สุรศักดิ์ ขันคำ 2550: การโคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* สาเหตุโรคยอดไหม้ของถั่วลิสงในประเทศไทย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสวรรณ เจียมสมบัติ, Dr.Agr. 88 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน non-structural (NSs gene) ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ซึ่งเป็นไวรัสในสกุล *Tospovirus* และเป็นสาเหตุโรคใบและยอดไหม้ของถั่วลิสง โคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ในสภาพหลอดทดลอง โดยเก็บตัวอย่างถั่วลิสงจาก อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา (PPT) และจาก อ. เมือง จ. อุดรธานี (PKK 2UD) นำมาตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค DAC-ELISA ออกแบบไพรเมอร์และสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีน NSs ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) จากอาร์เอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบถั่วลิสงที่ติดเชื้อ CaCV โคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ยีน NSs จากเชื้อ CaCV ที่ได้จากตัวอย่างถั่วลิสง PPT (NSs-PPT) และจากถั่วลิสง PKK 2UD (NSs-PKK 2UD) มีความยาว 1,320 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 439 เรซิดิวส์ และมีน้ำหนักโมเลกุล 49.6 กิโลดาลตัน ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs จากเชื้อ CaCV ทั้งสองไอโซเลต ที่พบในถั่วลิสง มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 94% identity และคล้ายคลึงกับโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV-AIT จากมะเขือเทศในประเทศไทย, เชื้อ CaCV-CP จากถั่วลิสงในประเทศจีน และเชื้อ *Gloxinia tospovirus* จากประเทศสหรัฐอเมริกาที่ระดับ 85-90% identities นอกจากนี้ สามารถโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิค (N gene) ของเชื้อ CaCV ในถั่วลิสง PPT ได้ครบสมบูรณ์ มีความยาว 828 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตัน และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน N ของเชื้อ CaCV-PKK 2UD, CaCV-Pkk และ CaCV-ToK ที่ระดับ 97% identities โคลนยีน NSs จากเพลี้ยไฟชนิด *Scirtothrips dorsalis* ที่พบในแปลงปลูกถั่วลิสง PPT และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน พบว่าโปรตีน NSs จากเพลี้ยไฟ (NSs-TPT) มีความคล้ายคลึงกันกับโปรตีน NSs-PPT ที่ระดับ 96% identity สังเคราะห์โปรตีน NSs-PPT ด้วยระบบ pQE expression system ในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้โปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs น้ำหนักโมเลกุล 50 kDa มีความเข้มข้น 2.98 มก./มล. ผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน NSs-PPT (PAb-NSs) แล้วนำไปใช้ตรวจสอบเชื้อ CaCV ด้วยเทคนิค DAC-ELISA พบว่า PAb-NSs ทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-PKK ในถั่วลิสง โดยไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชที่ติดเชื้อทอสโพไวรัสชนิด *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) หรือเชื้อ *Melon yellow spot virus* (MYSV) แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ที่ผลิตได้ในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อ CaCV แยกจากเชื้อทอสโพไวรัสชนิดอื่นได้อย่างชัดเจน

สุรศักดิ์ ขันคำ
ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

๒๑ / ม.ค. / ๒๕๕๐