การตรวจสอบไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus*-1 และ -2 สาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดโดยเทคนิค multiplex PCR

Detection of *Pineapple mealybug wilt-associated virus* -1 and -2 using multiplex PCR technique

วันเพ็ญ ศรีทองชัย ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ กาญจนา วาระวิชะนี

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดทั้ง 2 strain (PMWaV-1 และ PMWaV-2) ในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยอาศัยเทคนิค Multiplex RT-PCR เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์บริเวณ heat shock protein gene ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_HS_M_F : 5’ CCACTCTGTGTTTC TCTCCAGG 3’ และ PM1_HS_M_R : 5’CTCCCAGATA GTTATCTCCCATCG 3’ และ ไพรเมอร์บริเวณ heat shock gene ที่มีความ จำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_HS_M_F: 5’ CAAGGACG GGTCGGTAATGCTAG 3’ และPM2_HS_M_R : 5’ CCAACGCTAAA CAGTA CGCATACC 3’ จากนั้นการสกัด อาร์เอ็นเอ ของเชื้อ PMWaV-1 และ PMWaV-2 จากใบสับปะรดเป็นโรค โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure™RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE) แล้วนำมาทดสอบและปรับระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิให้เหมาะสมในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ cDNA โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR พบว่า อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมได้แก่ เริ่มจาก 50 °C นาน 30 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก 95 °C นาน 30 นาที, (94 °C นาน 45 วินาที , 60 °C นาน 45 วินาที , 72 °C นาน 60 วินาที) รวม 35 รอบตามด้วย 72 °C นานอีก 10 นาที 25 °C นานอีก 15 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 2% agarose ที่ 100 V. นาน 35-40 นาที พบว่าไวรัส PMWaV1 ให้แถบสีขาวขนาด 635 bp ส่วนไวรัส PMWaV2 ให้แถบสีขาวขนาด 380 bp

---

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-04-54

คำนำ

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ13,000-15,000 ล้านบาท โดยประเทศไทยครองความเป็นผู้นำในการผลิตและส่งออกสับปะรดเป็นอันดับหนึ่งของโลก เป็นเวลานานกว่า 10 ปีจนถึงปัจจุบัน โดยมีตลาดผู้นำเข้าที่สำคัญ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรป ญี่ปุ่น และสาธารณรัฐประชาชนจีน

โรคเหี่ยวสับปะรด (Pineapple wilt disease หรือ Mealybug wilt of pineapple) พบระบาดเป็นครั้งแรกในรัฐฮาวาย ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อต้นปี พ.ศ. 2443 และปัจจุบันโรคนี้แพร่ระบาดทั่วไปในประเทศที่มีการปลูกสับปะรดเป็นการค้า เช่น ออสเตรเลีย ไทยและคิวบา เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่าพบการระบาดของโรคเหี่ยวในแหล่งปลูกสับปะรดของจังหวัดชลบุรี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2532 และทำความเสียหายให้แก่ผลผลิตอย่างสูง ต่อมาในปี พ.ศ. 2546 โรคนี้ระบาดรุนแรงในแปลงปลูกสับปะรดของภาคตะวันตกบริเวณจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และเพชรบุรี ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสำคัญของประเทศ โดยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดเป็นอันดับ1 และ 3 ของประเทศ คือ 492,058 และ 56,192 ไร่ ตามลำดับ จากพื้นที่ปลูกทั้งประเทศ 962,693 ไร่ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2546; กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547) นอกจากนี้เริ่มพบการเข้าทำลายของโรคนี้ในเขตจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด ซึ่งเป็นแหล่งปลูกสับปะรดที่สำคัญเพื่อส่งโรงงานแปรรูปของภาคตะวันออก พันธุ์ที่พบว่ามีการระบาดของโรคเหี่ยว คือพันธุ์ปัตตาเวีย หรือรู้จักแพร่หลายในนามสับปะรดศรีราชา เป็นพันธุ์ที่ปลูกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 70 ของผลผลิตรวมของสับปะรด (วันเพ็ญ และคณะ, 2546)

