รายงานผลการทดลองที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2558

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

โครงการวิจัย : อนุกรมวิธานชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรม : วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย : การพัฒนาเทคโนโลยีตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติโดยอณูชีววิทยา

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การตรวจสอบเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ที่เป็นสาเหตุโรคของพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Detection of Watermelon silver mottle virus (WSMoV) Cause Cucurbit Disease by Molecular biology Technique

2. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าโครงการวิจัย : ระบุชื่อหัวหน้าโครงการ หน่วยงานต้นสังกัด

หัวหน้าการทดลอง : กาญจนา วาระวิชะนี สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

: นางสาววันเพ็ญ ศรีชาติ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

สำรวจและเก็บตัวอย่างแตงโมที่แสดงอาการคล้ายกับทอสโพไวรัสเข้าทำลายจากพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 4 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม และกาฬสินธุ์ รวมจำนวนทั้งหมด 78 อย่าง เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตง ด้วยเทคนิค Double antibody-sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent (DAS-ELISA) พบว่า ตัวอย่างที่ตรวจสอบเป็น positive จำนวน 39 ตัวอย่าง แล้วนำไปสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain (RT-PCR) ด้วยคู่ไพร์เมอร์ WSMoV-N-F/WSMoV-N-R ที่มีความจำเฉพาะเจาะจงกับส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV พบว่า สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 700 เบส ได้ทั้ง 39 ตัวอย่าง จึงทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) และส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม พบว่า ตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV ทั้ง 39 ตัวอย่างมีอาการที่แสดงลักษณะยอดและเนื้อเยื่อใบเป็นแผลไหม้ตายจากปลายยอดเข้ามา ผลมีขนาดเล็ก รูปร่างผิดปกติ มีจุดแผลสะเก็ดเงิน จากการทดลองครั้งนี้พบว่า เทคนิค DAS-ELISA และ RT-PCR สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส WSMoV ในพืชตระกูลแตงได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง

รหัสการทดลอง **03-04-54-04-03-02-08-56**

Abstract

Survey and collection of 78 Watermelon samples showing symptom like infected by Tospovirus from watermelon plantations in 4 provinces including Khon Kaen, Sakon Nakhon, Maha Sarakham and Kalasin in the northeast, Thailand. Watermelon Silver mottle virus (WSMoV); a causal agent of cucurbit disease, samples diagnose by Double Antibody-sandwich Enzyme-linked Immunosorbent (DAS-ELISA) method and 39 samples are positive. Total genomic RNA was extracted from all 39 samples and the extracted material was used as templates in Reverse Transcription Polymerase Chain (RT-PCR) using WSMoV-N-F/WSMoV-N-R primers that specific to WSMoV's N gene. Amplicons of 700 bp obtained from all 39 samples. Some samples were cloned into pGEM-T-easy vector (Promega) and sent for DNA sequencing. Analysis of nucleotide sequences in the GenBank database using the BLASTn method displayed the highest sequence identity with N gene of Watermelon Silver mottle virus. All 39 samples share a distinct symptom as tip necrosis and die back. Fruit were small, distorted and exhibited silver mottling spot. From this experiment verifies both DAS-ELISA and RT-PCR methods can detect WSMoV in cucurbit plants in accuracy and efficiency.

6.คำนำ

ทอสโพไวรัส (*Tospovirus*) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก และมีพืชอาศัยที่กว้างมากกว่า 600 ชนิด ทั้งไม้ผล ไม้ประดับ และพืชผัก (Peters and Goldbach, 1995) ลักษณะอาการของโรคที่พบจะแตกต่างกันไปตามชนิดพืชอาศัย ชนิดของเชื้อไวรัส และสภาพแวดล้อม (German *et al*., 1992) สำหรับประเทศไทยพบทอสโพไวรัสพบครั้งแรกในมะเขือเทศจากจังหวัดเชียงใหม่ (พิสสรรณ, 2544) และต่อมาพบว่าทอสโพไวรัสเข้าลายพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ซึ่งพืชในตระกูลแตงเองก็พบกับปัญหาโรคจากไวรัสชนิดนี้เช่นกัน เชื้อสาเหตุโรคพืชทอสโพไวรัส (Tospovirus) จัดอยู่ใน Family *Bunyaviridae* Genus *Tospovirus* อนุภาคไวรัสมีลักษณะทรงกลม (sperical) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 80-110 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิกเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยว จำนวน 3 โมเลกุล คือ L-RNA ขนาด 8.9 กิโลเบส M-RNA ขนาด 5.9 กิโลเบส และ S-RNA ขนาด 2.9 กิโลเบส กรดนิวคลีอิกแต่ละโมเลกุลห่อหุ้มด้วยโปรตีน (nucleocapsid protein) และมีเยื่อหุ้ม (envelope) ที่ประกอบด้วยไขมันและไกลโคโปรตีน 2 ชนิด และมีเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอดโรค โดยมีความสัมพันธ์แบบคงทน (persistent) (Peters and Goldbach, 1995) ประเทศไทยรายงานว่าตรวจพบเชื้อไวรัส WSMoV ระบาดและทำความเสียหายกับแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เมลอน และแตงโมลูกผสมเพื่อการส่งออกในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม และกาฬสินธุ์ ลักษณะอาการที่พบยอดไหม้ ใบไหม้ดำฉ่ำน้ำจากขอบใบ แผลไหม้นูนที่ผิวผลและแห้งเป็นสะเก็ดแผลสีดำเงาทั่วไปทั้งผล ทำให้ผลมีขนาดเล็กลงทำให้เมล็ดพันธุ์ที่ได้ไม่มีคุณภาพเท่าที่ควร (วิมล, 2548) และทอสโพไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญในด้านการตรวจรับรองเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ Ie (1970) เคยมีรายงานไว้ว่า *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ด cineraria ได้สูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น เพื่อป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับผลผลิตแตงโมของเกษตรกรและผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก และเป็นการกำจัดแหล่งสะสมโรคออกจากแปลงปลูกรวมทั้งป้องกันการแพร่ระบาดโรคไปยังแปลงปลูกอื่นๆ เพราะโรคนี้มีเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะช่วยถ่ายทอดโรค จึงต้องเร่งพยายามพัฒนาวิธีการตรวจสอบด้วยเทคนิคอิมโมโนวิทยา ได้แก่ Double antibody-sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent (DAS-

