดยใช้อุณหภูมิ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และอุณหภูมิ Extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป็นจำนวน 30 รอบ และขั้นสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

4.1.3 ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR โดยนำ product ปริมาตร 3 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel

4.1.4 ย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่า นาน 10 นาที และตรวจดูแถบดีเอ็นเอและขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง UV transilluminator

4.2 วิธี Two step RT-PCR

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของยีน HSP70 จากอาร์เอ็นเอของเชื้อ PMWaV-1 และ PMWaV-2 ที่สกัดจากใบสับปะรดเป็นโรค ใช้วิธีการ Two step RT-PCR ด้วยการใช้ AMV Reverse Transcriptase (AMV-RT) ตามวิธีของบริษัท Promega สหรัฐอเมริกา ซึ่งมีวิธีการและขั้นตอน ดังนี้

นำอาร์เอ็นเอรวมที่แยกได้ใส่ใน PCR tube จำนวน 2 หลอด หลอดละ 5 ไมโครลิตร เติม Reverse primer ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคแต่ละเชื้อไวรัส (PMWaV-1 และ PMWaV-2) ความเข้มข้น 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ใน Peltier Thermal Cycler (Model PTC-200 MJ Research, Inc.) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วนำออกแช่บนน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที

เติม RNase-free water ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตร, 5x AMV reverse transcription buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร 10mM dNTP ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร และ AMV reverse transcriptase ปริมาตร 3 ไมโครลิตร

นำไปบ่มไว้ใน Peltier Thermal Cycler (Model PTC-200 MJ Research, Inc.) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยาในข้อ 4.2.3 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เป็น template เติม RNase-free water ปริมาตร 34 ไมโครลิตร 10x Taq Polymerase buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร เติม forward primer และ reverse primer ที่จำเพาะต่อยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคแต่ละเชื้อไวรัส (PMWaV-1 และ PMWaV-2) ปริมาตร อย่างละ 1 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด จากนั้นใส่ 10mM dNTP ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และใส่ Taq DNA Polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ปฏิกิริยารวม ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

นำไปใส่เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Peltier Thermal Cycler (Model PTC-200 MJ Research, Inc.) กำหนดให้เกิดปฏิกิริยาด้วยการเริ่มต้นขั้นแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denature) นาน 3 นาที จากนั้นเริ่มรอบ

ปฏิกิริยาขั้นที่สอง โดยใช้อุณหภูมิ denature ที่ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ annealing ที่ 55 องศาเซลเซียส (ขึ้นอยู่กับค่า T_m ของแต่ละไพรเมอร์) นาน 1 นาที และอุณหภูมิ extension ที่ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป็นจำนวน 30 รอบ และสิ้นสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

ทำการตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR โดยนำ product ปริมาตร 3 ไมโครลิตร มาตรวจสอบด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel จากนั้นนำไปย้อมเจลในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที ล้างน้ำเปล่า นาน 10 นาที แล้วจึงตรวจดูแถบดีเอ็นเอและขนาดดีเอ็นเอบนเครื่อง UV transilluminator

5. การเชื่อมดีเอ็นเอยีน HSP70 และการคัดเลือกหาเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

5.1 การเชื่อมดีเอ็นเอเข้าพลาสมิด pGEM-T Easy และการเพิ่มดีเอ็นเอสายผสม

เมื่อตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอยีน HSP70 เรียบร้อยแล้ว จึงเชื่อมต่อดีเอ็นเอยีน HSP70 ของ PMWaV-1 และ PMWaV-2 เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy (Promega, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตามวิธีของ Sambrook และคณะ (1989)

ใส่ดีเอ็นเอยีน HSP70 ของ PMWaV-1 หรือ PMWaV-2 ความเข้มข้น 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครทิวป์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (โดยแยกแต่ละหลอด) เติม 2x Rapid ligation buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเติม pGEM-T Easy vector ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ทีโฟร์ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA Ligase) ความเข้มข้น 3 units ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วจึงเติมน้ำกลั่นนิ่งมาเพื่อให้ครบ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายผสม โดยนำดีเอ็นเอสายผสม (ดีเอ็นเอของยีน HSP70 ที่เชื่อมต่อกับ pGEM-T Easy vector) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี Heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่น้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นเติม Luria-Bertani Medium (LB Broth medium) 950 ไมโครลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาผสม LB Broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

5.2 การคัดเลือกหาเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

5.2.1 คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม โดยนำตะกอนเซลล์ใน LB ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LA ที่มีสารปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม 100mM IPTG (Isopropyl- β -D Thiogalactopyranoside) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

5.2.2 คัดเลือกหาเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pGEM-T Easy/HSP70 โดยเลือกโคโลนีของเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยว สีขาว ซึ่งคาดว่าจะมีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม นำมาเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 12-16 ชั่วโมง

5.2.3 การสกัดพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมจากเซลล์โดยวิธี Alkaline lysis method (Robertson et al., 1997) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงอาหารเหลว LB Broth (ข้อ 5.2.2) ปั่นตะกอนเซลล์ ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารเก่าทิ้งแล้วเติมสารละลาย I (solution I; 50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลายตะกอนด้วยเครื่อง vortex แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติมสารละลาย II (solution II; 0.2N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติมสารละลาย III (solution III; 3M potassium acetate, 0.2M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ดูดเก็บน้ำใส ประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติมส่วนผสม ของ PCI mixture (phenol: chloroform: isoamyl alcohol; 25:24:1) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เติมน้ำ 96-100 % ethanol 2.5 เท่าของปริมาตรน้ำใสที่ได้ พลิกหลอดกลับขึ้นมา ดูดน้ำใส ส่วนบนที่มีพลาสมิดใสหลอดใหม่ แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15-20 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนพลาสมิดด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งด้วย สูญญากาศ

5.2.4 ละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหรือ TE (Tris-EDTA buffer) 30 ไมโครลิตร ที่มี RNaseA ปริมาตร 20 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อขจัดอาร์เอ็นเอ

5.2.5 จากนั้นตรวจสอบพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมด้วยเอนไซม์ *EcoRI* โดยใช้ตะกอนพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสม ปริมาตร 5 ไมโครลิตร เติม 10x buffer H ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *EcoRI* ความเข้มข้น 2 units ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำให้ครบ 10 ไมโครลิตร

5.2.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2-3 ชั่วโมงหรือข้ามคืน และตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel

6. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีนโปรตีนห่อหุ้มของไวรัส PMWaV-1

6.1 ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนและการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้ม

ไพรเมอร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีนและการโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (major coat protein) ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ซึ่งในที่นี้จะเรียกว่ายีน CP หรือ CP gene ในงานทดลองนี้ ออกแบบจากยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของ PMWaV-1 (AF414119) ซึ่งมีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกาในระบบฐานข้อมูลของ GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) โดยยีนเริ่มต้นจากตำแหน่ง 7,929 ถึง 9,554 โดยที่เพิ่มตำแหน่ง -100 และ +100 นิวคลีโอไทด์ นำมาคัดเลือกบริเวณที่เหมาะสมสำหรับที่จะออกแบบไพรเมอร์คู่ไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบไว้คือ P1CP1F ซึ่งเป็น forward primer และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'-TTT ATG TAT GAT CAG CTA CCT TTG C-3' และ P1CP2R ซึ่งเป็น reverse primer มี ลำดับนิวคลีโอไทด์ ดังนี้ 5'-GAG GTT TTT GTC CTT ACT TAC CAA T- 3' โดยไพรเมอร์ P1CP1F และไพรเมอร์ P1CP2R ถูกออกแบบให้มีความยาว 25 เบส และมี GC content เท่ากับ 50 และ 45 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ annealing temperature เท่ากับ 54 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์ cDNA และการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มเชื้อไวรัส PMWaV-1 โดยใช้คู่ไพรเมอร์ P1CP1F และ P1CP2R สามารถสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณได้ โดยวิธีการและขั้นตอนของ RT-PCR ที่ใช้กับยีน HSP70 และเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอของยีน CP ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยวิธีการที่กล่าวแล้วข้างต้นเช่นเดียวกันกับการเชื่อมต่อยีน HSP70 พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมนี้ เรียกว่า pGEM-T/CP1 สร้างขึ้นในขั้นตอนนี้เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน CP ให้มีจำนวนมากและเหมาะสมสำหรับเตรียมผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีนโปรตีนห่อหุ้มของไวรัส PMWaV-1 ในขั้นตอนต่อไป

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน CP ด้วยไพรเมอร์คู่ใหม่ที่ออกแบบโดยการเพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *EcoRI* คือ ไพรเมอร์ Pv1CP1E ซึ่งเป็น forward primer โดยลำดับนิวคลีโอไทด์มีดังนี้ 5'- GAA TTC GCT GAT TCG AGC AAA CAA AAA C-3' และเพิ่มตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *SacI* สำหรับไพรเมอร์ Pc1CP2S ซึ่งเป็น reverse primer มีลำดับนิวคลีโอไทด์มีดังนี้ 5'- GAG CTC TTT GCG TCC ACC CA- 3' และใช้ชิ้นดีเอ็นเอของยีน CP ที่สกัดจาก pGEM-T/CP1 เป็น template ในปฏิกิริยา PCR จากนั้นจึงเชื่อมต่อ PCR product ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy ชุดใหม่อีกครั้ง พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมใหม่มีชื่อว่า pGEM-2T/CP1

6.2 การเตรียมชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายเพื่อการผลิตรีคอมบิแนนท์ของยีน

โปรตีนห่อหุ้มของไวรัส PMWaV-1 โดยการสกัดพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมใหม่มีชื่อว่า pGEM-2T/CP1 ออกจาก *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี Alkaline lysis method เช่นเดิม จากนั้นนำพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสม pGEM-2T/CP1 ที่สกัดได้ ปริมาตร 25 ไมโครกรัม มาเติมเอนไซม์ *SacI* ความเข้มข้น 10 units ร่วมกับเอนไซม์ *EcoRI* ความเข้มข้น 10 units อย่างละ 50 units ในปฏิกิริยารวม 250 ไมโครลิตร ปฏิกิริยาประกอบด้วยพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสม pGEM-2T/CP1 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นมาเชื่อปริมาตร 182.5 ไมโครลิตร เติม 10x Y⁺ Tango ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ ชนิดละ 5 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำดีเอ็นเอที่เหลื้อมาสกัดเอาสารละลายโปรตีนออกด้วยสารผสม PCI mixture (25:24:1) 2 ครั้ง ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ละลายตะกอนดีเอ็นเอในน้ำกลั่น 20- 30 ไมโครลิตร

6.3 การเตรียมพลาสมิด pGEX-2T Expression vector

เพิ่มจำนวนพลาสมิด pGEX-2T Expression vector (Amercham, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ให้ได้ปริมาณมาก ด้วยการโยกย้าย (transformed) เข้าสู่เซลล์ของ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี Heat shock transformation เลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ในอาหาร 2xYT ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 10,000 รอบต่อวินาที นาน 12-16 ชั่วโมง สกัดแยกพลาสมิด pGEX-2T จากเซลล์โดยวิธี Alkaline lysis method (Robertson *et al.*, 1997) ละลายตะกอนพลาสมิด pGEX-2T ด้วยน้ำกลั่นหรือ TE (Tris-EDTA buffer) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ที่มี RNaseA ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อขจัดอาร์เอ็นเอ แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้

ด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel แบ่งเก็บใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 25 ไมโครลิตร เพื่อนำไปทำปฏิกิริยาของการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อ SacI และ EcoRI

6.4 การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pGEX-2T Expression vector

การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pGEX-2T Expression vector (Amercham, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ทดสอบวิธีการเตรียม linear DNA ด้วยวิธีการต่างๆ 3 แบบวิธี กล่าวคือ

6.4.1 โดยการใช้น้ำเอนไซม์ SacI พร้อมกับเอนไซม์ EcoRI ในปฏิกิริยารวม ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ในบัฟเฟอร์ Yellow (Y⁺) Tango 1.5 เท่า ปฏิกิริยาประกอบด้วยพลาสมิด pGEX - 2T Expression vector ปริมาตร 25 ไมโครลิตร น้ำเปล่า 182.5 ไมโครลิตร 10x Y⁺Tango ปริมาตร 37.5 ไมโครลิตร เอนไซม์ SacI ความเข้มข้น 10 units และเอนไซม์ EcoRI ความเข้มข้น 10 units ชนิดละ 5 ไมโครลิตร โดยเติมเอนไซม์ทั้งสองชนิดพร้อมๆ กัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทั้งไว้ข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) เพื่อให้ดีเอ็นเอถูกย่อยได้สมบูรณ์ ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel หลังจากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่ถูกย่อยแล้วที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สกัดเอาโปรตีนออกจากสารละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายผสม PCI mixture อัตราส่วน 25:24:1 ในอัตรา 1:1 แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เติมน้ำเอทานอลสมบูรณ์ (96-100% ethanol) จำนวน 2.5 เท่าของปริมาตรน้ำใสที่ได้ พลิกหลอดกลับไปมา ตูดน้ำใสส่วนบนที่มีพลาสมิดใส่หลอดใหม่ แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15-20 นาที ตูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนพลาสมิดด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที ตูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งด้วยสูญญากาศ แล้วละลายตะกอนในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20 - 30 ไมโครลิตร

6.4.2 โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ SacI และตามด้วยเอนไซม์ EcoRI

ในปฏิกิริยาประกอบด้วย 10x Y⁺Tango ปริมาตร 20 ไมโครลิตร พลาสมิดดีเอ็นเอ pGEX-2T ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และเอนไซม์ SacI ความเข้มข้น 10 units ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง) ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ SacI โดยการตรวจขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาทำปฏิกิริยาต่อ โดยเติมเอนไซม์ EcoRI ปฏิกิริยาประกอบด้วยส่วนผสมดีเอ็นเอที่เหลือ ปริมาตร 195 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร

25 ไมโครลิตร เติม 10x Y⁺ Tango ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *EcoRI* ความเข้มข้น 10 units ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ควรบ่มปฏิกิริยาทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้การย่อยของเอนไซม์ (activity) สมบูรณ์มากที่สุด แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่มีความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สกัดเอาโปรตีนออกจากสารละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายผสม PCI mixture อัตราส่วน 25:24:1 ในอัตรา 1:1 แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เติมน้ำเอทานอลสมบูรณ์ (96–100% ethanol) ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรน้ำใสที่ได้ พลิกหลอดกลับขึ้นมา ดูดน้ำใสส่วนบนที่มีพลาสมิดใสหลอดใหม่ แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15–20 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนพลาสมิดด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10–15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งด้วยสุญญากาศ แล้วละลายตะกอนในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20 – 30 ไมโครลิตร

6.4.3 โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ก่อนแล้วตามด้วยเอนไซม์ *SacI* ในปฏิกิริยาประกอบด้วยพลาสมิดดีเอ็นเอ pGEX-2T Expression vector ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม 10xY⁺ Tango ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *EcoRI* ความเข้มข้น 10 units ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ข้ามคืน (12–16 ชั่วโมง) ตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ *SacI* โดยการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอด้วยวิธี Electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมาทำปฏิกิริยาต่อโดยเติมเอนไซม์ *SacI* ปฏิกิริยาประกอบด้วยส่วนผสมดีเอ็นเอที่เหลือ ปริมาตร 95 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 95 ไมโครลิตร และเอนไซม์ *SacI* ความเข้มข้น 10 units ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาทิ้งไว้ข้ามคืน แล้วตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel สกัดเอาโปรตีนออกจากสารละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายผสม PCI mixture อัตราส่วน 25:24:1 ในอัตรา 1:1 แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เติมน้ำเอทานอลสมบูรณ์ (96–100% ethanol) ปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรน้ำใสที่ได้ พลิกหลอดกลับขึ้นมา ดูดน้ำใสส่วนบนที่มีพลาสมิดใสหลอดใหม่ แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15–20 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนพลาสมิดด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10–15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งด้วยสุญญากาศ แล้วละลายตะกอนในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ปริมาตร 20 – 30 ไมโครลิตร