โรคนี้เกิดจากไวรัส *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaVs ได้แก่ PMWaV-1 และ PMWaV-2) ซึ่งมีอนุภาคแบบท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดประมาณ 1,200 X 12 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิคเป็นแบบอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA, ssRNA) และมีน้ำหนักโมเลกุล 8.35 x 10^6 ดาลตัน (dalton) จัดอยู่ในสกุล คลอสเตอโรไวรัส (*Closterovirus*) วงศ์คลอสเตอโรวิริดี (*Closteroviridae*) กระจายอยู่หนาแน่นเฉพาะภายในเซลล์ท่ออาหารของพืช (Beardsley, 1993)

ลักษณะอาการของโรค ใบเริ่มแสดงอาการอ่อนนิ่ม มีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลือง ปลายใบแห้งตายเป็นสีน้ำตาลหรือสีแดงลามเข้าสู่โคนใบ (die back) ใบลู่ลงและแผ่แบนไม่ตั้งขึ้นเหมือนใบปกติ ต่อมาต้นเหี่ยวและแห้งตายในที่สุด รากมีขนาดสั้นและแตกแขนงน้อยมาก ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ง่าย ซึ่งตรงข้ามกับต้นปกติที่มีรากจำนวนมากยึดเกาะดินแน่น ทำให้ถอนต้นขึ้นมาได้ยาก ผลมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ (Dilokkunanant *et al.*, 1996) ในธรรมชาติพืชอาศัยที่สำคัญและอ่อนแอต่อไวรัส คือ สับปะรด และโรคนี้สามารถถ่ายทอดโดยมีเพลี้ยแป้ง [pink pineapple mealybug, *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) และ gray pineapple mealybug, *D. neobrevipes* (Beardsley)] เป็นพาหะ (German *et al*, 1992)

วิธีการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุในสับปะรดโดยใช้แมลงพาหะ อาการเหี่ยวบนพืชทดสอบเริ่มปรากฏหลังการถ่ายทอดโรคแล้วอย่างน้อย 4 เดือน หรือใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค RT-PCR ซึ่งให้ผลที่แม่นยำ และรวดเร็ว แต่ต้องตรวจสอบครั้งละ 1 strain ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการตรวจสอบหน่อพันธุ์สับปะรดเป็นจำนวนมาก

ในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพได้มีการพัฒนาตลอดเวลา ทำให้สามารถตรวจสอบเชื้อไวรัส 2 ชนิดในการทำปฏิกิริยาหลอดเดียวกัน เรียกว่า multiplex PCR ซึ่งเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบไวรัส เช่น Menzel และคณะ (2002) ได้ใช้ multiple PCR 2 ชุดที่มีความจำเพาะกับ mRNA ในพืช ซึ่งสามารถตรวจสอบไวรัส 4 ชนิดที่เข้าทำลายองุ่นได้ เช่น *Apple chlorotic leaf spot virus, Apple stem grooving virus, Apple mosaic virus* และ *Apple stem pitting virus* เป็นวิธีที่รวดเร็ว แม่นยำ และอาจนำไปใช้ตรวจสอบไวรัสขององุ่นแทนการใช้พืชทดสอบหรือ ELISA หรือ Lorenzen และคณะ (2003) รายงานว่าสามารถพัฒนาการตรวจสอบไวรัสของมันฝรั่ง (*Potato virus Y*, PVY) หลาย strins ของ PVY^N, PVY^O จากการทำปฏิกิริยาในการเพิ่มปริมาณ cDNA ในหลอดเดียวกัน โดยอาศัยเทคนิค multiple PCR และทำให้ตรวจจำแนกเชื้อ PVY ได้ถึง 119 ไอโซเลท รวมทั้งสามารถตรวจเชื้อ PVY หลาย strain ที่เข้าทำลายพืชต้นเดียวกัน นอกจากนี้ Olufemi และคณะ (2008) รายงานว่า ได้นำเทคนิค multiplex PCR มาพัฒนาการตรวจสอบไวรัสในมันสำปะหลัง ได้แก่ *African cassava mosaic virus* (ACMV), *East african cassava mosaic Cameroon virus* (EACMCV) โดย 1 ชุดของไพรเมอร์ประกอบด้วย upstream primer ที่พบในทั้ง 2 ไวรัส ส่วนอีก 2 downstream primer มีความจำเพาะกับไวรัสแต่ละชนิด โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีขนาดนิว คลีโอไทด์ 368 คู่เบส สำหรับตรวจ ACMV และ 650 คู่เบส สำหรับตรวจ EACMCV สำหรับอีกชุดของไพรเมอร์ ประกอบด้วยไพรเมอร์ที่ให้ PCR product 540 คู่เบส และ 655 คู่เบส สำหรับตรวจยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส EACMCV และ ACMV ตามลำดับ ซึ่งสามารถนำไปใช้ตรวจมันสำปะหลังในแปลงปลูกในประเทศไนจีเรีย อันจะนำไปสู่การคัดเลือกท่อนพันธุ์ปลอดไวรัสต่อไปในอนาคต ฉะนั้น การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวทั้ง 2 strain (PMWaV-1และ-2) ในปฏิกิริยาเดียวกัน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ต้นสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยว เกิดจากไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2
2. ไพรเมอร์ ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2
3. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอ ของไวรัส
4. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA
5. สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค electrophoresis