ELISA) และเทคนิคทางอณูชีววิทยาได้แก่ เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain (RT-PCR) เข้ามาช่วยตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัส WSMoV ในพืชตระกูลแตง

7. วิธีดำเนินการ

-อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรคและตัวอย่างพืชปกติ

2. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- โกร่งบดตัวอย่าง
- หลอดพลาสติกขนาด 2, 1.5 และ 0.5 ไมโครลิตร
- ตู้แช่แข็ง -20^{0}C
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker)
- เครื่องชั่งละเอียด 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
- เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้ดูดควันและสารพิษ (Hood)
- เครื่อง Thermal cycler
- เครื่อง Gel electrophoresis
- เครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator

3. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- สารประกอบ CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1.4 M NaCl, 1.0% Na2SO3 หรือ 2% 2-mercaptoethanol และ 2.0% PVP-40)
- สารประกอบ GIC buffer (4M Guanindine thiocyanate, 0.2 M Sodium acetate pH 5.2, 25 mM EDTA pH 8.0 ,2.5% PVP-40 ,1% β-mercaptoethanol)
- GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific)
- เอ็นไซม์ SuperscripIIIRT/platinum Taqmix (Invitrogen)
- GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas)

-วิธีการ

1.สำรวจและเก็บตัวอย่างพืช

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างแตงโมทั้งส่วนใบและและผลที่สงสัยอาการว่าอาจเกิดจากเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคพืชในตระกูลแตงในพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงโมที่แสดงอาการคล้ายกับทอสโพไวรัสเข้าทำลาย ได้แก่ แสดงอาการใบไหม้ ผลแสดงเนื้อเยื่อแผลนูนไหม้ตาย และผลมีสะเก็ดนูนแห้งสีน้ำตาลเข้ม เป็นต้น ใส่ตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกและทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยการจดบันทึกระหว่างการสำรวจ ได้แก่ สถานที่ วันที่ ชื่อพืช ระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการและส่วนของพืชที่แสดงอาการ ความรุนแรงของโรค และถ่ายภาพลักษณะอาการโรค

2.การตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค DAS-ELISA

เตรียมตัวอย่างแตงโมทั้งส่วนใบและและลูกที่สำรวจและเก็บจากพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยมาตรวจสอบตัวอย่างด้วยเทคนิค DAS-ELISA โดยเขียนแผนผังข้อมูลรายละเอียดของตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ลงบน loading diagram **(ภาพที่ 1**) ดังนี้ A1-2 คือ general extract buffer, B1-2 คือ พืชปกติ (negative control), C1-2 คือ ตัวอย่างเชื้อไวรัส WSMoV (positive control) ของบริษัท Agdia และ D1-D11 คือ ตัวอย่างแตงโมที่ทำการตรวจสอบหาเชื้อไวรัส WSMoV โดยปฏิบัติตามขั้นตอนของบริษัท Agdia ดังนี้ เตรียม capture antibody ที่เจือจางด้วย 1X carbonate coating buffer ที่ความเข้มข้น 1 : 200 เติมลงใน ELISA Plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หรือที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ล้างด้วย 1X PBST แล้วเคาะ plate ให้แห้ง บดตัวอย่างใบและเปลือกแตงโมด้วย general extract buffer ในอัตราส่วน 1:10 แล้วเติมสารละลายตัวอย่างพืช negative control (buffer และ healthy) และ positive control (ตัวอย่างเชื้อไวรัส WSMoV , Agdia) เติมลงใน ELISA Plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 1X PBST แล้วเคาะ plate ให้แห้ง เตรียม enzyme conjugate เจือจางด้วย ECI buffer ที่ความเข้มข้น 1 : 200 (เตรียมก่อนใช้งาน 10 นาที) เติมลงใน ELISA plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 1X PBST แล้วเคาะ plate ให้แห้ง เตรียม PNP substrate โดยละลาย PNP tablet ด้วย PNP solution ที่ความเข้มข้น 1X (ในอัตราส่วน 1 เม็ดต่อ 5 มิลลิลิตร) เตรียมก่อนใช้งานประมาณ 15 นาที เติมลงใน ELISA plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30-60 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย 3M sodium hydroxide ปริมาตรหลุมละ 50 ไมโครลิตร และตรวจสอบผลของปฏิกิริยา

โดยอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร (O.D. 405 nm) ด้วยเครื่อง ELISA reader (Rosys Anthos 2010) เปรียบเทียบสีระหว่าง control ทั้ง 3 ชนิด คือ buffer, negative และ positive กับตัวอย่างพืชโดยตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจะให้สีเหลืองเข้ม เมื่อเทียบกับ positive control ของเชื้อไวรัส WSMoV (Agdia) และตัวอย่างพืชที่ปกติจะใส

3.สกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส WSMoV ที่เหมาะสม

หาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส WSMoV ที่เหมาะสมได้แก่ โดยเปรียบเทียบจากคุณภาพของอาร์เอ็นเอของพืชทดสอบ ที่สกัดได้จาก 3 วิธี ได้แก่ วิธี CTAB buffer (Chang *et. al*., 1993), วิธี GIC buffer โดยดัดแปลงวิธีของ MacKenzie *et. al*., 1997 และ วิธี GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) ซึ่งวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ็นเอทั้ง 3 วิธี มีขั้นตอนดังนี้

3.1 วิธี CTAB buffer

วิธี CTAB buffer (Chang et. al., 1993) โดยตัดตัวอย่างพืชให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม แล้วใส่ลงในโกร่งเติมไนโตรเจนเหลวแล้วบดให้ละเอียด หลังจากนั้นเติมสารละลาย CTAB extraction buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 20 mM EDTA, pH 8.0; 1.4 M NaCl, 1.0% Na_2SO_3 หรือ 2% β-2-mercaptoethanol และ 2.0% PVP-40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บดต่อให้เป็นเนื้อเดียวกันย้ายใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ไมโครทิวบ์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในไมโครทิวบ์หลอดใหม่ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanal (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate,pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนมาล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้ง และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ หรือ TE buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.2 วิธี GIC buffer

วิธี GIC buffer โดยดัดแปลงวิธีของ MacKenzie *et. al*., 1997 โดยตัดตัวอย่างพืชมาตัดให้ละเอียดเป็นชิ้นเล็กๆ นำมาชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม แล้วใส่ลงในโกร่งเติมไนโตรเจนเหลว แล้วบดให้ละเอียดหลังจากนั้นเติมสารละลาย GIC buffer (4M Guanindine thiocyanate, 0.2 M Sodium acetate pH 5.2, 25 mM EDTA pH 8.0 ,2.5% PVP-40 ,1% β-mercaptoethanol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และเติม 20 % SDS ผสมให้เข้ากัน ย้ายใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปั่นตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ไมโครทิวบ์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสชั้นบนใส่ในไมโครทิวบ์หลอดใหม่ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และเติม isopropanal (2 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เติม 3M sodium acetate,pH 5.2 (0.1 เท่าของปริมาตรส่วนใส) ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้งเก็บตะกอนมาล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตากตะกอนกรดนิวคลีอิกให้แห้งและละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่ผ่านการทำลายเอนไซม์ RNase ด้วย diethylpyrocarbonate (DEPC-water) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.3 วิธี GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific)

ชั่งตัวอย่างใบพืชที่ต้องการทดสอบให้ได้น้ำหนัก 0.1 กรัม แล้วใส่ลงในโกร่งบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว หลังจากนั้นเติมสารละลาย Plant RNA Lysis Solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วย้ายใส่หลอดไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเศษพืชที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วดูดของเหลวใสส่วนบนปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครทิวบ์ใหม่ แล้วเติม 96% ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการผสมเบา ๆให้เข้ากันด้วยปิเปต แล้วดูดสารละลายปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใส่ purification column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ให้ตะกอนอาร์เอ็นเอเกาะที่แผ่นเมมเบรนของ purification column และล้างด้วย Wash buffer 1 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และล้างด้วย Wash buffer 2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที

และตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย nuclease-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ทดสอบในขั้นตอนต่อไป

4.ค้นหาไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ nucleocapsid protein (N) gene ของเชื้อไวรัส WSMoV

ค้นหาข้อมูลไพร์เมอร์ที่เคยมีรายงานมาแล้ว และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไพร์เมอร์ที่เลือกมาเปรียบเทียบกับข้อมูลส่วน N gene เชื้อไวรัส WSMoV กับฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) เพื่อวิเคราะห์ความจำเพาะของไพร์เมอร์

5. การตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

ส่วนประกอบปฏิกิริยา One step RT-PCR (Invitrogen)

- น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH_2O)	4.5	ไมโครลิตร
- 2x buffer	12.5	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ forward (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- ไพรเมอร์ reverse (10 pmol)	1	ไมโครลิตร
- SuperscripIIIRT/platinum Taqmix (Invitogen,0.1 unit/µl)	1	ไมโครลิตร
- อาร์เอ็นเอต้นแบบ	5	ไมโครลิตร
รวม	**25.0**	**ไมโครลิตร**