6.5 การเชื่อมดีเอ็นเออินโปรตีนห่อหุ้ม (CP gene) เข้ากับ linear DNA ของพลาสมิด pGEX-2T Expression vector

เชื่อมต่อดีเอ็นเออินโปรตีนห่อหุ้ม (CP gene) เข้ากับ linear DNA ของพลาสมิด pGEX-2T Expression vector ด้วยเอนไซม์ทีโฟร์ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA Ligase) ทดสอบอัตราส่วนดีเอ็นเอต่อเวกเตอร์ 2 อัตราส่วน คือ 3:1 และ 6:1

ในอัตราส่วน 3:1 ปฏิบัติประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 6.2 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 6 ไมโครลิตร เติม 2x Rapid ligation buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม linear DNA ของพลาสมิด pGEX-2T Expression vector ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.4 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมเอนไซม์ทีโฟร์ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA Ligase) ความเข้มข้น 3 units ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

อัตราส่วน 6:1 ปฏิบัติประกอบด้วย ดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 6.2 ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 6 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 11 ไมโครลิตร เติม 2x Rapid ligation buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม linear DNA ของพลาสมิด pGEX-2T Expression vector ความเข้มข้น 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ที่เตรียมไว้ในข้อ 6.4 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ทีโฟร์ดีเอ็นเอไลเกส (T4 DNA Ligase) ความเข้มข้น 3 units ปริมาตร 1 ไมโครลิตร บ่มทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน (12-16 ชั่วโมง)

6.4 การโยกย้ายดีเอ็นเอสายผสม (ดีเอ็นเออินโปรตีนห่อหุ้ม (CP gene) ใน linear DNA ของพลาสมิด pGEX-2T Expression vector) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

โดยนำส่วนผสม ligation ข้อ 6.3.1 และ 6.3.2 นำมาเติม competent cell (*Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยผสมแยกหลอดไมโครทิวป์ ใช้ไปเปิดดูดสารละลายขึ้นลงอย่างเบาๆ นำหลอดไมโครไปแช่น้ำแข็งทันที นาน 30 นาที

โยกย้ายดีเอ็นเอสายผสม ด้วยวิธี Heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ใน water bath เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันที นาน 2 นาที จากนั้นเติม Luria-Bertani Medium (LB Broth medium) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร เขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาผสม LB Broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LA ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100

มิลลิกรัม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นจึงสุ่มคัดเลือกเซลล์ที่มีดีเอ็นเอสายผสม โดยตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel

6.5 การคัดเลือกหาเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสม โดยนำตะกอนเซลล์ใน LB ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LA ที่มีสารปฏิชีวนะ แอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

คัดเลือกหาเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม pGEX-2T_Expression vector/CP โดยเลือกโคโลนีของเชื้อเป็นโคโลนีเดี่ยว สีขาว ซึ่งคาดว่าจะมีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม โดยวิธีการสุม นำมาเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 3 มิลลิตร ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 12-16 ชั่วโมง

นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว LB Broth (ข้อ 6.5.2) มาปั่นตกตะกอนเซลล์ ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำมาสกัด พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมจากเซลล์โดยวิธี Alkaline lysis method โดยเทอาหารเก่าทิ้งแล้วเติมสารละลาย I (solution I; 50mM glucose, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0) จำนวน 100 ไมโครลิตร ละลายตะกอนด้วยเครื่อง vortex แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติมสารละลาย II (solution II; 0.2N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติมสารละลาย III (solution III; 3M potassium acetate, 0.2M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ดูดเก็บน้ำใสประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติมส่วนผสม ของ PCI mixture (อัตราส่วน 25:24:1) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เติมหทานอลสมบูร์น (96-100% ethanol) จำนวน 2.5 เท่าของปริมาตรน้ำใสที่ได้ พลิกหลอดกลับไปมา ดูดน้ำใสส่วนบนที่มีพลาสมิดใสหลอดใหม่ แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15-20 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอน พลาสมิดด้วย 70% ethanol หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้ง ทำให้ตะกอนแห้งด้วยสูญญากาศ

จากนั้นตรวจสอบพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมได้จากข้อ 6.5.3 ด้วยเอนไซม์ *Bam*HI พร้อมกับเอนไซม์ *Sac*I ในปฏิกิริยาประกอบด้วย ตะกอนพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสม ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 23 ไมโครลิตร เติมนัฟเฟอร์

10x Y⁺ Tango ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เติมนิวคลีโอไทด์ *Bam*HI และนิวคลีโอไทด์ *Sac*I ความเข้มข้น 10 units ปริมาตร อย่างละ 1 ไมโครลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2-3 ชั่วโมงหรือข้ามคืนและตรวจสอบแถบและขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธี electrophoresis บน 0.8% TBE agarose gel

6.6 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และการชักนำการสังเคราะห์ Recombinant Protein ในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α

การวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์โปรตีนโดยเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่เป็น host cell ที่มีพลาสมิดของยีนเป้าหมาย (CP gene) ในอาหารเหลว LB ที่เติมแอมพิซิลิน ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เข้าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน เติมนิวคลีโอไทด์ที่เลี้ยงข้ามคืนปริมาตรร้อยละ 15 ของอาหาร 2xYT ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เติมแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บเซลล์ก่อนโดยดูดอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้ที่ อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ช่วงเวลา T₀)

ชักนำการสังเคราะห์โปรตีนในอาหารที่เหลือด้วยสาร IPTG ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์ เก็บเซลล์ทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (ช่วงเวลา T₂ T₄ T₆) โดยดูดอาหาร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง เก็บตะกอนไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำตะกอนที่เก็บไว้ในช่วงเวลา T₀ T₂ T₄ และ T₆ ชั่วโมง จากอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเติมน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร vortex ให้ตะกอนเซลล์ละลาย เติมนิวคลีโอไทด์ dye (เติม 5% ของสาร 2-mercaptoethanol) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex นำตัวอย่างที่ได้แบ่งใส่หลอดไมโครทิวป์ใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวนตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร และ Protein Molecular Weight Marker # SM0431 (Lot 2011) (Fermentas Life science, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วแช่บนน้ำแข็งทันที (4 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที นำไปวิเคราะห์และแยกขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) เปรียบเทียบกับขนาดโปรตีนมาตรฐาน

6.7 การเตรียมเจลแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

เตรียมเจลแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ด้วยอุปกรณ์ Hoefer Mini VE โดยเตรียมเจลระหว่างแผ่นกระจก 2 แผ่นที่สะอาดโดยใช้กระดาษซับที่ชุบด้วย 95% ethanol เช็ดทำความสะอาดสะอาดกระจกทั้งสองด้านแล้วปล่อยให้แห้ง ประกบแผ่นกระจกทั้งสองเข้าด้วยกันโดยใช้ spacer หนา 1 มิลลิเมตร คั้นระหว่างแผ่นกระจก ตรวจสอบไม่ให้มีรอยร้าวก่อนนำเข้าเครื่องประกอบเจล จากนั้นจึงเตรียมเจลแยกขนาดโปรตีน ประกอบด้วยเจล 2 ส่วน โดยเจลส่วนล่าง คือ 15% separating gel ได้จากการรวม สารละลาย I (30% T และ 2.7% C acrylamide ; 29.2 กรัม acrylamide และ 0.8 กรัม bisacrylamide) ปริมาตร 4.17 มิลลิลิตร 4x resolving gel buffer (1.5M Tris-HCl pH 8.8) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร 10% SDS ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร น้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ ปริมาตร 3.2 มิลลิลิตร เติม 10% ammonium persulphate หนึ่งฝาเชื้อ 150 ไมโครลิตร และเติม TEMED หนึ่งฝาเชื้อ 4 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศก่อนรีบหยอดลงสู่ชุดเตรียมเจล โดยให้ระดับเจลมีความสูงประมาณ 2/3 ของแผ่นกระจก รีบหยดน้ำตามลงไปทันทีเพื่อให้ผิวเจลเรียบเสมอกัน

เมื่อเจลแข็งตัวแล้วให้ซับน้ำส่วนบนออกทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที ก่อนเสียบหัว (comb) โดยให้ขอบหัวห่างจากส่วน running gel ประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วหยดเจลชั้นบน (stacking gel) เตรียมโดยผสมสารละลาย I ปริมาตร 0.67 มิลลิลิตร 4x stacking gel buffer (0.5M Tris-HCl pH 6.8) ปริมาตร 0.83 มิลลิลิตร 10% SDS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้นาน 20 นาที เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วจึงค่อยๆ ดึงหัวออกเบาๆ ทำให้เป็นช่องบรรจุตัวอย่าง จากนั้นนำเจลที่อยู่ระหว่างกระจกไปใส่ Tank buffer (0.025M Tris-HCl, 0.192M Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) แยกขนาดโปรตีนโดยใส่ตัวอย่างที่ได้ในช่องเจลที่จัดเตรียมไว้ในอุปกรณ์แยกขนาดใน Tank buffer (0.025% coomassie brilliant blue R250, 40% methanol, 7% acetic acid) ด้วยกระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 40 นาที และแยกขนาดต่อไปอีกโดยเพิ่มกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 120 นาที

ล้างสีพื้นออกด้วยสารละลาย destain I (40% acetic , 7% methanol acid) เขย่าบน shaker นาน 30 นาที จนเห็นพื้นเจลใส และตามด้วย destain II (7% acetic acid, 5% methanol) เขย่าบน shaker จนกระทั่งเห็นแถบโปรตีนติดสีน้ำเงินเด่นชัดขึ้น ส่วนอีกด้านหนึ่งไม่ต้องย้อม เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

7. การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยเทคนิค Dot Blot Analysis

7.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนและรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการตรวจสอบ หยดบนแผ่นไนลอน

เตรียมเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α จากโคลน GST induced (2 ชม.) T₂ และโคลน GST-CP1 (pW772/CP1) induced (2 ชม.) T₂ โดยเจือจางในบัฟเฟอร์ TBST อัตราเจือจางโปรตีนในบัฟเฟอร์หนึ่งมาเชื้อ 1:1, 1:2, 1:10 และ 1:100 และ 1:1, 1:2 และ 1:10 ตามลำดับ นำเซลล์แบคทีเรียข้างต้น มาย่อยผนังเซลล์ออกโดยการ freeze-thaw (อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ย้ายมาไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) จำนวน 3 ครั้ง และเตรียมตัวอย่างโปรตีนปรีดักต์ตามวิธีซึ่งขยายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และนำคั้นจากพืชเป็นโรค โดยบดตัวอย่างในบัฟเฟอร์ TBST อัตรา 1:1 เพื่อการเปรียบเทียบ

เตรียมแผ่น nitrocellulose membrane Hibond ECL ขนาด 0.45 มิลลิเมตร (Amersham, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ที่ตัดไว้ขนาดกว้าง 1x11 เซนติเมตร (ตัดให้พอดีกับจำนวนตัวอย่าง 10 หยด)

แช่เมมเบรนในน้ำหนึ่งมาเชื่อนาน 1-2 นาที คีบปลายของแผ่น nitrocellulose membrane ด้วย forceps ชนิดปลายแบน มาวางลงบนกระดาษทิชชู

นำตัวอย่างในข้อ 7.1.1 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร มาหยดลงบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยเรียงตามลำดับตามข้อ 7.1.1

7.2 การตรวจสอบสัญญาณบนแผ่น Nitrocellulose Membrane

นำแผ่น nitrocellulose membrane มาแช่เบาๆ ใน TBS (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) ที่มี 2%, 3% และ 5% skim milk เพื่อจะนำไปทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี IgG PMWaV-1 (Agdia, ประเทศสหรัฐอเมริกา) และเตรียมแผ่น nitrocellulose membrane มาแช่เบาๆ ใน TBS ที่มี 1%, 2% และ 3% BSA เพื่อจะนำไปทดสอบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี anti-PMWaV จากประเทศออสเตรเลีย ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุวรรณา กลัดพันธุ์ ศูนย์เครื่องมือและวิทยาศาสตร์กลางมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ในอัตรา 1:10,000 มิลลิลิตร โดยเตรียมทดสอบแยกกัน นำไปแช่บน shaker เบาๆ เป็นเวลา 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง

ล้างแผ่นไนลอนด้วย TBST (20mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl และ 0.05% Tween 20) นาน 5 นาที 3 ครั้ง

เมมเบรนที่บล็อกด้วย 1%, 2% และ 3% BSA นำไปแช่ในโมโนโคลนอลแอนติบอดี IgG PMWaV-1 (Agdia, สหรัฐอเมริกา) ชนิด supernatant ที่ละลายใน TBST อัตราส่วน 1 ต่อ 10 มิลลิลิตร และเมมเบรนที่บล็อกด้วย 2%, 3% และ 5% skim milk นำไปแช่ในโพลีโคลนอลแอนติบอดี anti PiWV IgG จากประเทศออสเตรเลีย ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุวรรณา กลัดพันธุ์ ที่ละลายใน TBST อัตราส่วน 1:10,000 มิลลิลิตร แช่เมมเบรน นาน 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นไนลอนด้วย TBST นาน 5 นาที 3 ครั้ง นำแผ่นไนลอนแช่ใน Goat anti-mouse IgG ที่ละลายใน TBST อัตราส่วน 1 ต่อ 5,000 นาน 45 นาที ถึง 1 ชั่วโมง แล้วล้างแผ่นไนลอนด้วย TBST นาน 5 นาที 3 ครั้ง ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยการหยดสารละลาย substrate (Nitro Blue Tetrazolium, NBT/ 5-Bromo-4-chloroindoyl Phosphate, BCIP)

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และโปรแกรมสำหรับวิเคราะห์โปรตีน

ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bio Service Unit, BSU เลขที่ 73/1 ชั้น 5 ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ถนนพระราม 6 ท่งพญาไท ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400) ด้วยเครื่อง ABI Prism model 3100 นำข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับเบส ที่มีรายงานไว้แล้วใน GenBank ด้วยโปรแกรม DNASTAR (LaserGene) Clustal-W version 1.86 และ VECTOR NTI SUIT 6

ผลและวิจารณ์

1. การสำรวจ การเก็บตัวอย่าง และอาการของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด ตลอดจนการ ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตของสับปะรด

การสำรวจแปลงปลูกสับปะรดในพื้นที่ปลูกสำคัญในแหล่งปลูกต่างๆของประเทศไทย พบอาการผิดปกติที่คล้ายอาการของโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (*Pineapple mealybug wilt-associated viruses: PMWaVs*) และการระบาดในแปลงปลูกสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียในจังหวัดเพชรบุรี โรคหรืออาการผิดปกตินี้ มีการแพร่ระบาดออกเป็นวงกลมขยายออกไปภายในแปลง (ภาพที่ 2) หากต้นสับปะรดไม่แสดงอาการผิดปกติหรือไม่แสดงอาการของโรค จะให้ผลผลิตสับปะรดที่ดีและมีคุณภาพ ผลโต สม่ำเสมอ ในขณะที่ต้นสับปะรดที่แสดงอาการผิดปกติ คล้ายอาการของโรคเหี่ยวเนื่องจากไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด ผลสับปะรดมีขนาดเล็ก และ มีคุณภาพต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลสับปะรดปกติ อาการผิดปกติดังกล่าวที่พบ คือ อาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้บิด และอาการใบต่างเหลืองอ่อนนํ้าตาล ปลายใบไหม้ (ภาพที่ 3)

จากการนำต้นสับปะรดทั้งที่แสดงอาการผิดปกติและไม่แสดงอาการผิดปกติที่ คล้ายอาการของโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด จากแหล่งเพาะปลูกแหล่งต่างๆมาปลูกลงกระถาง ดินเผาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 นิ้ว ภายในโรงเรือนปลูกพืชทดลองของภาควิชาโรคพืช คณะ เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน โดยตรวจลักษณะอาการที่แสดงออกมา ภายหลังการปลูก และดูแลรักษา ต้นสับปะรดภายในโรงเรือนทดลอง แสดงอาการ 6 แบบ คือ ใบ แก่มีอาการใบต่างเหลือง อาการเนื้อใบเปลี่ยนเป็นสีแดงซึ่งคล้ายอาการขาดธาตุฟอสฟอรัส (RD-Reddening) อาการใบจุดแห้งตาย (NS-Necrosis) อาการจุดประสีเหลืองอ่อน (Y-Yellowing) อาการใบต่างสีเหลืองอ่อนสลับสีเขียวอ่อน (MS-Mosaic) และอาการใบจุดแห้งตายใบไหม้ลาม ใหญ่ (LNS-Local lesion-large necrosis spot) และอาการจุดสีม่วง (PS-Purple spot) ซึ่งเกิด กับพืชทดสอบ (ตารางที่ 1) ดังนี้

สับปะรดพันธุ์ศรีราชา (Sriracha: *Ananus comosus* cv. Smooth cayenne)

อาการปลายใบไหม้เป็นสีน้ำตาลลุกลามเข้าสู่โคนต้น และพบอาการใบต่าง มีจุด ประสีเหลืองอ่อนสลับสีเขียว โดยพบอาการทั้งบนใบอ่อนและใบแก่ อาการต่างนี้พบได้ชัดเจนใน ใบแก่ นอกจากนี้พบว่าใบแก่มีอาการใบต่างเหลือง อาการเนื้อใบเปลี่ยนเป็นสีแดงซึ่งคล้ายอาการ ขาดธาตุฟอสฟอรัส และพบอาการใบต่างเป็นขีดปะปนกับอาการต่างบนใบเดียวกัน (ภาพที่ 3)

สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย (Pattavia: *Ananus comosus* cv. Smooth cayenne)

สำหรับต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ที่มีอาการผิดปกติ นั้น เมื่อนำมาปลูกในโรงเรือน พบอาการแผลจุดตายสีน้ำตาล แผลมีการกระจายทั่วไปและรุนแรงมากในใบแก่ ส่วนสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียจากจังหวัดเพชรบุรี เมื่อนำมาปลูกภายในโรงเรือน พบทั้งอาการแผลจุดตายสีน้ำตาล แผลมีการกระจายทั่วไปและรุนแรงมากในใบแก่ และอาการใบต่างเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม อาการรุนแรงมากในใบอ่อน (ภาพที่ 4)

ซึ่งอาการผิดปกติดังกล่าวแล้วข้างต้น สอดคล้องกับลักษณะอาการของโรคเหี่ยวที่เกิดจากไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดที่ตรวจพบและเคยมีรายงานในประเทศไทย (สุวรรณา, 2548) คือ อาการบนใบสับปะรดตั้งแต่อายุ 1 เดือนเป็นต้นไป ใบวงที่ 3-4 จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอมชมพู ปลายใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือมีรอยแผลแห้งและม้วนเข้า เนื้อใบมีสีต่างเหลืองกระจายทั่วไป และคล้ายกับอาการผิดปกติซึ่งรายงานไว้ที่ฮาวายและคิดว่าเกิดจากไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด PMWaVs

สับปะรดพันธุ์นางแล (Nang-Lae: *Ananus comosus* cv. Smooth cayenne)

สำหรับต้นสับปะรดพันธุ์นางแลที่แสดงอาการผิดปกติจากจังหวัดเชียงราย แสดงอาการใบต่างเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม และอาการรุนแรงมากในใบอ่อน (ภาพที่ 4)

สับปะรดพันธุ์ภูเก็ต (Queen: *Ananus comosus* cv. Queen)

สำหรับต้นสับปะรดพันธุ์ภูเก็ตที่แสดงอาการผิดปกติจากจังหวัดภูเก็ต พบอาการแผลใบต่างไหม้ขนาดใหญ่ และมีการเข้าทำลายซ้ำจากเชื้อรา

อาการผิดปกติที่เกิดสับปะรดพันธุ์นางแล และพันธุ์ภูเก็ต ทั้ง 2 พันธุ์นี้ ที่นำมาปลูกภายในโรงเรือน เป็นลักษณะอาการที่ยังไม่มีรายงานในประเทศไทย

ตารางที่ 1 สับปรดแสดงอาการผิดปกติในลักษณะต่าง ๆ ที่คล้ายอาการของโรคเหี่ยวซึ่งเกิดจากโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปรด

ลำดับที่	รหัส	พันธุ์	แหล่งที่มา	อาการของโรค
1	H1-KU ^{1/}	ศรีราชา	จ. ชลบุรี	- ^{4/}
2	H2-KU	ศรีราชา	จ. ชลบุรี	-
3	H3-KU	ศรีราชา	จ. ชลบุรี	-
4	Chb1-KU	ศรีราชา	จ. ชลบุรี	RD ^{5/} , NS ^{6/} , Y ^{7/}
5	Chb2-KU	ศรีราชา	จ. ชลบุรี	RD, NS, Y
6	Chb3-KU	ศรีราชา	จ. ชลบุรี	RD, NS, Y
7	Chb6-KU	ศรีราชา	จ. ชลบุรี	RD, NS, Y
8	Nal1-KU	นางแล	จ. เชียงราย	MS ^{8/}
9	Chb01-DOA ^{2/}	ปัตตาเวีย	จ. ชลบุรี	NS
10	Chb02-DOA	ปัตตาเวีย	จ. ชลบุรี	NS
11	Chb03-DOA	ปัตตาเวีย	จ. ชลบุรี	NS
12	Pch01-DOA	ปัตตาเวีย	จ. ประจวบคีรีขันธ์	RD
13	Pch02-DOA	ปัตตาเวีย	จ. ประจวบคีรีขันธ์	NS, PS ^{9/}
14	Pch03-DOA	ปัตตาเวีย	จ. ประจวบคีรีขันธ์	NS, PS
15	Pbu01-DOA	ปัตตาเวีย	จ. เพชรบุรี	MS
16	Pbu02-DOA	ปัตตาเวีย	จ. เพชรบุรี	MS
17	Pbu03-DOA	ปัตตาเวีย	จ. เพชรบุรี	MS
18	Tr01-DOA	ตราดสีทอง	จ. ตราด	RD, NS
19	HO-DOA	ศรีราชา	จ. ชลบุรี	-
20	CO-DOA	ศรีราชา	จ. ชลบุรี	RD, NS
21	Phu01-Doa ^{3/}	ภูเก็ต	จ. ภูเก็ต	LNS ^{10/}

^{1/} ปลุกสับปรดที่ใช้ในงานทดลองลงในกระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 นิ้ว เก็บไว้ในโรงเรือนทดลอง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

^{2/} ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากกรมวิชาการเกษตร

^{3/} ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากสำนักงานเกษตรจังหวัดภูเก็ต

^{4/} - = ไม่แสดงอาการ ^{5/} RD-Reddening = เส้นใบแดงและปลายใบไหม้บิด

^{6/} NS-Necrosis = แผลจุด ^{7/} Y-Yellowing = จุดประสีเหลืองอ่อน

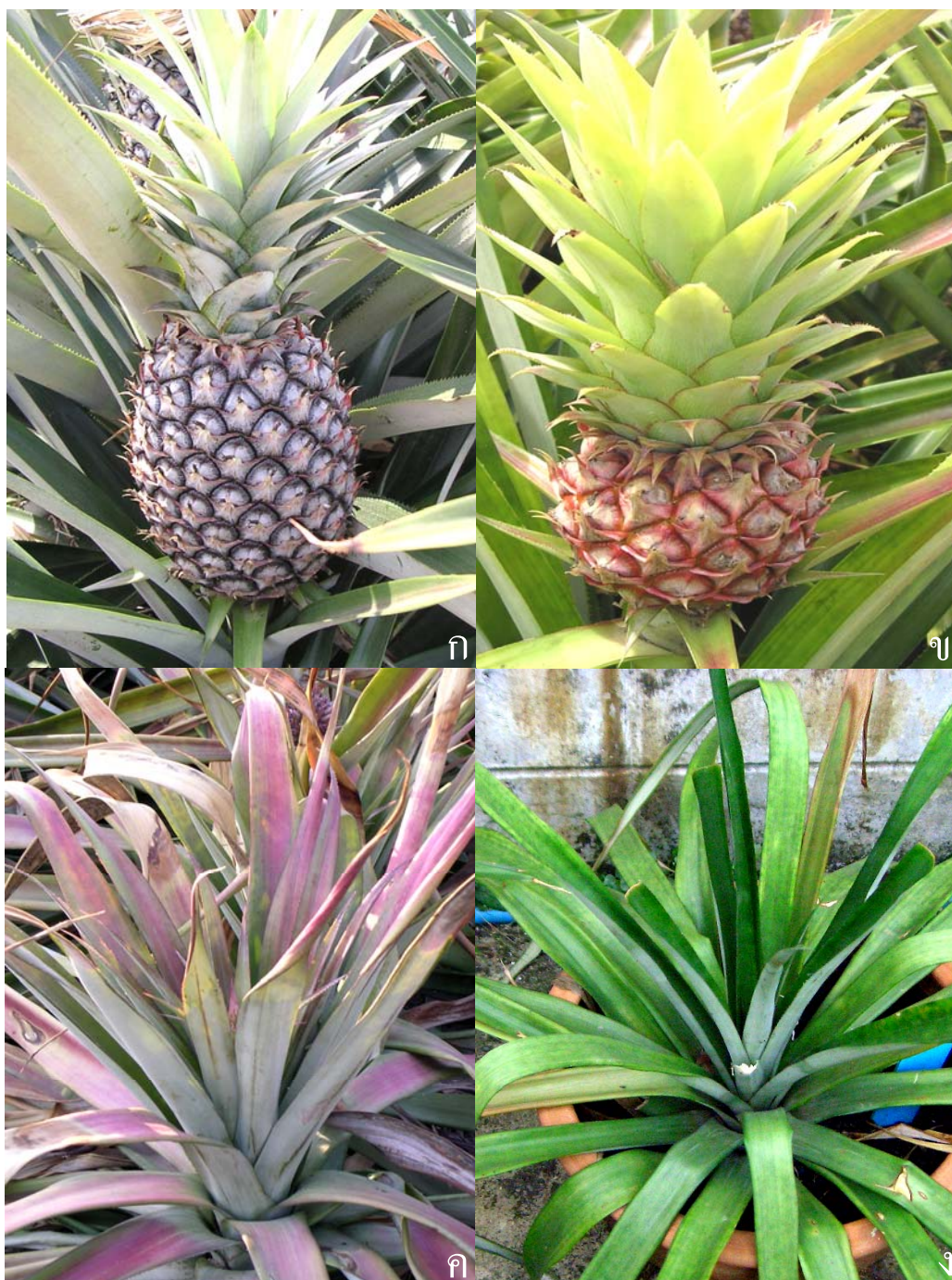
^{8/} MS-Mosaic = ใบด่าง ^{9/} PS-Purple spot = แผลจุดสีม่วง

^{10/} LNS-Local lesion-large necrosis spot = ใบไหม้แผลขนาดใหญ่



ภาพที่ 2 ต้นสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวียที่ปลูกในจังหวัดเพชรบุรีแสดงอาการผิดปกติคล้ายไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด

- ก. การแพร่ระบาดของโรคเหี่ยว (Pineapple wilt) เนื่องจากไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (Pineapple mealybug wilt-associated virus : PMWaV) การเกิดโรคเป็นวงกลม
- ข. ต้นสับปะรดแสดงอาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้บิด



ภาพที่ 3 อาการผิดปกติของสับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย ที่เกิดจากการเข้าทำลายของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด

- ก. ผลสับปะรดปกติ ในแปลงปลูกจังหวัดเพชรบุรี
- ข. ผลสับปะรดแสดงอาการผลสีแดง ผลมีขนาดเล็กลง และมีขนาดเล็กกว่าลูก
- ค. ใบสับปะรด มีอาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้บิด
- ง. ต้นสับปะรดแสดงอาการต่างเหลือง ปลายใบไหม้ เมื่อนำต้นมาปลูกในโรงเรือน



ภาพที่ 4 อาการผิดปกติที่เกิดจากการเข้าทำลายของไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด

- ก. ใบต่างแถบสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน
- ข. ใบต่างเหลืองสลับสีเขียว
- ค. ใบจุดสีเหลืองสลับสีเขียวเข้ม จุดประเนื่องจากเกิดการตายของเนื้อเยื่อใบ
- ง. ใบจุดสีม่วง หรืออาการแผลจุดตายสีน้ำตาล
- จ.-ช. สับปะรดที่คาดว่าโรค ไม่แสดงอาการ

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมของสับปะรด เพิ่มปริมาณยีนและการโคลนยีน HSP 70

ความสัมพันธ์ของผลการตรวจพบอาการผิดปกติที่คล้ายอาการของโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด (*Pineapple mealybug wilt-associated viruses: PMWaVs*) ซึ่งเกิดสอดคล้องกับผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการใช้ไพรเมอร์คู่เฉพาะสำหรับเพิ่มปริมาณยีน Heat shock protein homologous (HSP70) บางส่วน พบว่า อาการที่ปรากฏอย่างชัดเจน คือ ใบแก่มีอาการใบต่างเหลือง อาการเนื้อใบเปลี่ยนเป็นสีแดงซึ่งคล้ายอาการขาดธาตุฟอสฟอรัส สับปะรดจำนวน 7 ตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ขนาด ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 590 คู่เบส จำนวน 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างสับปะรดที่เหลืออีกจำนวน 5 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 610 คู่เบส อาการใบจุดแห้งตายซึ่งลักษณะจุดแผลต่างกัน ขึ้นอยู่กับลักษณะพันธุ์ และพื้นที่สำหรับปลูก สำหรับต้นสับปะรดที่ปลูกในโรงเรือน ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน จำนวน 4 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 590 คู่เบส จำนวน 2 ตัวอย่าง และตัวอย่างที่เหลืออีกจำนวน 5 ตัวอย่าง พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 610 คู่เบส เมื่อตรวจสอบตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการ ซึ่งเก็บมาจากแปลงเดียวกันกับที่พบโรค พบว่า ตัวอย่างที่พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 590 คู่เบส ชนิดเดียว คือ H1 และ H3 ตัวอย่างที่พบทั้งแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 590 คู่เบส และ 610 คู่เบส ร่วมกันมี 2 ตัวอย่าง คือ HO และ H2 (ตารางที่ 1 และ 2)

จากการแยกสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบสับปะรดทั้งใบอ่อนหรือใบแก่โดยใช้ชุดน้ำยา RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, ประเทศสหรัฐอเมริกา) นั้นนอกจากใช้ชิ้นส่วนพืชปริมาณน้อยยังเป็นวิธีที่รวดเร็ว และได้ปริมาณอาร์เอ็นเอมากและมีคุณภาพดี เมื่อนำมาตรวจสอบการเป็นโรคเบื้องต้นด้วยเทคนิค RT-PCR โดยการใช้ไพรเมอร์คู่เฉพาะสำหรับไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด ในการทดลองนี้ สำหรับเพิ่มปริมาณยีน Heat shock protein homologous (HSP70) บางส่วน ขนาด 590 คู่เบส และ 610 คู่เบส ของไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 ตามลำดับ พบว่า ตัวอย่างสับปะรดที่เพิ่มปริมาณยีน 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 PMWaV-2 ร่วมกันมี 7 ตัวอย่าง ได้แก่ HO, H2, Chb2-KU, Chb01-DOA, Chb02-DOA, Chb03-DOA และ Pch03-DOA (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การตรวจสอบตัวอย่างสัประตเป็นโรค ด้วยเทคนิค RT-PCR