นำส่วนประกอบของปฏิกิริยา RT-PCR ผสมกัน แล้วทำการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมายด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยการตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

<u>cDNA synthesis</u>

ขั้นที่ 1: 60°C นาน 30 นาที 1 รอบ

<u>Denaturation</u>

ขั้นที่ 2:	94°C	นาน 1 นาที	2 รอบ
PCR amplification			
ขั้นที่ 3: (denature)	94°C	นาน 15 วินาที	1 รอบ
ขั้นที่ 4: (anneal)	56-58°C	นาน 30 วินาที	(ขั้นที่ 3 - 5) 39 รอบ
ขั้นที่ 5: (extend)	68°C	นาน 1 นาที	1 รอบ
Final extension (optional)			
ขั้นที่ 6:	15°C	นาน 5 นาที	1 รอบ

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 8 ไมโครลิตร ผสมกับ 6x loading dye 2 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบขนาดกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที และนำแผ่น agarose gel มาตรวจขนาดยีนเป้าหมายด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator ทำการบันทึกภาพและสรุปผลการทดลอง

6. การโคลนยีนและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

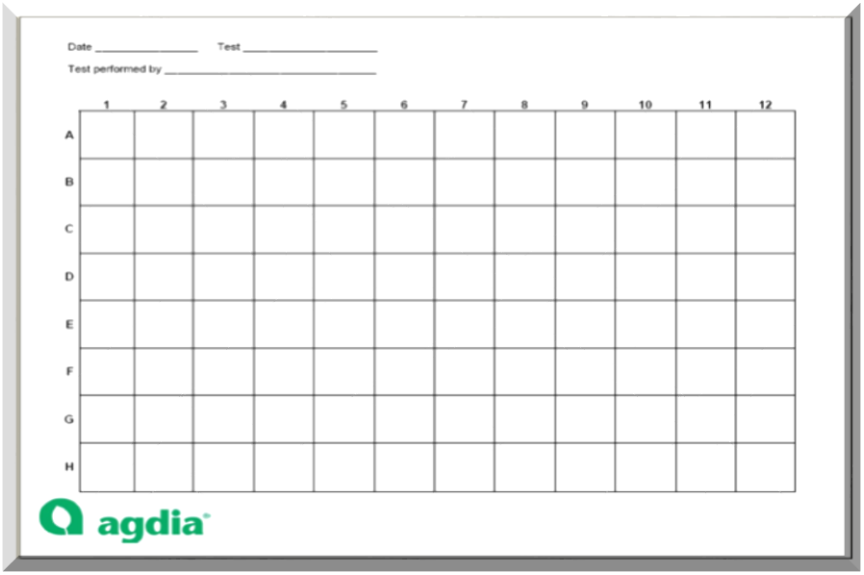
เตรียม DNA ให้บริสุทธิ์ ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) และทำการเชื่อมต่อ DNA ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) **(ภาพที่ 2)** ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และถ่ายพลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ DH 5 **α** ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook *et. al*., 1989) ทำการคัดเลือกโคโลนีสีขาวของแบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH 5 **α** ที่คาดว่ามีพลาสมิดลูกผสม และสกัดพลาสมิดลูกผสม ด้วยวิธี Alkaline lysis (Sambrook *et. al*., 1989) หลังจากได้โคลนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดตามที่ต้องการแล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) เพื่อยืนยันว่าไพร์เมอร์ที่เลือกใช้มีความเฉพาะเจาะจงต่อเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคพืชตระกูลแตงจริง

7. ทำการบันทึกข้อมูล สรุปผล และเขียนรายงานผลการวิจัย

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2555-กันยายน 2558

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรือนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร



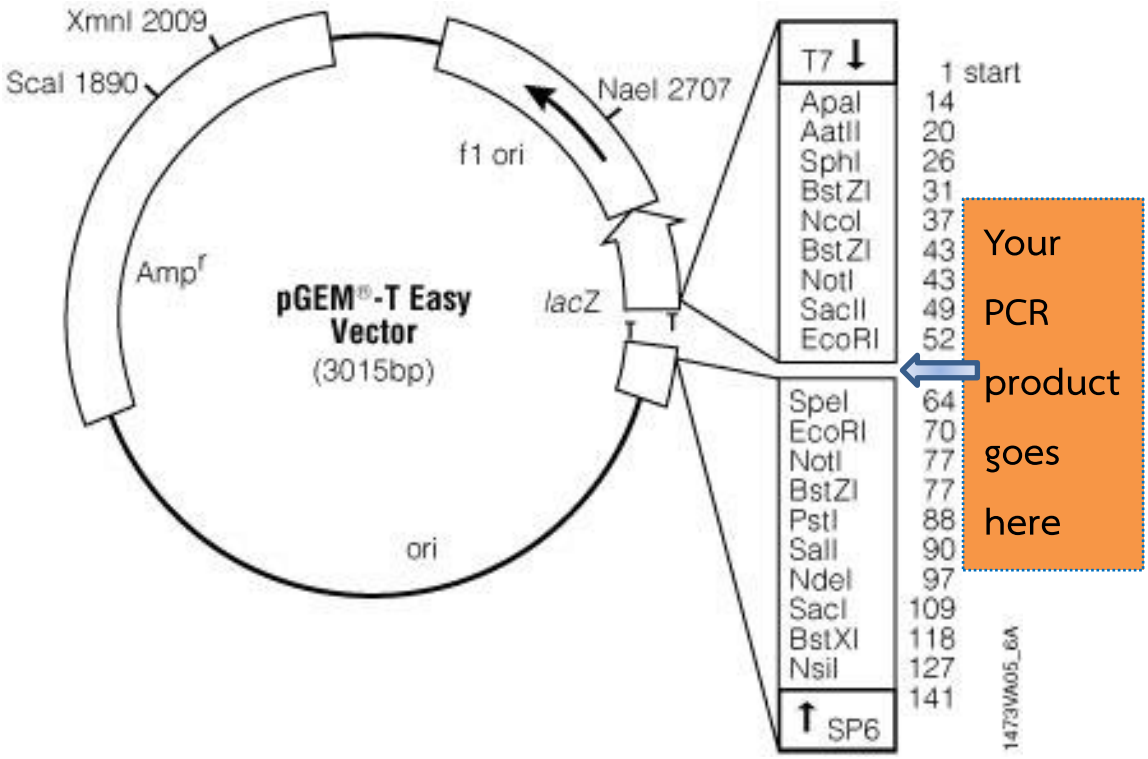
ภาพที่ 1 แสดง loading diagram สำหรับการเขียนแผนผังข้อมูลตัวอย่างการตรวจสอบเชื้อไวรัส WSMoV คือ

ช่อง A1-2 คือ General Extract Buffer

ช่อง B1-2 คือ พืชปกติ (negative control)

ช่อง C1-2 คือ ตัวอย่างเชื้อไวรัส WSMoV (positive control) ของบริษัท Agdia

ช่อง D1-D11 คือ ตัวอย่างแตงโมที่ต้องการตรวจสอบ



ภาพที่ 2 แสดงรายละเอียดพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector ขนาด 3,015 bp

(แหล่งที่มา http://www.ens-lyon.fr/RELIE/PCR/ressources/apects_techniques/tp_gfp/Fig3.htm)

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1.ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืช

สำรวจและเก็บตัวอย่างแตงโมจากแปลงปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 4 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม และกาฬสินธุ์ **(ภาพที่ 3-6)** ได้จำนวนทั้งหมด 78 อย่าง เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค DAS-ELISA และเทคนิค RT-PCR ภายในห้องปฏิบัติการ

ภาพที่ 3-6 แสดงตัวอย่างแปลงที่เข้าสำรวจและเก็บตัวอย่างแตงโมจากพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 4 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม และกาฬสินธุ์

2.ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค DAS-ELISA

ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV จากตัวอย่างใบและผลแตงโมที่สำรวจจากแปลงปลูกสำคัญของประเทศทั้งหมดจำนวน 78 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค DAS-ELISA พบว่า ตัวอย่างเชื้อไวรัส WSMoV (positive control) ของบริษัท Agdia แสดงผลเป็นสีเหลือง ให้ค่า O.D. 405 nm อยู่ในช่วง >3.229 ส่วนพืชปกติ (negative control) แสดงผลเป็นสีใส ให้ค่า O.D. 405 nm อยู่ในช่วง 0.103-0.104 การแปลผล คือ ตัวอย่างที่ตรวจสอบแล้วถ้ามีค่า O.D. 405 nm มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติ (negative control) คือ อยู่ในช่วง 0.206-0.208 ให้แปลผลการตรวจสอบเป็นบวก (+) หมายถึง ตัวอย่างนั้นตรวจพบเชื้อไวรัส WSMoV แต่ตัวอย่างที่ตรวจสอบแล้วมีค่า O.D. 405 น้อยกว่า 2 เท่า ของพืชปกติ (negative control) ให้แปลผลการตรวจสอบเป็นลบ (-) หมายถึง ตัวอย่างนั้นตรวจไม่พบเชื้อไวรัส WSMoV ดังนั้น ผลการตรวจตัวอย่างแตงโมทั้งหมด 78 ตัวอย่าง พบจำนวน 39 ตัวอย่าง แสดงผลการตรวจสอบเป็นบวก (+) ให้ค่า O.D. 405 nm อยู่ในช่วง 0.276-2.021 และอีก 39 ตัวอย่างแสดผลการตรวจสอบเป็นบวก (-) ให้ค่า O.D. 405 nm อยู่ในช่วง 0.093-0.197 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 2 เท่า ของพืชปกติ (negative control) (ตารางที่ 1) ดังนั้น นำเฉพาะตัวอย่างแตงโมที่แสดงผลการตรวจด้วยเทคนิค DAS-ELISA เป็นบวก (+) จำนวน 39 ตัวอย่างมาตรวจสอบหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อใช้ยืนยันความถูกต้องผลการตรวจสอบซ้ำอีกครั้ง