ลำดับที่	รหัสตัวอย่าง	พันธุ์	ผลการตรวจสอบด้วย RT-PCR ^{1/}			
			PMWaV-1 ^{2/}		PMWaV-2 ^{3/}	
			ไบอ่อน	ไบแก่	ไบอ่อน	ไบแก่
1	H1-KU	ศรีราชา	+ ^{4/}	+	- ^{5/}	-
2	H2-KU	ศรีราชา	+	+	+	+
3	H3-KU	ศรีราชา	+	+	-	-
4	Chb1-KU	ศรีราชา	-	-	+	+
5	Chb2-KU	ศรีราชา	+	+	+	+
6	Chb3-KU	ศรีราชา	-	-	+	+
7	Chb6-KU	ศรีราชา	-	-	+	+
8	Nal1-KU	นางแล	-	NT ^{6/}	-	NT
9	Chb01-DOA	ปัตตาเวีย	+	-	+	-
10	Chb02-DOA	ปัตตาเวีย	-	+	-	+
11	Chb03-DOA	ปัตตาเวีย	-	+	-	+
12	Pch01-DOA	ปัตตาเวีย	-	-	-	-
13	Pch02-DOA	ปัตตาเวีย	-	-	-	-
14	Pch03-DOA	ปัตตาเวีย	-	+	-	+
15	Pbu01-DOA	ปัตตาเวีย	-	-	-	-
16	Pbu02-DOA	ปัตตาเวีย	-	-	-	-
17	Pbu03-DOA	ปัตตาเวีย	-	-	NT	NT
18	Tr01-DOA	ตราดสีทอง	-	-	-	+
19	HO-DOA	ศรีราชา	NT	+	NT	+
20	CO-DOA	ศรีราชา	NT	+	NT	-
21	Phu01-KU	ภูเก็ต	-	-	+	+

^{1/} ผลการตรวจสอบด้วยเทคนิค RT-PCR คือ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน HSP70

ด้วยเทคนิค One step RT-PCR หรือ Two step RT-PCR

^{2/} PMWaV-1 = พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 590 คู่เบส

^{3/} PMWaV-2 = พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 610 คู่เบส

^{4/} + = ตรวจพบแถบดีเอ็นเอของยีน HSP70 (positive result)

^{5/} - = ตรวจไม่พบแถบดีเอ็นเอของยีน HSP70 (negative result)

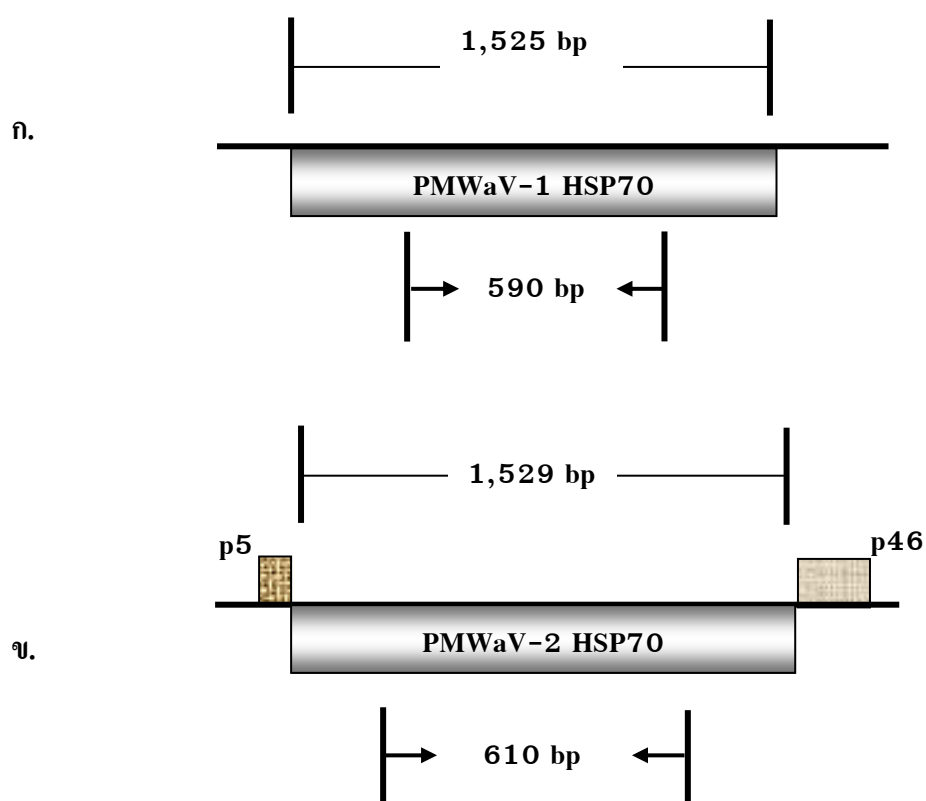
^{6/} NT = ไม่ได้ทำการตรวจตัวอย่างนั้น

3. การเพิ่มปริมาณยีน HSP 70 ด้วยเทคนิค RT-PCR

ยีน HSP 70 ของเชื้อไวรัส (AF414119) และ PMWaV-2 (AF283103) ที่มีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกา แบบครบยีน ดีเอ็นเอมีขนาด 1,525 คู่เบส และ 1,529 คู่เบส ตามลำดับ การเพิ่มปริมาณยีน HSP70-cDNA บางส่วน ด้วยเทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบเชื้อ PMWaV-1 ด้วยไพรเมอร์คู่ Pv1hsp705'/Pc1hsp703' ซึ่งคาดว่าจะได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 590 คู่เบส และ PMWaV-2 โดยไพรเมอร์คู่ Pv2hsp5'/Pc2hsp3' คาดว่าได้แถบดีเอ็นเอยีน HSP70 ขนาดประมาณ 610 คู่เบส (ภาพที่ 5)

ภายหลังได้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-2 ด้วยเทคนิค One step RT-PCR จากตัวอย่างสับปะรด Chb1-KU พันธุ์ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ที่แสดงอาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้บิด โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Pv2hsp705'/Pc2hsp703' แล้ววิเคราะห์ขนาดซึ่งพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 610 คู่เบส และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ตัวอย่างสับปะรด Chb2-KU พันธุ์ศรีราชา จังหวัดชลบุรี ที่แสดงอาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้บิด เช่นเดียวกันกับตัวอย่างแรก โดยใช้ไพรเมอร์คู่ Pv1hsp705'/Pc2hsp703' ซึ่งพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 590 คู่เบส ผลเป็นไปตามที่คาดหวัง (ภาพที่ 6)

เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอยีน HSP70 ด้วยเทคนิค Two step RT-PCR โดยใช้อาร์เอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างสับปะรดพันธุ์ศรีราชาจำนวน 3 ตัวอย่าง คือ ตัวอย่างที่ 1 สับปะรดพันธุ์ศรีราชาที่เก็บจากแปลงปลูกในจังหวัดชลบุรี แสดงอาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้บิด Chb6-KU ตัวอย่างที่ 2 สับปะรดพันธุ์ศรีราชาที่เก็บจากแปลงปลูกในจังหวัดชลบุรีแสดงอาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้บิดผ่านการแช่น้ำร้อนเพื่อกำจัดเชื้อไวรัสแล้วนำปลูกในโรงเรือน HO ซึ่งทั้ง 2 ตัวอย่างนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตร และตัวอย่างที่ 3 สับปะรดพันธุ์ศรีราชาที่เก็บจากแปลงปลูกในจังหวัดชลบุรีแสดงอาการเส้นใบแดง ปลายใบไหม้บิด CO เมื่อใช้ไพรเมอร์คู่ Pv2hsp5'/Pc2hsp3' สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 610 คู่เบส ในส่วนยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaV-2 จากดีเอ็นเอต้นแบบที่สกัดจากตัวอย่างสับปะรดที่ผ่านการแช่น้ำร้อน ได้เพียงตัวอย่างเดียว ในขณะที่ไพรเมอร์คู่ Pv1hsp5'/Pc1hsp3' สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนของยีน HSP70 ของเชื้อ PMWaV-1 จากดีเอ็นเอที่สกัดจากใบแก่ของสับปะรดพันธุ์ศรีราชาทั้ง 3 ตัวอย่าง ซึ่งตรวจพบว่าดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้มีขนาดประมาณ 590 คู่เบส (ภาพที่ 7) จากการเปรียบเทียบทั้งเทคนิค One step RT-PCR และเทคนิค Two step RT-PCR พบว่า ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน

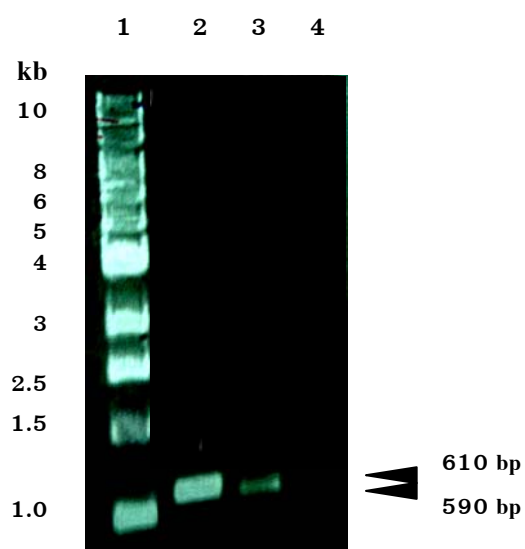


ภาพที่ 5 แผนที่แสดงตำแหน่งของไพรเมอร์สำหรับการโคลนนิ่งและการเพิ่มปริมาณยีน HSP 70 ด้วยวิธี RT-PCR

ไพรเมอร์ คู่ที่ 1 : Pv1hsp5' /Pc1hsp3' (ก)

ไพรเมอร์ คู่ที่ 2 : Pv2hsp5' /Pc2hsp3' (ข)

→ แสดงทิศทางการทำงานของยีน



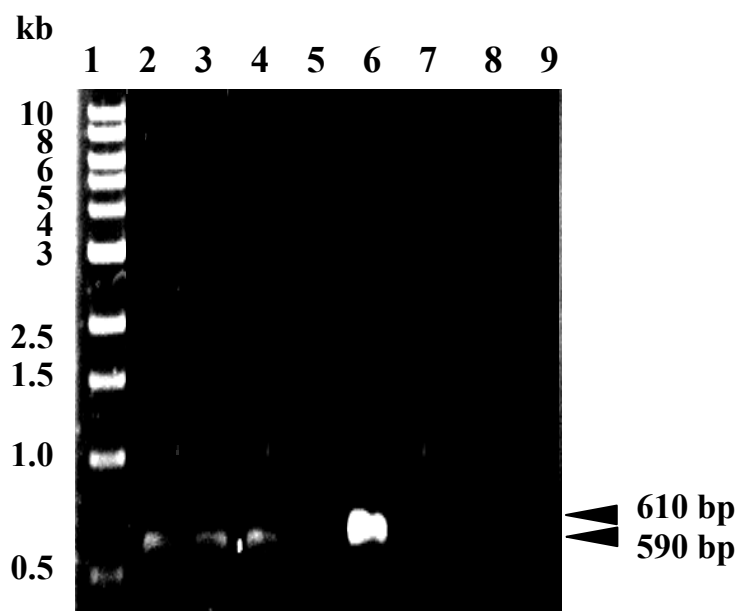
ภาพที่ 6 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีนHSP70 ของPMWaV-1 (590 คู่เบส) และ PMWaV-2 (610 คู่เบส) ด้วยเทคนิค One-step RT-PCR จากตัวอย่างสับปะรด จังหวัดชลบุรี บน 0.7% TBE agarose gel

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (BioLabs)

ช่องที่ 2 : Chb1-KU ไพร์เมอร์ Pv2hsp705'/Pc2hsp703'

ช่องที่ 3 : Chb2-KU ไพร์เมอร์ Pv1hsp705'/Pc1hsp703'

ช่องที่ 4 : Rnase-free water



ภาพที่ 7 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน HSP 70 ของ PMWaV-1 (590 คู่เบส) และ PMWaV-2 (610 คู่เบส) ด้วยเทคนิค Two-step RT-PCR จากตัวอย่างสับปะรดที่มาจากแหล่งเพาะปลูกต่างๆ ในประเทศไทย บน 0.7% TBE agarose gel

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (BioLabs)

ช่องที่ 2 : Chb6-KU ไพรเมอร์ Pv1hsp705'/Pc1hsp703'

ช่องที่ 3 : HO-DOA ไพรเมอร์ Pv1hsp705'/Pc1hsp703'

ช่องที่ 4 : CO-DOA ไพรเมอร์ Pv1hsp705'/Pc1hsp703'

ช่องที่ 5 : Rnase-free water

ช่องที่ 6 : Chb6-KU ไพรเมอร์ Pv2hsp705'/Pc2hsp703'

ช่องที่ 7 : HO-DOA ไพรเมอร์ Pv2hsp705'/Pc2hsp703'

ช่องที่ 8 : CO-DOA ไพรเมอร์ Pv2hsp705'/Pc2hsp703'

ช่องที่ 9 : Rnase-free water

4. การเชื่อมดีเอ็นเอยีน HSP70 และการคัดเลือกหาเซลล์ที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสม

เมื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสม pGEM-T Easy/HSP70-PW1 และ pGEM-T Easy/HSP70-PW2 โดยบรรจุเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α สามารถคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ซึ่งตรวจพบว่าดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 3.605 และ 3.625 กิโลเบสตามลำดับ เมื่อย่อยพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* แล้ววิเคราะห์ขนาด บน 0.7% TBE agarose gel พบแถบดีเอ็นเอของเวกเตอร์ pGEM-T Easy ขนาดประมาณ 3.015 กิโลเบส และแถบดีเอ็นเอของยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 ที่ไม่ครบสมบูรณ์ มีขนาดประมาณ 590 คู่เบส และ 610 คู่เบส ตามลำดับ แล้วนำโคโลนีเดี่ยวที่คัดเลือกได้ ที่มีดีเอ็นเอยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ที่ไม่ครบสมบูรณ์ จำนวน 1 โคลน ได้แก่ 1/44 สกัดมาจากตัวอย่างจากสับปะรดพันธุ์ศรีราชา HO และพลาสมิดลูกผสมที่มีดีเอ็นเอยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-2 ที่ไม่ครบสมบูรณ์ จำนวน 1 โคลน ได้แก่ 2/47 ที่สกัดจากตัวอย่างสับปะรด Chb2-KU แล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่หน่วยบริการชีวภาพ Bio Service Unit ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (ABI Prism model 3100)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HSP70

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม DNA Star (LaserGene, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ร่วมกับโปรแกรม VECTOR NTI SUIT 6 (Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน HSP70 ของไวรัส PMWaV-1 จากสับปะรดพันธุ์ศรีราชา HO มีขนาดประมาณ 590 คู่เบส และไวรัส PMWaV-2 จากสับปะรด Chb2-KU มีขนาดประมาณ 610 คู่เบส ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ขนาดดีเอ็นเอ บน 0.7% TBE agarose gel ดังกล่าวแล้วในข้อ 4.1 ภายหลังจากนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน HSP70 ของไวรัส PMWaV-1 โคลนที่ 1/44 จากสับปะรดพันธุ์ศรีราชา HO มาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า มีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 ไวรัส PMWaV-1 ที่มีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกาในระดับ 97 % identity (ภาพที่ 8)

เมื่อนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน HSP70 ของไวรัส PMWaV-2 จากสับปะรด Chb2-KU โคลนที่ 2/47 มาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่ามีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 ไวรัส PMWaV-2 ที่มีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกาในระดับ 98 % identity (ภาพที่ 9)