ตารางที่ 1 แสดงผลการอ่านค่า O.D. 405 nm ด้วยเครื่อง ELISA reader (Rosys Anthos 2010) ของตัวอย่างใบและผลแตงโมที่สำรวจในแหล่งปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 78 ตัวอย่าง

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.108	0.108	1.954	1.859	0.104	1.038	0.095	0.108	0.098	0.107	1.525	0.000
B	0.104	0.103	0.107	1.870	0.102	0.857	0.094	0.913	0.095	0.093	1.932	0.000
C	>3.299	>3.299	0.723	0.149	0.121	0.192	0.098	0.110	0.097	0.098	1.636	0.000
D	0.854	0.969	1.170	0.247	0.18	0.197	0.095	0.109	0.103	0.095	2.021	0.000
E	0.546	0.598	0.397	0.113	0.119	0.094	0.097	0.098	0.105	1.541	0.000	0.000
F	0.292	0.531	0.397	0.118	0.111	0.099	0.104	0.178	0.276	1.659	0.000	0.000
G	0.117	0.209	1.416	0.113	0.184	0.101	0.099	0.106	0.177	0.102	0.000	0.000
H	0.476	0.272	0.869	0.147	0.181	0.106	0.105	0.104	0.102	0.108	0.000	0.000

หมายเหตุ

ช่อง A1-2 คือ General Extract Buffer

ช่อง B1-2 คือ พืชปกติ (negative control)

ช่อง C1-2 คือ ตัวอย่างเชื้อไวรัส WSMoV (positive control) ของบริษัท Agdia

ช่อง D1-D11 คือ ตัวอย่างแตงโมที่ต้องการตรวจสอบรวม 78 ตัวอย่าง

3.ผลการหาวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส WSMoV ที่เหมาะสม

เปรียบเทียบวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส WSMoV โดยพิจารณาจากคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Spectrophotometer วัดความยาวคลื่นแสงที่ 260/280 นาโนเมตร เพื่อหาค่าความบริสุทธิ์และความเข้มเข้มข้นของอาร์เอ็นเอพบว่า วิธี CTAB buffer มีค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเฉลี่ย ประมาณ 50.35 ng/ul ส่วนวิธี GIC buffer มีค่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเฉลี่ย ประมาณ 39.09 ng/ul พบว่าวิธีนี้ให้ความบริสุทธิ์และความเข้มเข้มข้นของอาร์เอ็นเอต่ำสุด และ GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific) มีค่าความเข้มข้นเฉลี่ย ประมาณ 100.25 ng/ul ทั้งนี้ให้ค่าความบริสุทธิ์และความเข้มเข้มข้นของอาร์เอ็นเอสูงสุดจึงเลือกการสกัดด้วยวิธีนี้มาใช้สำหรับการทดลองครั้งนี้ อีกทั้งขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอสะดวกรวดเร็วใช้เวลาในประมาณ 30 นาทีเท่านั้น ส่วนการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB buffer และ GIC buffer ขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอค่อนข้างยุ่งยากและใช้เวลาปฏิบัติงานถึง 2 วัน

4.ค้นหาไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ nucleocapsid protein (N) gene ของเชื้อไวรัส WSMoV

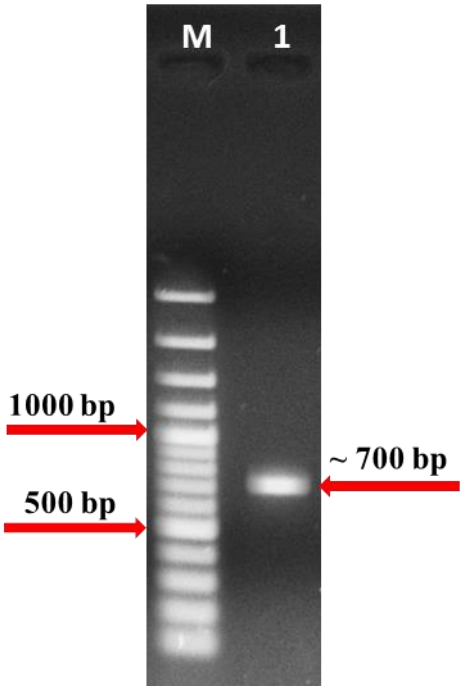
ทำการเลือกไพร์เมอร์ส่วน N gene เชื้อไวรัส WSMoV จากรายงานของ Chu, F.-H. *et al.* (2001) และนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) ด้วยโปรแกรม blast 2 พบว่า ไพร์เมอร์ 1 คู่ **(ตารางที่ 2)** มีความเฉพาะเจาะจงกับส่วน N gene เชื้อไวรัส WSMoV

ตารางที่ 2 แสดงชื่อและลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพร์เมอร์ สำหรับใช้สังเคราะห์ N gene เชื้อไวรัส WSMoV (Chu, F.-H. *et al*.,2001)

Primer Name	Primer Sequences 5' ➡ 3'	bp	Tm °C	Product Size (bp)
WSMoV-N-F	ACA GAA AGG TTA GCA CTG AA	20	56-58	~ 700
WSMoV-N-R	ACA GAG GAC TCC ACT CCC GG	20		