		1	50
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(1)	ACAGGAAGGAC-ACACTCA	TGCCATAGGTTTGGGGGCACTGTTGGAAAAA
USA: PMWaV-1 HSP70	(1)	ACAGGAAGGACACACTCAC	GCCATAGGTTTGGGGGCACTGTTGGAAAAA
Consensus	(1)	ACAGGAAGGAC ACACTCA	GCCATAGGTTTGGGGGCACTGTTGGAAAAA
		51	100
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(51)	GACTTAGAGGTTTATCGTGATATAAAAAGGTATTTTCGGACTCAACAAGTT	
USA: PMWaV-1 HSP70	(51)	GACTTAGAGGTTTATCGTGATATAAAAAGGTATTTTCGGACTCAACAAGTT	
Consensus	(51)	GACTTAGAGGTTTATCGTGATATAAAAAGGTATTTTCGGACTCAACAAGTT	
		101	150
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(101)	CAACAAAGATGTGTATCTCGATAAATTGAAACCCACAATCGAGGT	GTTGG
USA: PMWaV-1 HSP70	(101)	CAACAAAGATGTGTATCTCGATAAATTGAAACCCACAATCGAGGT	AGTGA
Consensus	(101)	CAACAAAGATGTGTATCTCGATAAATTGAAACCCACAATCGAGGT	GTTG
		151	200
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(151)	TTGACGCTGGGGTTGTCTATAGGACCAGTAGACGGTGCG	AGAGGGAAA
USA: PMWaV-1 HSP70	(151)	TTGACGCTGGGGTTGTCTATAGGACCAGTAGACGGTGCG	CCGGGAAA
Consensus	(151)	TTGACG CTGGGGTTGT CTATAGGACCAGTAGACGGTGCG	G GGGAAA
		201	250
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(201)	ACCAATCAGTTCTCACTTTAGCCTCTGATTTTATAACGGGATTGGTACA	
USA: PMWaV-1 HSP70	(201)	GCCAATCAGTTCTCACTTTAGCCTCTGATTTTATAACGGGATTGGTACA	
Consensus	(201)	CCAATCAGTTCTCACTTTAGCCTCTGATTTTATAACGGGATTGGTACA	
		251	300
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(251)	ACTAGCGATCAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAG	
USA: PMWaV-1 HSP70	(251)	ACTAGCGATCAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAG	
Consensus	(251)	ACTAGCGATCAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAG	
		301	350
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(301)	TACCAGCAGCTTACAATTCTTATCAAAGGGGTTTTATTTTGAAGTTGT	
USA: PMWaV-1 HSP70	(301)	TACCAGCAGCTTACAATTCTTATCAAAGGGGTTTTATTTTGAAGTTGT	
Consensus	(301)	TACCAGCAGCTTACAATTCTTATCAAAGGGGTTTTATTTTGAAGTTGT	
		351	400
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(351)	AAGTTGAGCTCTATAAATGTGCAGGCGGTAGTAAACGAACCGACCGCAGC	
USA: PMWaV-1 HSP70	(351)	AAGTTGAGCTCTATAAATGTGCAGGCGGTAGTAAACGAACCGACCGCAGC	
Consensus	(351)	AAGTTGAGCTCTATA ATGTGCAGGCGGTAGTAAACGAACCGACCGCAGC	
		401	450
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(401)	TGGATTGAGTGCTTTCATAACTACCCCGAAA	CTTCTGTGAATTATTTGT
USA: PMWaV-1 HSP70	(401)	TGGATTGAGTGCTTTCATAACTACCCCGAAA	GCTTCTGTGAATTATTTGT
Consensus	(401)	TGGATTGAGTGCTTTCATAACTACCCCGAAA	CTTCTGTGAATTATTTGT
		451	500
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(451)	TCGTCTACGATTTCGGAGGAGGCACTTT	GATAGTTCCCTACTCGTGGTT
USA: PMWaV-1 HSP70	(451)	TAGTCTACGATTTCGGAGGAGGCACTTT	GATAGTTCCCTACTCGTGGTT
Consensus	(451)	T GCTACGATTTCGGAGGAGGCACTTT	GATAGTTCCCTACTCGTGGTT
		501	550
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(501)	GGGCGTGCCTACGTGGGAGTACTGGATTTCGATGGGAGATAACTATCTGGG	
USA: PMWaV-1 HSP70	(501)	GGGCGTGCCTACGTGGGAGTACTGGATTTCGATGGGAGATAACTATCTGGG	
Consensus	(501)	GGG TGCCTACGTGGGAGTACTGGATTTCGATGGGAGATAACTATCTGGG	
		551	590
Thailand: PMWaV-1 HSP70	(551)	AGGCAGGGACGTAGATAACAGATTGCTTGAAGTTTGTGCG	
USA: PMWaV-1 HSP70	(551)	AGGCAGGGACGTAGATAACAGATTGCTTGAAGTTTGTGCG	
Consensus	(551)	AGGCAGGGACGTAGATAACAGATTGCTTGAAGTTTGTGCG	

ภาพที่ 8 เปรียบเทียบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ระหว่าง Thailand isolate และ US isolate (AF414119) ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยโปรแกรม VECTOR NTI (invitrogen) ขนาด 590 นิวคลีโอไทด์ พบว่า ต่างกัน 13 ตำแหน่ง คิดเป็น 97 % identity

		1	50
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(1)	CATACGAACTAGACTCATACGTGCTAAAATTAAAACCAGTGCACAGAGTG	
USA: PMWaV-2 HSP70	(1)	CATACGAACTAGACTCATACGTGCTAAAATTAAAACCAGTGCACAGAGTG	
Consensus	(1)	CATACGAACTAGACTCATACGTGCTAAAATTAAAACCAGTGCACAGAGTG	
		51	100
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(51)	GAAGTGTTCAAGGACGGGTCGGTAATGCTAGGGGGTATTGGTGAAGGCC	
USA: PMWaV-2 HSP70	(51)	GAAGTGTTCAAGGACGGGTCGGTAATGCTAGGGGGTATTGGTGAAGGCC	
Consensus	(51)	GAAGTGTTCAAGGACGGGTCGGTAATGCTAGGGGGTATTGGTGAAGGCC	
		101	150
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(101)	TGATAGGACAGTCTCTGTAACGGATATCATATCCCTTTTTTCTAAAGCAC	
USA: PMWaV-2 HSP70	(101)	TGATAGGACAGTCTCTGTAACGGATATCATATCCCTTTTTTCTAAAGCAC	
Consensus	(101)	TGATAGGACAGTCTCTGTAACGGATATCATATCCCTTTTTTCTAAAGCAC	
		151	200
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(151)	TTATAAAGGAAGCGGAACAGTCTACTGGACTACGCGTAACGGGTGCGGTG	
USA: PMWaV-2 HSP70	(151)	TTATAAAGGAAGCGGAACAGTCTACTGGACTACGCGTAACGGGTGCGGTG	
Consensus	(151)	TTATAAAGGAAGCGGAACAGTCTACTGGACTACGCGTAACGGGTGCGGTG	
		201	250
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(201)	GTAACGGTACCAGCCGACTACAACCTTTTAAACGTAGTTTATAACTAA	
USA: PMWaV-2 HSP70	(201)	GTAACGGTACCAGCCGACTACAACCTTTTAAACGTAGTTTATAACTAA	
Consensus	(201)	GTAACGGTACCAGCCGACTACAACCTTTTAAACGTAGTTTATAACTAA	
		251	300
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(251)	CTGCATGAAAGACTTGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGA	
USA: PMWaV-2 HSP70	(251)	CTGCATGAAAGACTTGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGA	
Consensus	(251)	CTGCATGAAAGACTTGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGA	
		301	350
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(301)	CCGCTGCAGCGTTATATTCTTTATCTATATTACAAGAAAAGGATTTATTT	
USA: PMWaV-2 HSP70	(301)	CCGCTGCAGCGTTATATTCTTTATCTATATTACAAGAAAAGGATTTATTT	
Consensus	(301)	CC C GCAGCGTTATATTCTTTATCTATATTACAAGAAAAGGATTTATTT	
		351	400
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(351)	CTGTCGTGTTTTGACTTTGGTGGAGGGACGTTTGATGTGTCTTTTGTTAG	
USA: PMWaV-2 HSP70	(351)	CTGTCGGCTTTTGACTTTGGTGGAGGGACGTTTGATGTGTCTTTTGTTAG	
Consensus	(351)	CTGTC G TTTTGACTTTGGTGGAGGGACGTTTGATGTGTCTTTTGTTAG	
		401	450
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(401)	AAAACCTCGGAGATGTGGTATGCGTACTGTCTTAGCGTTGGCGATAACTTTT	
USA: PMWaV-2 HSP70	(401)	AAAACCTCGGAGATGTGGTATGCGTACTGTCTTAGCGTTGGCGATAACTTTT	
Consensus	(401)	AAAACCTCGGAGATGTGGTATGCGTACTG TTAGCGTTGGCGATAACTTTT	
		451	500
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(451)	TAGGGGGAAGGGATATCGACAGGGCGGTAGCAGCTGAGGTGAAGGCAAG	
USA: PMWaV-2 HSP70	(451)	TAGGGGGAAGGGATATCGACAGGGCGGTAGCAG-CTGAGGTGAAGGCAAG	
Consensus	(451)	TAGGGG AAGGGATATCGACAGGGCGGTAGCAG CTGAGGTGAAGGCAAG	
		501	550
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(501)	AGTGGGCGAATCTATTGATACAGCTACATTGTCATTATTTCAGCGTCTA	
USA: PMWaV-2 HSP70	(498)	AGTGGGCGAATCTATCGATACAGCTACATTGTCATTATTTCAGCGTCTA	
Consensus	(501)	AGTGGGCGAATCTAT GATACAGCTACATTGTCATTATTTCAGCGTCTA	
		551	600
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(551)	TTAAAGAGGAGGTGACTAATGAGCCGAGGGCAAAGACGCACGTAGTAAAA	
USA: PMWaV-2 HSP70	(548)	TTAAAGAGGAGGTACTAATGAGCCGAGGGCAAAGACGCACGTAGTAAAA	
Consensus	(551)	TTAAAGAGGAGGT ACTAATGAGCCGAGGGCAAAGACGCACGTAGTAATT	
		601	611
Thailand: PMWaV-2 HSP70	(601)	TTGGTGGATGG	
USA: PMWaV-2 HSP70	(598)	TTGGTGGATGG	
Consensus	(601)	TTGGTGGATGG	

ภาพที่ 9 เปรียบเทียบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน HSP70 ของเชื้อไวรัส PMWaV-2 ระหว่าง Thailand isolated และ US isolated (AF283103) ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEM-T Easy ด้วยโปรแกรม VECTOR NTI (invitrogen) ขนาด 610 นิวคลีโอไทด์ พบว่า ต่างกัน 10 ตำแหน่ง คิดเป็น 98 % identity

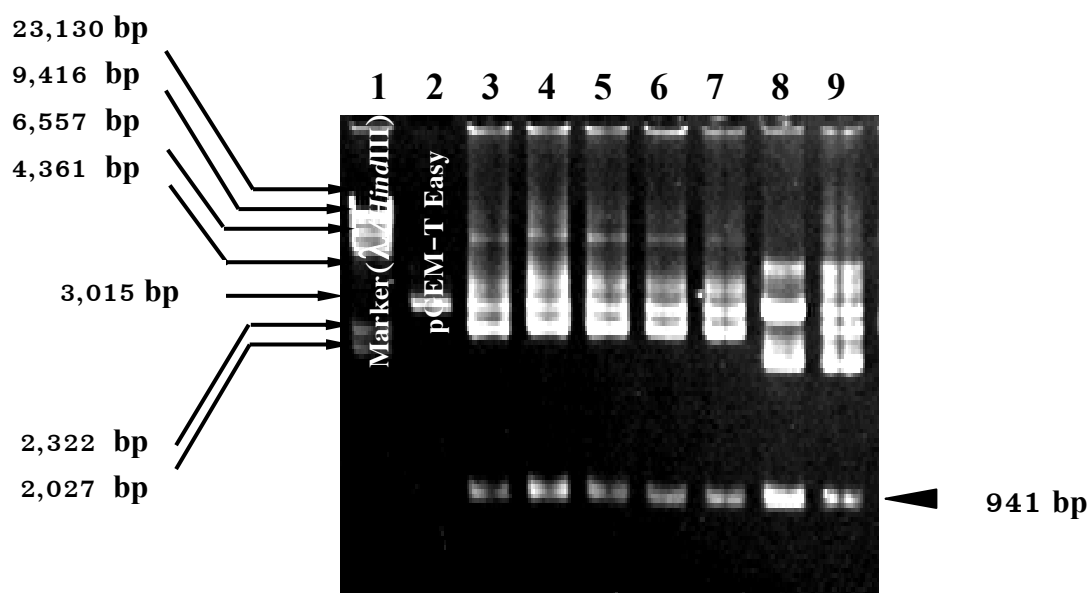
6. การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของยีนโปรตีนห่อหุ้มของไวรัส PMWaV-1

6.1 การเพิ่มปริมาณและการโคลนดีเอ็นเอยีน CP

ยีน CP ของเชื้อไวรัส (AF414119) ที่มีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกา ในระบบฐานข้อมูลของ GenBank แบบครบยีน มีการเรียงตัวจากปลาย 5' ไปสู่ปลาย 3' ดีเอ็นเอมีขนาด 772 คู่เบส มีแปลรหัสกรดอะมิโน ได้กรดอะมิโน จำนวน 257 เรซิดิวส์ จากการเพิ่มปริมาณ CP-cDNA โดยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์คู่ P1CP1F/P1CP2R ที่ออกแบบเพิ่มจากยีน CP เดิม (-100 และ +100 นิวคลีโอไทด์) เชื่อมต่อ PCR product ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ pGEM-T Easy เมื่อเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสม pGEM-T Easy/CP gene-PW1 โดยบรรจุเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α สามารถคัดเลือกโคโลนีเดียวที่เจริญได้บนอาหารคัดเลือก ซึ่งตรวจพบว่าดีเอ็นเอมีขนาดประมาณ 3.956 กิโลเบส เมื่อย่อยพลาสมิดที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์ *EcoRI* ได้พลาสมิดที่มีดีเอ็นเออยู่ในพลาสมิดสายผสม จำนวน 7 โคลน แล้ววิเคราะห์ขนาด บน 1 % TBE agarose gel พบแถบดีเอ็นเอของเวกเตอร์ pGEM-T Easy ขนาดประมาณ 3.015 กิโลเบส และแถบดีเอ็นเอของยีน CP ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 941 คู่เบส (ภาพที่ 10) ตกตะกอนดีเอ็นเอ เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ภายหลังนำดีเอ็นเอพลาสมิดลูกผสม pGEM-T Easy/CP gene-PW1 ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเพิ่มปริมาณพลาสมิดลูกผสม CP ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 โดยเทคนิค PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ Pv1CP1E/Pc1CP2S ใหม่อีกครั้ง เพื่อให้ได้ CP-cDNA ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 แบบครบยีน พบว่า สามารถสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณยีน CP ของไวรัส PMWaV-1 ได้พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสอดแทรกขนาดประมาณ 772 คู่เบส ดีเอ็นเออยู่ในพลาสมิดสายผสม ชื่อ pGEM-2T/CP1-772 จำนวน 4 โคลน (ภาพที่ 11)

การสกัดพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมใหม่นี้ชื่อว่า pGEM-2T/CP1-772 โคลนที่ 3.2.2 ออกจาก *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี alkaline lysis method จากนั้นนำพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสม pGEM-2T-772 (3.2.2) มาย่อยนิวคลีโอไทด์ส่วนที่อยู่นอกยีน CP ออกด้วยเอนไซม์สองชนิดที่เป็นตำแหน่งสำหรับโคลนเข้า pGEX-2T Expression vector (Amersham, ประเทศสหรัฐอเมริกา) คือ *EcoRI* และ *SacI* พบว่า ได้พลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสอดแทรกขนาดประมาณ 772 คู่เบส ผลเป็นไปตามที่คาดหวัง



ภาพที่ 10 ผลการวิเคราะห์ดีเอ็นเอที่ได้จากการย่อยพลาสมิดสายผสม pGEM-T Easy/CP ของ PMWaV-1 ที่แยกได้จากสับปะรด และย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* พบแถบดีเอ็นเอขนาด 941 คู่เบส บน 1% TBE agarose gel

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (Marker) λ HindIII ขนาด 2,027 คู่เบส ถึง 23,130 คู่เบส