6.ผลการตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR

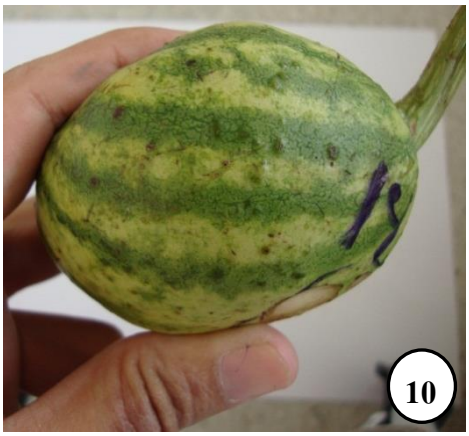
นำตัวอย่างแตงโมที่ตรวจด้วยเทคนิค DAS-ELISA แล้วให้ผลเป็นบวก (+) จำนวน 39 ตัวอย่าง มาตรวจพิสูจน์ยืนยันผลการตรวจสอบหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ คู่ไพร์เมอร์ WSMoV-N-F/ WSMoV-N-R (Chu, F.-H. et al.,2001) ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV **(ตารางที่ 2)** เมื่อนำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis และเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas) พบว่าแตงโมทั้ง 39 ตัวอย่างสามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 700 เบส ที่คาดว่าเป็นส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV **(ภาพที่ 7)** ได้จากตัวอย่างแตงโมที่แสดงลักษณะอาการ ดังนี้ พืชแสดงลักษณะอาการยอดและเนื้อเยื่อใบเป็นแผลไหม้ดำฉ่ำน้ำจากขอบใบ **(ภาพที่ 8)** กิ่งก้านพืชเป็นแผลไหม้ดำฉ่ำน้ำ **(ภาพที่ 9)** ผิวผลระยะเริ่มแรกแสดงอาการเนื้อเยื่อฉ่ำน้ำเป็นจุดนูนใส **(ภาพที่ 11)** ต่อมาจะเริ่มเป็นแผลไหม้ดำฉ่ำน้ำ ลึกเข้าเนื้อผล **(ภาพที่12)** และเป็นแผลไหม้ดำฉ่ำน้ำลึกเข้าเนื้อผลจนขยายติดกันเป็นแผลขนาดใหญ่ชัดเจน **(ภาพที่ 13)** ระยะสุดท้ายจะแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม **(ภาพที่ 14)** ซึ่งส่งผลกระทบทั้งปริมาณและคุณภาพของผลผลิตและเมล็ดพันธุ์ซึ่งบางครั้งไม่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เลย

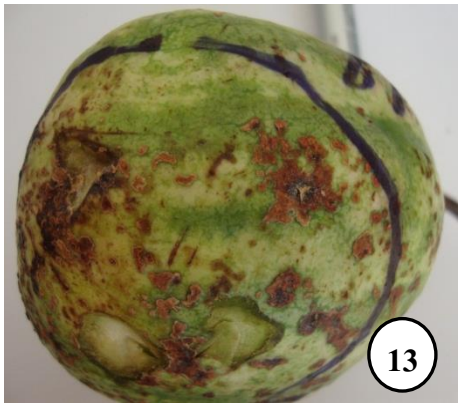


ภาพที่ 7 แสดงผลการตรวจวินิจฉัย ส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคของพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิค RT-PCR

M = marker 100 bps DNA Ladder (fermentas)

ช่อง 1 = แสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 700 bp จากคู่ไพร์เมอร์ WSMoV-N-F / WSMoV-N-R





ภาพที่ 8 แสดงลักษณะอาการเนื้อเยื่อยอดและใบเป็นแผลไหม้ดำฉ่ำน้ำจากขอบใบสาเหตุจากเชื้อไวรัส WSMoV

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะอาการที่กิ่งก้านใบของแตงโมเป็นแผลไหม้ดำฉ่ำน้ำสาเหตุจากเชื้อไวรัส WSMoV

ภาพที่ 10 แสดงลักษณะอาการเริ่มแรกที่เนื้อเยื่อผิวผลเป็นจุดนูนใสฉ่ำน้ำสาเหตุจากเชื้อไวรัส WSMoV

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะอาการเนื้อเยื่อผิวผลฉ่ำนูนเริ่มเป็นแผลไหม้ดำลึกเข้าเนื้อผลสาเหตุจากเชื้อไวรัส WSMoV

ภาพที่ 12 แสดงลักษณะอาการเนื้อเยื่อผิวผลฉ่ำนูนเริ่มเป็นแผลไหม้ดำลึกเข้าเนื้อผลขยายติดกันเป็นแผลขนาดใหญ่ ชัดเจนสาเหตุจากเชื้อไวรัส WSMoV

ภาพที่ 13 แสดงลักษณะอาการระยะสุดท้ายเนื้อเยื่อผิวผลฉ่ำนูนเริ่มเป็นแผลไหม้ดำลึกเข้าเนื้อผลจะเริ่มแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้มสาเหตุจากเชื้อไวรัส WSMoV