ช่องที่ 2 : pGEM-T Easy ที่ไม่มีชิ้น insert

ช่องที่ 3 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 1

ช่องที่ 4 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 2

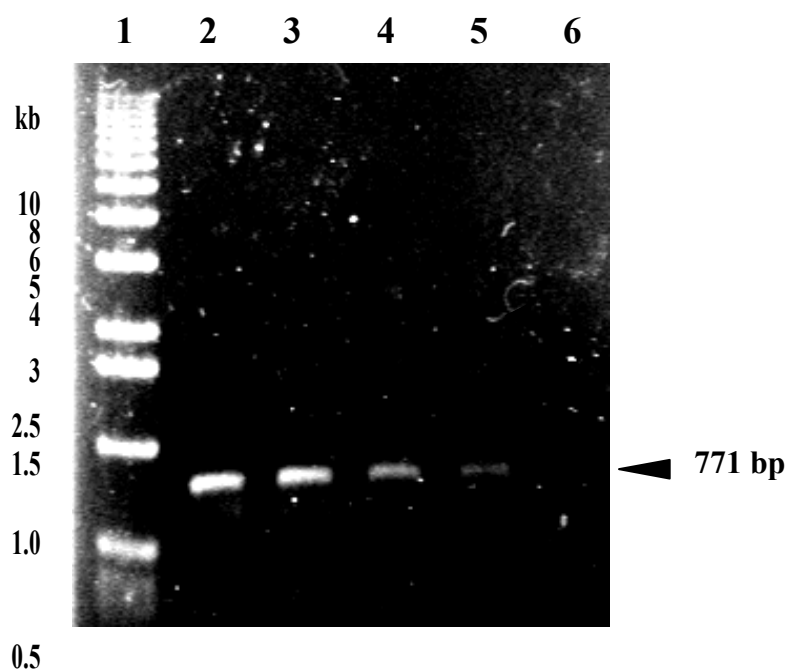
ช่องที่ 5 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 3

ช่องที่ 6 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 4

ช่องที่ 7 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 5

ช่องที่ 8 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 6

ช่องที่ 9 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 7



ภาพที่ 11 ผลการวิเคราะห์พลาสมิดสายผสม pGEM-T Easy/CP ของ PMWaV-1 ที่เพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ Pv1CP1E/Pc1CP2S พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 771 คู่เบส เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วย 0.8% TBE agarose gel

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 kb DNA ladder (BioLabs)

ช่องที่ 2 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 3.1.1

ช่องที่ 3 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 3.1.2

ช่องที่ 4 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 3.2.1

ช่องที่ 5 : pGEM-T Easy /CP gene โคลนที่ 3.2.2

ช่องที่ 6 : Rnase-free water

6.2 การเตรียม linear DNA ของพลาสมิด pGEX-2T Expression vector

ทดสอบวิธีการเตรียม linear DNA ด้วยวิธีการต่าง ๆ 3 แบบวิธี นั้น พบว่า ทั้งสามแบบวิธีสามารถย่อยพลาสมิด pGEX-2T ได้เป็น linear DNA ขนาดประมาณ 4,978 คู่เบส และให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน

6.3 การคัดเลือกพลาสมิดสายผสม pGEX-2T/ CP gene

จากการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวสีขาวจำนวน 6 โคโลนี ที่ได้มาจากการเชื่อมต่อ linear DNA ของพลาสมิด pGEX-2T ที่เตรียมจากการย่อยด้วยเอนไซม์ *SacI* พร้อมกับ *EcoRI* เข้ากับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายโปรตีนห่อหุ้ม (CP gene) พบว่า ในอัตราส่วน 3:1 ได้รีคอมบิแนนท์โคโลนีจำนวน 2 โคโลนี คือ โคโลนี 5 pW772/CP1 S/E และโคโลนี 3 pW772/CP1 S/E และในอัตราส่วน 6:1 ได้รีคอมบิแนนท์โคโลนีจำนวน 3 โคโลนี คือ โคโลนี 1.1 pW772/CP1 S/E โคโลนี 1.5 pW772/CP1 S/E และโคโลนี 1.6 pW772/CP1 S/E พลาสมิด pGEX-2T ที่เตรียมจากการย่อยด้วยเอนไซม์ *EcoRI* และตามด้วยเอนไซม์ *SacI* เข้ากับชิ้นดีเอ็นเอเป้าหมายโปรตีนห่อหุ้ม (CP gene) พบว่า ในอัตราส่วน 3:1 ได้รีคอมบิแนนท์โคโลนีจำนวน 3 โคโลนี คือ โคโลนี 1 pW772/CP1 E/S และโคโลนี 2 pW772/CP1 E/S

6.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน CP ของ PMWaV-1

จากการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน CP ของ PMWaV-1 สับปะรดพันธุ์ศรีราชา Chb1-KU จากจังหวัดชลบุรี ของประเทศไทย พบว่า ดีเอ็นเอมีขนาด 774 คู่เบส เมื่อเปรียบเทียบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน CP ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ระหว่าง Thailand isolated ที่สกัดได้จากสับปะรดพันธุ์ศรีราชา Chb1-KU จังหวัดชลบุรี ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEX-2T Expression vector และ US isolated (AF414119) และไวรัสโรคเหี่ยวคลอสเทอโรไวรัสของสับปะรดชนิด PMWaV-1 ที่รายงานในประเทศสหรัฐอเมริกา (US isolated of PMWaV-1, accession number AF414119) ด้วยโปรแกรม VECTOR NTI (Invitrogen) พบว่า ต่างกัน 8 ตำแหน่ง คิดเป็น 98 % identity (98% identity) (ภาพที่ 12) การแปลรหัสเป็นโปรตีนยีน CP ของ PMWaV-1 ได้ frame ที่แปลรหัสถูกต้อง ได้กรดอะมิโนจำนวน 255 เรซิดิวส์ สอดคล้องกับผลการตรวจขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis โดยที่การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนนั้นมีตำแหน่งที่แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง การแปลรหัสเป็นโปรตีนได้ชนิดโปรตีนที่มีความเหมือนกันคิดเป็น 99 (99% identity) (ภาพที่ 13)

		1	50
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(1)	ATGGCTGATTCGAGCAACAAAAACA	GCTGAACATGCTGACTCTGGGCC
USA: PMWaV-1 CP	(1)	ATGGCTGATTCGAGCAACAAAAACA	ACCTGAACATGCTGACTCTGGGCC
Consensus	(1)	ATGGCTGATTCGAGCAACAAAAACA	CCTGAACATGCTGACTCTGGGCC
		51	100
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(51)	TAAGACAGTGGACGACCAAGTCAAGGAAATATGAACCT	GCTGTGCCGG
USA: PMWaV-1 CP	(51)	TAAGACAGTGGACGACCAAGTCAAGGAAATATGAACCT	ACCTGTGCCGG
Consensus	(51)	TAAGACAGTGGACGACCAAGTCAAGGAAATATGAACCT	CCTGTGCCGG
		101	150
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(101)	GAGGTAGGACTACTGTGTCGACGTTTGAAGATTGATAGCAGC	TGAAAAAT
USA: PMWaV-1 CP	(101)	GAGGTAGGACTACTGTGTCGACGTTTGAAGATTGATAGCAGC	CGAAAAAT
Consensus	(101)	GAGGTAGGACTACTGTGTCGACGTTTGAAGATTGATAGCAGC	GAAAAAT
		151	200
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(151)	GCTATAATTGATTTCACCAAGGTTGATGTACCACGCATGATTAACGTTCC	
USA: PMWaV-1 CP	(151)	GCTATAATTGATTTCACCAAGGTTGATGTACCACGCATGATTAACGTTCC	
Consensus	(151)	GCTATAATTGATTTCACCAAGGTTGATGTACCACGCATGATTAACGTTCC	
		201	250
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(201)	GATCCCAGGAATAGTTACTAATGCACACAAGGTGATAGGATCCAAAGCTC	
USA: PMWaV-1 CP	(201)	GATCCCAGGAATAGTTACTAATGCACACAAGGTGATAGGATCCAAAGCTC	
Consensus	(201)	GATCCCAGGAATAGTTACTAATGCACACAAGGTGATAGGATCCAAAGCTC	
		251	300
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(251)	TGTGGGAGTTGGGTAAATCGAAGGGTATATCAGAATCGGCGAAACACATG	
USA: PMWaV-1 CP	(251)	TGTGGGAGTTGGGTAAATCGAAGGGTATATCAGAATCGGCGAAACACATG	
Consensus	(251)	TGTGGGAGTTGGGTAAATCGAAGGGTATATCAGAATCGGCGAAACACATG	
		301	350
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(301)	ATCCAATTTTGTATGCAATCTTTCCAAGATATGTGCACCTTTTCTACATC	
USA: PMWaV-1 CP	(301)	ATCCAATTTTGTATGCAATCTTTCCAAGATATGTGCACCTTTTCTACATC	
Consensus	(301)	ATCCAATTTTGTATGCAATCTTTCCAAGATATGTGCACCTTTTCTACATC	
		351	400
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(351)	ACCGAAAGTTTCGGCGACTCAGAACTACTCCACCACAGCTAAGTATGATG	
USA: PMWaV-1 CP	(351)	ACCGAAAGTTTCGGCGACTCAGAACTACTCCACCACAGCTAAGTATGATG	
Consensus	(351)	ACCGAAAGTTTCGGCGACTCAGAACTACTCCACCACAGCTAAGTATGATG	
		401	450
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(401)	GTAAGATGTTAACGTCACGCACGAGGAGATCAGAATTGCTTTGAGCAAC	
USA: PMWaV-1 CP	(401)	GTAAGATGTTAACGTCACGCACGAGGAGATCAGAATTGCTTTGAGCAAC	
Consensus	(401)	GTAAGATGTTAACGTCACGCACGAGGAGATCAGAATTGCTTTGAGCAAC	
		451	500
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(451)	TCACTATCCAATTTGGGATACGATAATCCTATGAGACAGTTTGGGAGAGG	
USA: PMWaV-1 CP	(451)	TCACTATCCAATTTGGGATACGATAATCCTATGAGACAGTTTGGGAGAGG	
Consensus	(451)	TCACTATCCAATTTGGGATACGATAATCCTATGAGACAGTTTGGGAGAGG	
		501	550
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(501)	TTTTACTTCCACAATTGTTCAAGGACTGAGTTCTGGGAAGTTGGTGGTTA	
USA: PMWaV-1 CP	(501)	TTTTACTTCCACAATTGTTCAAGGACTGAGTTCTGGGAAGTTGGTGGTTA	
Consensus	(501)	TTTTACTTCCACAATTGTTCAAGGACTGAGTTCTGGGAAGTTGGTGGTTA	
		551	600
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(551)	ACACTAGGATATGTACTAAGAACGGAGTACCGAGGAATTATTACTCGTTC	
USA: PMWaV-1 CP	(551)	ACACTAGGATATGTACTAAGAACGGAGTACCGAGGAATTATTACTCGTTC	
Consensus	(551)	ACACTAGGATATGTACTAAGAACGGAGTACCGAGGAATTATTACTCGTTC	
		601	650
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(601)	TATCCAGGTTGCTTACACGTGAAGCCAGAGTACATGGTGATGATGCAGC	
USA: PMWaV-1 CP	(601)	TATCCAGATTGCTTACACGTGAAGCCAGAGTACATGGTGATGATGCAGC	
Consensus	(601)	TATCCAG TTGCTTACACGT GAAGCCAGAGTACA GGTGATGATGCAGC	
		651	700
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(651)	GTTGGTAAGTGAATTAGCCAGAATGGTAGCCATAAACAGAGCAAACCTCGA	
USA: PMWaV-1 CP	(651)	GTTGGTAAGTGAATTAGCCAGAATGGTAGCCATAAACAGAGCAAACCTCGA	
Consensus	(651)	GTTGGTAAGTGA TTAGCCAGAATGGTAGCCATAAACAGAGCAAACCTCGA	
		701	750
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(701)	GTGGTTCTGGCGAACACAACGCTCTTGAGAAGACGGCTGTGTCCCCGCAC	
USA: PMWaV-1 CP	(701)	GTGGTTCTGGCGAACACAACGCTCTTGAGAAGACGGCTGTGTCCCCGCAC	
Consensus	(701)	GTGGTTCTGGCGAACACAACGCTCTTGAGAAGACGGCTGTGTCCCCGCAC	
		751	774
Thailand: PMWaV-1 CP (express)	(751)	ATCTTTATGGGTGGACGCAAATAA	
USA: PMWaV-1 CP	(751)	ATCTTTATGGGTGGACGCAAATAA	
Consensus	(751)	ATCTTTATGGGTGGACGCAAATAA	

ภาพที่ 12 เปรียบเทียบการเรียงตัวของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน CP ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ระหว่าง Thailand isolated ที่สกัดได้จากสับปะรดพันธุ์ศรีราชา Chb1-KU จังหวัดชลบุรี ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEX-2T Expression vector และ US isolated (AF283103) ด้วยโปรแกรม VECTOR NTI (Invitrogen) ขนาด 774 นิวคลีโอไทด์ พบว่า ต่างกัน 8 ตำแหน่ง คิดเป็น 98 % identity

Scores Table						
SeqA Name	Len(aa)	SeqB Name	Len(aa)	Score		
=====						
1	Thailand_	255	2	US_	255	99
=====						
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment						
Thailand	ADSSKQKQPEHADSGPKTVDDQVKEIMNLPVPGGRTTVSTFEDLIAAENAIIDFTKVDVP				60	
US	ADSSKQKQPEHADSGPKTVEDQVKEIMNLPVPGGRTTVSTFEDLIAAENAIIDFTKVDVP				60	
*****:						
Thailand	RMINVPIPGIVTNAHKVIGSKALWELGSKGISAKHMIQLMQSFQDMCTFSTSPKVSA				120	
US	RMINVPIPGIVTNAHKVIGSKALWELGSKGISAKHMIQLMQSFQDMCTFSTSPKVSA				120	

Thailand	TQNYSTTAKYDGKDVNVTHEEIRIALSNSLSNLGYDNPMRQFGRGFTSTIVQGLSSGKLV				180	
US	TQNYSTTAKYDGKDVNVTHEEIRIALSNSLSNLGYDNPMRQFGRGFTSTIVQGLSSGKLV				180	

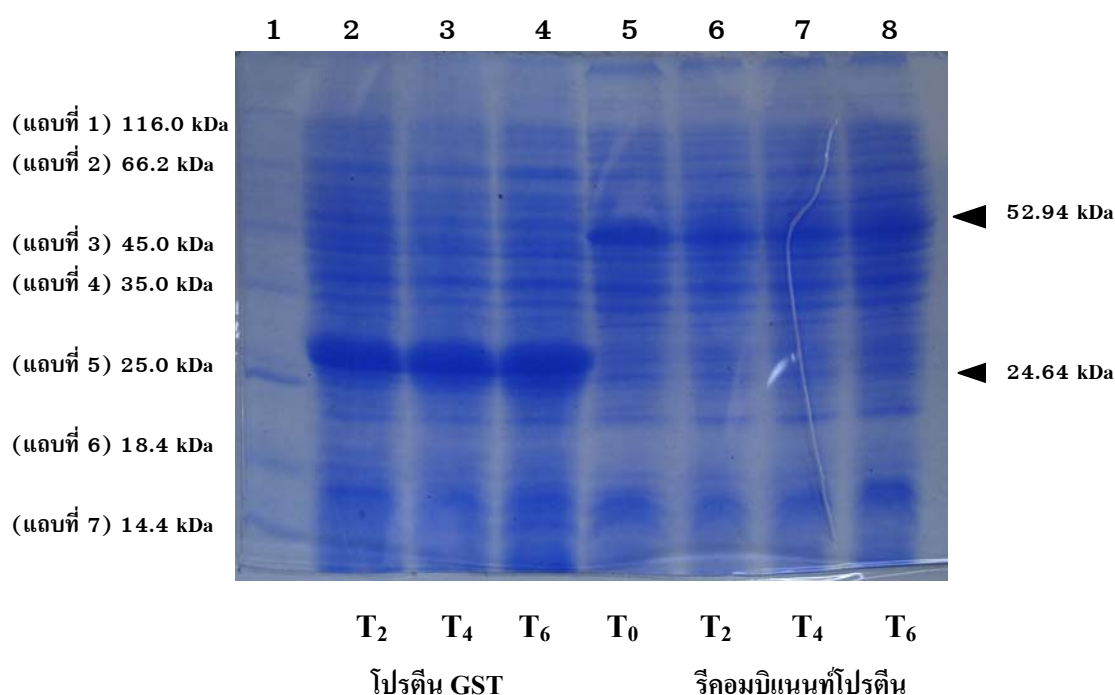
Thailand	VNTRICTKNGVPRNYYSFYPCDLHVEARVHGDDAALVSELARMVAINRANSSGSGEHNVF				240	
US	VNTRICTKNGVPRNYYSFYPCDLHVEARVHGDDAALVSELARMVAINRANSSGSGEHNVF				240	