7. การโคลนยีนและส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

โคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 700 เบส เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ที่ประเทศมาเลเซีย แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์ทั้ง 39 ตัวอย่าง ถูกทำลายจากเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคของพืชตระกูลแตง ดังนั้น คู่ไพร์เมอร์ WSMoV-N-F / WSMoV-N-R จากรายงานของ Chu, F.-H. *et al*. (2001) สามารถสังเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV ได้

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เก็บตัวอย่างแตงโมจากแปลงปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 4 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม และกาฬสินธุ์ รวมจำนวนทั้งหมด 78 ตัวอย่าง เพื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ด้วยเทคนิค Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA) เมื่ออ่านค่า O.D. 405 ด้วยเครื่อง ELISA reader (Rosys Anthos 2010) พบจำนวน 39 ตัวอย่างให้ค่า O.D. 405 nm อยู่ในช่วง 0.276-2.021 แปลผลการตรวจสอบเป็นบวก (+) หมายถึง ตรวจพบเชื้อไวรัส WSMoV (ค่า O.D. 405 nm มากกว่า 2 เท่า ของพืชปกติ) จึงนำทั้ง 39 ตัวอย่างมาสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อยืนยันผลการตรวจสอบว่าเป็นเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยคู่ไพร์เมอร์ WSMoV-N-F/ WSMoV-N-R (Chu, F.-H. *et al.*, 2001) ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV **(ตารางที่ 2)** เมื่อตรวจผลผลิต PCR ด้วยเทคนิค gel electrophoresis และเปรียบเทียบกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Fermentas) พบว่า สามารถตรวจพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาดประมาณ 700 เบส จากแตงโมทั้ง 39 ตัวอย่างที่แสดงลักษณะอาการยอดและเนื้อเยื่อใบเป็นแผลไหม้ดำฉ่ำน้ำจากขอบใบ ส่วนกิ่งก้านพืชเป็นแผลไหม้ดำฉ่ำน้ำ ผลระยะเริ่มแรกแสดงอาการเนื้อเยื่อผิวฉ่ำน้ำเป็นจุดนูนใสต่อมาจะเริ่มเป็นแผลไหม้ดำฉ่ำน้ำลึกเข้าเนื้อผลและขยายติดกันเป็นแผลขนาดใหญ่ชัดเจน และระยะสุดท้ายเนื้อเยื่อแผลที่นูนไหม้ดำลึกจะแห้งเป็นสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม หลังจากทำการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ขนาดประมาณ 700 เบส เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) แล้วส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer (the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานใน GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ BLAST) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์ทั้ง 39 ตัวอย่าง คือ ส่วน N gene ของเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคของพืชตระกูลแตง สรุปผลการทดลองสามารถตรวจสอบหาเชื้อไวรัส WSMoV ในพืชตระกูลแตงได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความแม่นยำสูงด้วยเทคนิค DAS-ELISA และ RT-PCR

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

<u>ประโยชน์ คือ</u>

- ได้เทคนิค DAS-ELISA และ RT-PCR ที่สามารถตรวจสอบหาเชื้อไวรัส WSMoV ในพืชตระกูลแตงได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพสูง

<u>กลุ่มเป้าหมาย คือ</u>

- นักวิชาการที่เกี่ยวข้องสามารถตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัส WSMoV ในพืชตระกูลแตงได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วยเทคนิค DAS-ELISA และ RT-PCR ช่วยให้เกษตรกรผู้ปลูกพืชตระกูลแตงรวมทั้งบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์มีเมล็ดพันธุ์ที่สะอาดสำหรับปลูกเป็นการลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิตและลดแหล่งสะสมโรคในแปลงปลูกพืช

11.เอกสารอ้างอิง

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2544. โรคของมะเขือเทศที่เกิดจาก *tomato spotted wilt virus*. รายงานประจำปี 2544. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

วิมล สีเทา. 2548. การตรวจวินิจฉัยและจำแนกทอสโพไวรัสของพริก มะเขือ แตงโม และถั่วลิสง ที่พบในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993 A simple and efficient method for isolating RNA from pine. Plant Mol. Biol. Rep. 11: 113-116.

Chu, F.-H., Chao, C.-H., Chung, M.-H., Chen, C.-C., and Yeh, S.-D. 2001. Completion of the genome Sequence of *Watermelon silver mottle virus* and Utilization of Degenerate primer for Detecting Tospoviruses in Five Serogroups

German, TL., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. Tospoviruses : diagnisis, molecular biology, phytogeny, and vector relationships Annu.Rev.Phytopathol.30 : 315-348.

Ie, T.S. 1970. *Tomato Spotted wilt Virus*. C.M.I./A.A.B. Plant Virus Deseription No. 39. 4 p.

MacKenzie, D.J., M.A. Mclean, S. Mukerji and M. Green. 1997. Improved RNA extraxtion from woody plant for the detection of virol pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. Plant Dis. 81 : 222-226.

Peter, D. and R. Goldbach. 1995. The biology of tospoviruses, pp. 199-210. In R. P. Singh and K. Kohmoto (eds.) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases Volume III : Viruses&Viroide. Elsevier Science Ltd., Kidlington, Oxford.

Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Manistis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2d ed., Cold Spring Habor Laboratory Press, New York. 545 p.