Thailand	EKTAVSPHIFMGGRK				255	
US	EKTAVSPHIFMGGRK				255	

ภาพที่ 13 การเรียงตัวของกรดอะมิโนแอสิดใน CP gene ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ที่สกัดได้จาก Thailand isolated สับปะรดพันธุ์ศรีราชา Chb1-KU จังหวัดชลบุรี โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment ขนาด 255 เรซิดิวส์ พบว่า ต่างกัน 1 ตำแหน่ง คิดเป็น 99 % identity

7. การชักนำการสังเคราะห์ Recombinant Protein ในเซลล์แบคทีเรียเจ้าบ้าน *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α และการตรวจขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE

จากการวิเคราะห์ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์รีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัส PMWaV-1 โคลนที่ pW772/CP1 S-E1.5 โดยการแยกขนาดรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE สังเกตจากแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีน ที่ปรากฏขึ้นโดยการย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue R 250 แล้วเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน Protein Molecular Weight Marker # SM0431 (Lot 2011) (Fermentas Life science, ประเทศสหรัฐอเมริกา) พบว่า แถบที่ปรากฏของช่วงเวลาที่เหมาะสมในการชักนำการสังเคราะห์ รีคอมบิแนนท์โปรตีนระหว่างโปรตีน GST กับรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อไวรัส PMWaV-1 โคลนที่ pW772/CP1 S-E1.5 ที่สังเคราะห์ได้ในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α จากขนาดของยีน CP ซึ่งคาดว่าจะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 28.3 กิโลดาลตัน รวมกับโปรตีน GST ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 24.64 กิโลดาลตัน ทำให้ได้โปรตีนเชื่อมต่อ GST-CP ของ PMWaV-1 ขนาดโมเลกุลประมาณ 52.94 กิโลดาลตัน พบแถบรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สังเคราะห์ได้สีน้ำเงินเข้มที่มีขนาดสอดคล้องกับค่าที่คำนวณได้ พบว่า มีการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณน้อย ภายหลังการเติม IPTG เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง (T_2 T_4 และ T_6) (ภาพที่ 14) ตามลำดับ



ภาพที่ 14 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน CP gene ของไวรัส PMWaV-1 ในเวกเตอร์ pGEX-2T Expression vector รีคอมบิแนนท์โปรตีน pW772/CP1 S-E โคลนที่ 1.5 ที่ผลิตได้ในระบบแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α บน 15% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis

ช่องที่ 1 : ดีเอ็นเอมาตรฐานชนิด Protein Molecular Weight Marker
น้ำหนักโมเลกุลขนาด (14.4–116.0 kDa)

ช่องที่ 2 : โปรตีน GST induced 2 ชม. ขนาด 24.64 kDa

ช่องที่ 3 : โปรตีน GST induced 4 ชม. ขนาด 24.64 kDa

ช่องที่ 4 : โปรตีน GST induced 6 ชม. ขนาด 24.64 kDa

ช่องที่ 5 : รีคอมบิแนนท์โปรตีน non induced 0 ชม. ขนาด 52.94 kDa

ช่องที่ 6 : รีคอมบิแนนท์โปรตีน induced 2 ชม. ขนาด 52.94 kDa

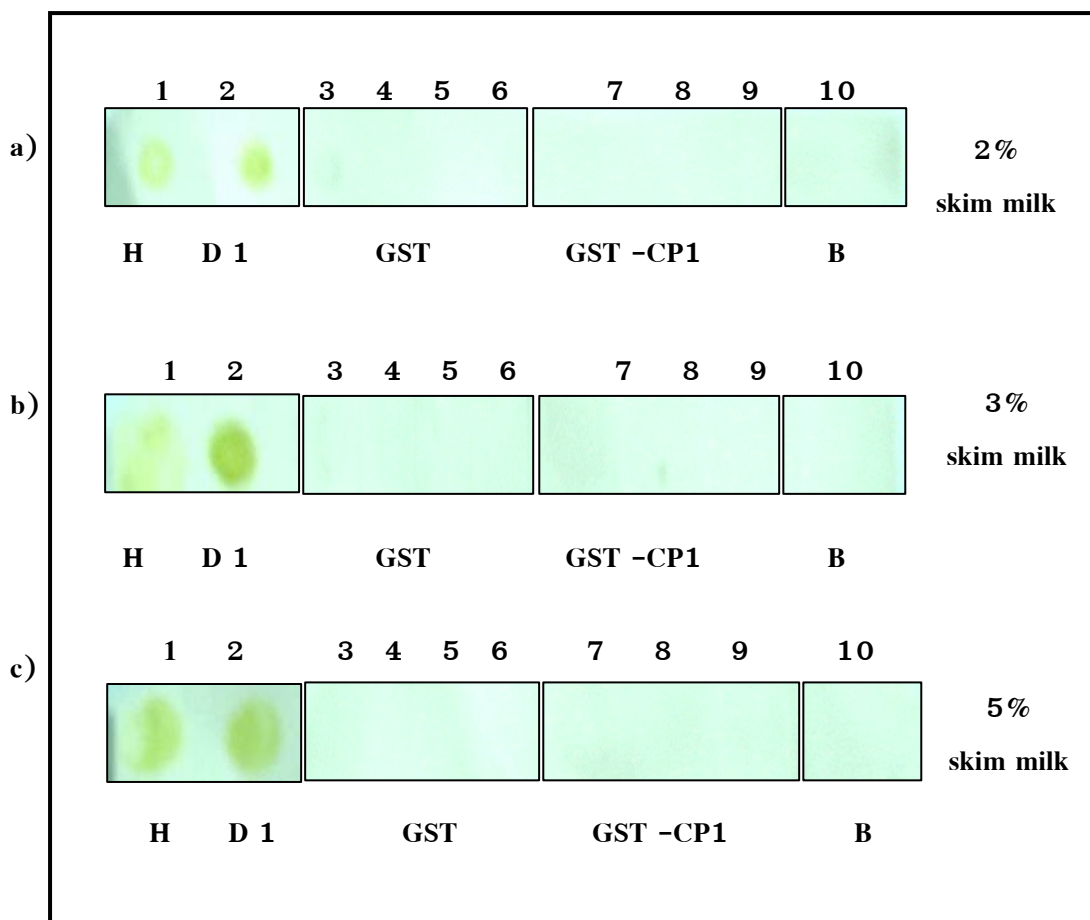
ช่องที่ 7 : รีคอมบิแนนท์โปรตีน induced 4 ชม. ขนาด 52.94 kDa

ช่องที่ 8 : รีคอมบิแนนท์โปรตีน induced 6 ชม. ขนาด 52.94 kDa

8. การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนด้วยเทคนิค Dot Blot Hybridization

จากการนำเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ที่ได้จากการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMWaV-1 และตัวอย่างใบสับประรดพันธุ์ปัตตาเวียซึ่งขยายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และน้ำคั้นจากพืชเป็นโรค มาผ่านขั้นตอนการเตรียมแล้วหยดลงบนกระดาษ nitrocellulose โดยใช้เทคนิค Dot Blot Hybridization และทดสอบกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี IgG PMWaV-1 ชนิด supernatant ที่ละลายใน TBST dilution 1/10 มิลลิลิตร (Agdia, ประเทศสหรัฐอเมริกา) ทดสอบต่อเมมเบรนที่บดด้วย skim milk อัตรา 2%, 3% และ 5% ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำคั้นพืชปกติ (H), positive control คือ Chb-KU1 (D1), negative control (N) คือ เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α จากโคลน GST induced (2 ชม.) ที่ dilution 1/1, 1/2, 1/10 และ 1/100 และโคลน GST-CP1 (pW772/CP1S-E1.5) induced (2 ชม.) ที่ dilution 1/1, 1/2 และ 1/10 และบัฟเฟอร์นิ่งฆ่าเชื้อ (B) ตามลำดับ เมื่อใส่ลงใน color substrate เป็นเวลา 30 นาที พบว่า พืชปกติ (H) และ Positive control คือ Chb-KU1 (D1) (มีสีเขียว) ไม่เกิดการติดสีม่วงน้ำเงิน แต่สำหรับเซลล์แบคทีเรียจากโคลน GST induced (2 ชม.) ที่ทำการ dilution ทั้ง 4 dilutions และเซลล์แบคทีเรียรีคอมบิแนนท์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMWaV-1 จากโคลน GST-CP1 (pW772/CP1) ทั้ง 3 dilutions และ negative control ทั้ง 4 dilutions ไม่มีสัญญาณโปรตีนใดๆ ที่เกิดขึ้นเลย (ภาพที่ 15)

การทดสอบรีคอมบิแนนท์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMWaV-1 คือ GST-CP1(pW772/CP1S-E1.5)induced (2 ชม.) จากการหยดสู่กระดาษ nitrocellulose ที่ dilution 1/1, 1/2 และ 1/10 และทดสอบกับโพลีโคลนอลแอนติบอดี anti-PiWV จากประเทศออสเตรเลีย ที่ละลายใน TBST dilution 1:10,000 ต่อเมมเบรนที่บดด้วย BSA อัตรา 1%, 2% และ 3% เมื่อเทียบกับน้ำคั้นพืชปกติ (H), Positive control คือ Chb-KU1 (D1), negative control (N) คือ GST induced (2 ชม.) T₂ ที่ dilution 1/1, 1/2, 1/10 และ 1/100 และบัฟเฟอร์นิ่งฆ่าเชื้อ (B) ภายหลังใส่ color substrate พบว่า พืชปกติ (H) และ Positive control คือ Chb-KU1 (D1) (มีสีเขียว) จะสามารถติดสีม่วงน้ำเงิน จากปฏิกิริยาของ NBT/BCIP ที่ใช้ เป็น substrate เกิดการติดสีม่วงน้ำเงินชัดเจน และเซลล์แบคทีเรียจากโคลน GST induced (2 ชม.) ที่ทำการ dilution ทั้ง 4 dilutions และเซลล์แบคทีเรียรีคอมบิแนนท์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส PMWaV-1 จากโคลน GST-CP1 (pW772/CP1S-E1.5) ทั้ง 3 dilutions และ negative control ทั้ง 4 dilutions ไม่เกิดสัญญาณโปรตีนใดๆ บนแผ่นเมมเบรน (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 15 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากโคลน GST induced (2 ชม.) และ GST-CP1 (pW772/CP1 S-E 1.5) induced (2 ชม.) ในอัตราเจือจางต่างๆ เปรียบเทียบกับน้ำคั้นจากพืชเป็นโรค โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีของ anti-PMWaV-1 ชนิด supernatant (Agdia, สหรัฐอเมริกา) ในอัตรา 1:10 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิค Dot blot analysis

ช่องที่ 1 : น้ำคั้นจาก สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย tissue culture

ช่องที่ 2 : น้ำคั้นจาก สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย Chb6-KU

ช่องที่ 3 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST ในอัตราเจือจาง 1:1

ช่องที่ 4 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST ในอัตราเจือจาง 1:2

ช่องที่ 5 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST ในอัตราเจือจาง 1:10

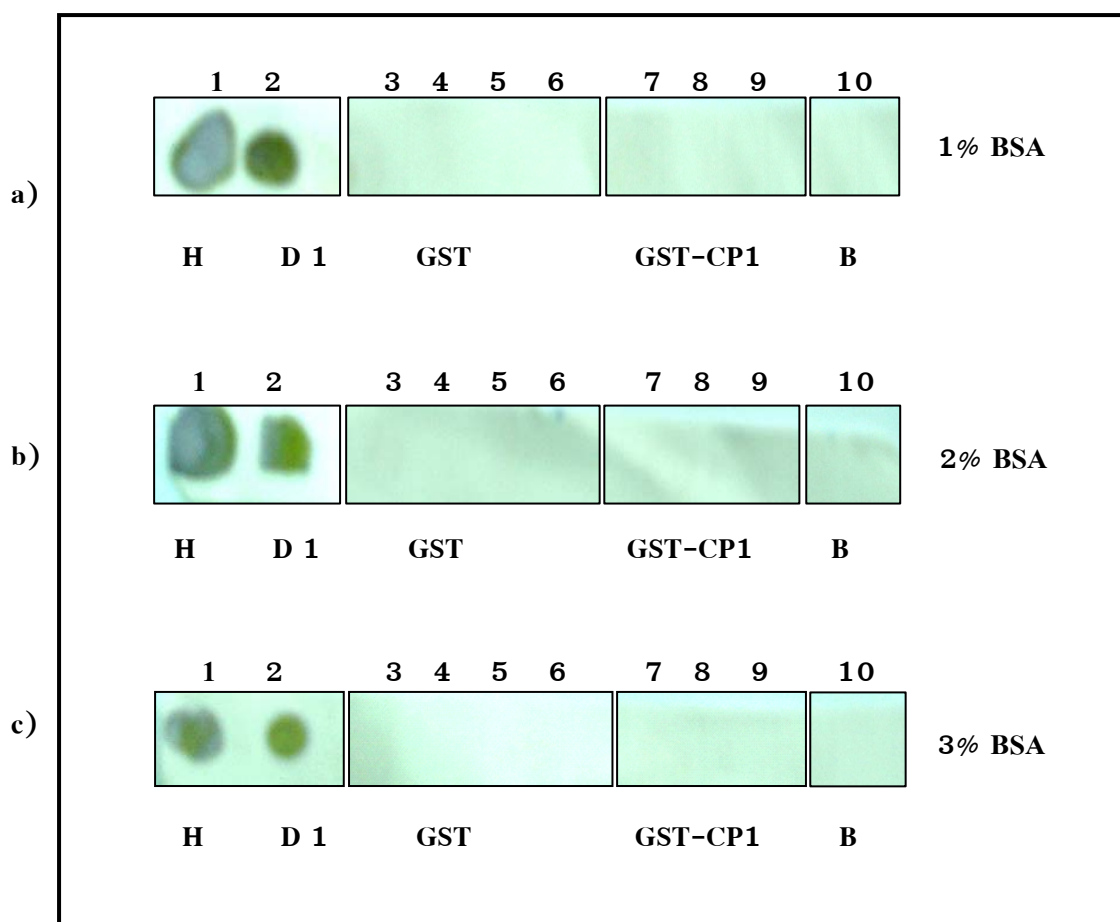
ช่องที่ 6 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST ในอัตราเจือจาง 1:100

ช่องที่ 7 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST-CP1 ในอัตราเจือจาง 1:1

ช่องที่ 8 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST-CP1 ในอัตราเจือจาง 1:2

ช่องที่ 9 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST-CP1 ในอัตราเจือจาง 1:10

ช่องที่ 10 : บัฟเฟอร์ล้างเชื้อ



ภาพที่ 16 การตรวจสอบรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากโคลน GST induced (2 ชม.) และ GST-CP1 (pW772/CP1 S-E 1.5) induced (2 ชม.) T_2 ในอัตราเจือจาง โปรตีน : บัฟเฟอร์หนึ่งฆ่าเชื้อต่างๆ เปรียบเทียบกับน้ำคั้นจากพืชเป็นโรค โดยใช้ โพลีโคลนอลแอนติบอดี anti-PMWaV-1 ในอัตรา 1:10,000 มิลลิเมตร) ด้วย เทคนิค Dot blot analysis

- ช่องที่ 1 : น้ำคั้นจาก สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย tissue culture
- ช่องที่ 2 : น้ำคั้นจาก สับปะรดพันธุ์ปัตตาเวีย Chb6-KU
- ช่องที่ 3 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST ในอัตราเจือจาง 1:1
- ช่องที่ 4 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST ในอัตราเจือจาง 1:2
- ช่องที่ 5 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST ในอัตราเจือจาง 1:10
- ช่องที่ 6 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST ในอัตราเจือจาง 1:100
- ช่องที่ 7 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST-CP1 ในอัตราเจือจาง 1:1
- ช่องที่ 8 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST-CP1 ในอัตราเจือจาง 1:2
- ช่องที่ 9 : น้ำคั้นจาก โปรตีน GST-CP1 ในอัตราเจือจาง 1:10
- ช่องที่ 10 : บัฟเฟอร์หนึ่งฆ่าเชื้อ

สรุป

การตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวคลอสเทอโรไวรัสของสับปะรดทำได้หลายวิธี และวิธีการที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการตรวจสอบที่ถูกต้องและแม่นยำ เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว คือ

1. การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรดโดยสังเกตลักษณะอาการที่ผิดปกติในพื้นที่ปลูกสำคัญในแหล่งปลูกต่างๆ ของประเทศไทย พบอาการที่คล้ายอาการของโรคไวรัสโรคเหี่ยวของสับปะรด 6 แบบ คือ สับปะรดแสดงอาการใบแก่มีอาการใบด่างเหลืองและเนื้อใบเปลี่ยนเป็นสีแดงซึ่งคล้ายอาการขาดธาตุฟอสฟอรัส (RD-Reddening) จากตัวอย่างที่นำมาตรวจ จำนวน 7 ตัวอย่าง คือ Chb1-KU, Chb2-KU, Chb3-KU, Chb6-KU, Pch01-DOA, Tr01-DOA และ CO-DOA อาการใบจุดแห้งตาย (NS-Necrosis) จำนวน 11 ตัวอย่าง คือ Chb1-KU, Chb2-KU, Chb3-KU, Chb6-KU, Chb01-DOA, Chb02-DOA, Chb03-DOA, Pch02-DOA, Pch03-DOA, Tr01-DOA และ CO-DOA อาการจุดประสีเหลืองอ่อน (Y-Yellowing) จำนวน 4 ตัวอย่าง คือ Chb1-KU, Chb2-KU, Chb3-KU และ Chb6-KU อาการใบด่างสีเหลืองอ่อนสลับสีเขียวอ่อน (MS-Mosaic) จำนวน 4 ตัวอย่าง คือ Na11-KU, Pbu01-DOA, Pbu02-DOA และ Pbu03-DOA และอาการใบจุดแห้งตายใบไหม้ลามใหญ่ (LNS-Local lesion-large necrosis spot) เพียงตัวอย่างเดียว คือ Phu01-DOA และอาการจุดสีม่วง (PS-Purple spot) จำนวน 2 ตัวอย่าง คือ Pch02-DOA และ Pch03-DOA

2. การเพิ่มปริมาณยีน HSP 70-cDNA ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้อาร์เอ็นเอต้นแบบจากไวรัสโรคเหี่ยวคลอสเทอโรไวรัสที่ก่อให้เกิดโรคกับสับปะรดในประเทศไทย เป็นวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ และมีความไวในการตรวจสอบสูง ประสิทธิภาพของการตรวจสอบขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของไพรเมอร์ที่เลือกใช้ และสภาพการทำปฏิกิริยา พบว่าในการตรวจสอบเชื้อ PMWaV-1 ด้วยไพรเมอร์คู่ Pv1hsp705'/Pc1hsp703' มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอยีน HSP70 ขนาด 590 คู่เบส ในสับปะรดพันธุ์ศรีราชาที่นำมาจากจังหวัดชลบุรี จำนวน 6 ตัวอย่าง (H1-KU, H2-KU, H3-KU, Chb2-KU, HO-DOA และ CO-DOA) พันธุ์ปัตตาเวียที่นำมาจากจังหวัดชลบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง (Chb01-DOA, Chb02-DOA, Chb03-DO) และพันธุ์ปัตตาเวียที่นำมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เพียงตัวอย่างเดียว (Pch03-DOA) ในขณะที่การตรวจสอบเชื้อ PMWaV-2 ด้วยไพรเมอร์คู่ Pv2hsp5'/Pc2hsp3' มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอยีน HSP70 ขนาด 610 คู่เบส ในสับปะรดพันธุ์ศรีราชาที่นำมาจากจังหวัดชลบุรี จำนวน 6 ตัวอย่าง (H2-KU, Chb1-KU, Chb2-KU, Chb3-KU, Chb6-KU และ HO-DOA) พันธุ์ปัตตาเวียที่นำมาจากจังหวัดชลบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง (Chb01-DOA, Chb02-DOA และ

Chb03-DOA) พันธุ์ปัดดาเวียที่นำมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์เพียงตัวอย่างเดียว (Pch03-DOA) พันธุ์ตราดสีทองที่นำมาจากจังหวัดตราดเพียงตัวอย่างเดียว (Tr01-DOA) พันธุ์ภูเก็ตที่นำมาจากจังหวัดภูเก็ตเพียงตัวอย่างเดียว (Phu01-Doa) ซึ่งดีเอ็นเอทั้งสองส่วนดังกล่าวเป็น HSP 70 gene ที่ยังไม่ครบสมบูรณ์ จากการเปรียบเทียบวิธี One step RT-PCR และวิธี Two step RT-PCR พบว่า ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน

2. ไพรเมอร์คู่ Pv1hsp705'/Pc1hsp703' ที่ใช้ในการโคลนยีนและการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีนที่สังเคราะห์ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน HSP 70 ของไวรัส PMWaV-1 โดยใช้อาร์เอ็นเอต้นแบบจากสับปะรดพันธุ์ศรีราชาจากจังหวัดชลบุรี รหัส HO-DOA และเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T Easy และไพรเมอร์คู่ Pv2hsp705'/Pc2hsp703' เพิ่มปริมาณยีน HSP 70 ของไวรัส PMWaV-2 โดยใช้อาร์เอ็นเอต้นแบบจากสับปะรดพันธุ์ศรีราชาที่นำมาจากจังหวัดชลบุรี รหัส Chb2-KU และเชื่อมต่อกับดีเอ็นเอที่ได้เข้ากับเวกเตอร์ pGEM-T Easy เพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่นเดียวกัน พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70 ที่สังเคราะห์ได้มีความเหมือนกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส PMWaV-1 (AF414119) และ PMWaV-2 (AF283103) ที่มีรายงานจากประเทศสหรัฐอเมริกา ร้อยละ 97 และ 98 ตามลำดับ

การผลิตยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวของสับปะรด ซึ่งโปรตีนที่ได้นี้จะนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตแอนติบอดีที่จำเพาะด้วยวิธี ELISA สำหรับการตรวจสอบไวรัสโรคเหี่ยวคลอสเทอโรไวรัสของสับปะรดในประเทศไทย การผลิตโปรตีนในระบบแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ได้พลาสมิดลูกผสมที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEX-2T 6xHis tag ที่มียีน CP ของไวรัส PMWaV- 1 เพื่อโคลนยีนและผลิตโปรตีนยีน CP ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ในระบบแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ได้ผลดังนี้

1. จากการโคลนยีนและการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน CP ของไวรัส PMWaV- 1 ที่โคลนเข้า pGEX-2T 6xHis tag ร่วมกับการตรวจด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน CP ของ PMWaV-1 Th สับปะรดพันธุ์ศรีราชาจากจังหวัดชลบุรี (HO-DOA) ของประเทศไทย พบว่า ดีเอ็นเอมีขนาด 772 คู่เบส รีคอมบิแนนท์โปรตีนที่สังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ pW772/CP1S-E1.5 มีการแปลรหัสเป็นโปรตีนยีน CP ของ Thailand isolated of PMWaV-1 ที่สกัดได้จากสับปะรดพันธุ์ศรีราชา Chb1-KU จังหวัดชลบุรี ที่อยู่ในเวกเตอร์ pGEX-2T Expression vector ได้ frame ที่แปลรหัสถูกต้อง ได้กรดอะมิโนจำนวน 257 เรซิดิวส์ สอดคล้องกับผลการตรวจขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis โดยที่การแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนนั้นมี

ตำแหน่งที่แตกต่างกันเพียง 1 ตำแหน่ง ในตำแหน่งที่แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนชนิด Asparagine (D) ของไวรัส PMWaV-1 Th ของประเทศไทย ในขณะที่ไวรัสโรคเหี่ยวคลอสเทอโรไวรัสของ สับปะรดชนิด PMWaV-1 ที่รายงานในประเทศสหรัฐอเมริกา (US isolated of PMWaV-1, accession number AF414119) เป็นกรดอะมิโนชนิด Glutamine (E) การแปลรหัสเป็นโปรตีน ได้ชนิดโปรตีนที่มีความเหมือนกันร้อยละ 99 (99% identity)

2. จากการกระตุ้นให้มีการผลิตโปรตีนยีน CP ของเชื้อไวรัส PMWaV-1 ในระบบ แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่ระยะเวลาต่างๆ ภายหลังการเติม IPTG เป็นเวลา 2 4 และ 6 ชั่วโมง (T_2 T_4 และ T_6) พบว่า รีคอมบิแนนท์โปรตีน pW772/CP1S-E 1.5 มีการผลิตโปรตีนยีน CP ใน เซลล์แบคทีเรียน้อย สาเหตุเนื่องจากโปรตีนที่ผลิตออกมาจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ และอาจ เกิดเนื่องจากชนิดแบคทีเรีย host ที่ได้รับการบรรจุรีคอมบิแนนท์โปรตีน เป็นชนิดที่ทำให้รีคอม บิแนนท์โปรตีน pW772/CP1S-E1.5 ผลิตโปรตีนออกมาได้น้อย จึงต้องดำเนินการเปลี่ยนสายพันธุ์ แบคทีเรียอาจเลือก M15 สำหรับบรรจุพลาสมิดลูกผสม pW772/CP1S-E1.5 ซึ่งคาดหวังว่าจะทำ ให้ได้โปรตีนที่ผลิตออกมาในเซลล์ในปริมาณมากกว่านี้ เพื่อนำไปสกัดให้ได้โปรตีนบริสุทธิ์ใน ภายหลังต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จารุพันธ์ ทองแถม. 2526. สับปะรดและอุตสาหกรรมสับปะรดในประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

จินดารัฐ วีระวุฒิ. 2541. สับปะรดและสรีรวิทยาของสับปะรด. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

ชำนาญ พัทธักษ์, อนุวัฒน์ จันทรสวรรณ และอรนุช กองกาญจนะ. 2542. การป้องกันและกำจัดมดในไร่สับปะรด. กลุ่มงานวิจัยแมลงศัตรูข้าวโพดและพืชไร่อื่น ๆ กองกีฏและสัตววิทยา. 3 น.

พัฒนา สีฟ้า. 2529. บทปฏิบัติการโรคพืชที่เกิดจากไวรัส. ภาควิชาโรคพืช. คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ. 2539. บทปฏิบัติการไวรัสพืชเบื้องต้น. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เรื่อนันท์ พูนพิพิธ. 2544. การโคลนยีนและความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเรพลิเคสของเชื้อไวรัสใบด่างวงแหวนมะละกอในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ .

ศิริพรรณ ตันตาคม. 2538. บทปฏิบัติการแมลงนำโรคมะลุพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, นครปฐม.

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

สุวรรณ กัดพันธุ์ รุจิพร ประทีปเสน และอุไรวรรณ ดิลกคุณานันท์. 2536. รายงานผลการวิจัย
เรื่อง การสำรวจโรคไวรัสในสับปะรดในประเทศไทย โครงการวิจัย รหัส มผ.5.36.

11 น.

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

_____. 1993. **The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host
relationships. Acta Horticulture 334: 383-386.**

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

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

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

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

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

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

Derrick, K.S. 1973. Quantitative assay for plant viruses using serologically specific electron microscopy. **Virology**. 56: 652-653.

Domrachev, M., F. Scott, H. Carol, L. Detlef, S. Vladimir, S. Richard and T. Sean .2002. Taxonomy browser (Closteroviridae). Available Source: <http://ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/htm>, March 19, 2003.

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

Glover, D.M. and B.D. Hames. 1995. DNA Cloning 1:Core Techniques. **Second edition. Oxford University Press, New York.**

Hsu, H.T., J. Aebig and W. F. Rochow. 1984. Differences among monoclonal antibodies to barley yellow dwarf viruses. *Phytopathology*. 74: 600-605.

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 Dis**. 81: 1150-1154.

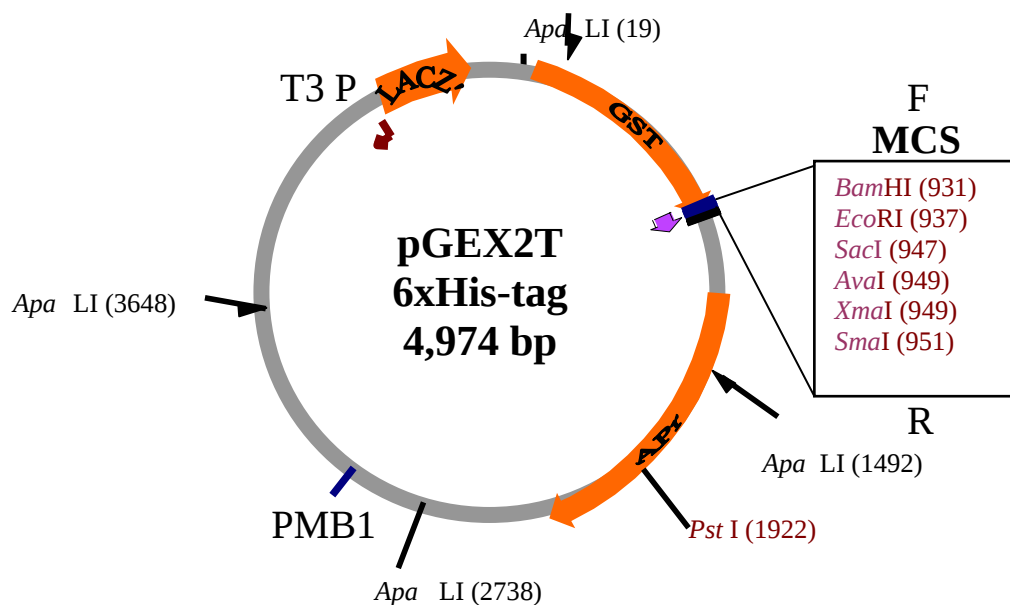
Hull, R. 2002. **Matthews' Plant Virology**. Fourth edition. Academic Press, Norwich.

Karasev, A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. **Annual Review of Phytopathology**. 38: 293-324.

_____, O.V. Nicolaeva, E.V. Koonin, D.J. Gumpf and S.M. Gernsey. 1994. Screening of the closterovirus genome by generate primer-mediated polymerase chain reaction. **J. Gen. Viro**. 75: 1415-1422.

- Maloy, O.C. and T.D. Murry. 2001. Encyclopedia of plant pathology. Volume 1. John Wiley & Sons, Inc. America.
- Melzer, M.J., A.V. Karasev, D.M. Sether and J.S. Hu. 2001. Nucleocapsid sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associate virus-2.. **J. Gen. Viro.** 82:1-7.
- Robertson, D., S. Shore and D.M. Miller. 1997. **Manipulation and expression of recombinant DNA: A Laboratory Manual.** Academic Press, Newyork.
- Sether, D.M., and J.S. Hu. 2002. Clostervirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. **Phytopathology** 92: 928-935.
- _____. 2002. Yield impact and spread of pineapple mealybug wilt associated virus-2 and Mealybug Wilt of pineapple in Hawaii. **Plant Dis.** 86: 867-874.
- Ullman, D. E., T.L. German, C. E. McIntosh and D. D. F. Williams. 1991. Effect of heat treatment on a closterviruslike particle associated with mealybug wilt of pineapple. **Plant Dis.** 75: 859-861.
- Wakman, W., D.S. Teakle, J.E. Thomas and R.G. Dietzgen. 1995. Presence of clostero-like virus and a bacilliform virus in pineapple plant in Australia. **Aust. J. Agrig. Res.** 46: 947-958.
- 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.

ภาคผนวก



ภาพผนวกที่ 1 แผนที่แสดงตำแหน่งตัดจำเพาะต่างๆ และยีนที่สำคัญบนพลาสมิด pGEX-

2T 6xHis- tag Expression vector

PMB1 คือ จุดตั้งต้นการจำลองตัว

amp^r คือ ยีนต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน

lacZ' คือ ยีนที่สร้างเปปไทด์อัลฟา

T3P คือ โพรโมเตอร์จากฟาจ T3

GST คือ Glutathione S-transferase

MCS ย่อมาจาก Multiple Cloning Site คือ ตำแหน่งโคลนที่หลากหลายใน
 ที่นี้แสดงตำแหน่งตัดจำเพาะต่างๆ

→ แสดงทิศทางการทำงานของยีน