วิธีการ

1. การออกแบบไพรเมอร์

สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบส (full length) ของยีนต่างๆที่มีรายงานใน GenBank ของ PMWaV-1 และ PMWaV-2 แล้วออกแบบ primer ให้ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะเจาะจงกับไวรัสแต่ละ strain และออกแบบ primer ให้ครอบคลุมนิวคลีโอไทด์ที่พบทั่วไปในไวรัสทั้งสอง strain โดยออกแบบไพรเมอร์ บริเวณ heat shock protein gene ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV1 ได้แก่ PM1_HS_M_F : 5’ CCACTCTGTGTTTCTCTCCAGG 3’ และ PM1_HS_M_R : 5’CTCCCAGATAGTTATCTCCCATCG 3’ และ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV2 ได้แก่ PM2_HS_M_F: 5’ CAAGGACGGGTCGGTAATGCTAG 3’ และPM2_HS_M_R : 5’ CCAACGCTAAACAGTA CGCATACC 3’

2. การสกัด อาร์เอ็นเอ ของเชื้อ PMWaV-1 และ PMWaV-2 จากใบสับปะรด

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure™RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE)

2.1 เก็บตัวอย่างพืช 1 – 5 มิลลิกรัม ใช้ทำได้ทันที หรือจะแช่เก็บที่ – 70 °ซ

2.2 ดูด Proteinase K (50 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร ทำให้เจือจางใน 300 ไมโครลิตรของ Tissue and Cell Lysis Solution (1 ตัวอย่าง) ใส่ 5 ไมโครลิตร ในหลอด 1.5 มิลลิลิตร

2.3 บดตัวอย่างพืชใน ไนโตรเจนเหลว และเก็บใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.4 เติมสารละลาย Tissue and Cell Lysis Solution ซึ่งผสมกับ Proteinase K แล้ว (ข้อ 2.2) 300 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน

2.5 นำไปบ่มที่ 65 °ซ นาน 15 นาที (ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex ทุกๆ 5 นาที)

นำสารละลายเซลล์พืชที่ได้มาแช่ในน้ำแข็ง นาน 3 – 5 นาที

2.6 เติม MPC Protein Precipitation Reagent 175 ไมโครลิตร. ในสารละลายของ RNA ของเซลล์พืช 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex นาน 10 วินาที

2.7 นำมาปั่นที่ 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที

2.8 ทิ้งตะกอน และเก็บส่วนใสใส่หลอดใหม่

2.9 เติม Isopropanal 500 ไมโครลิตร โดยต้องเย็นจัดโดยแช่ที่ -20 °ซ แล้วพลิก

หลอดขึ้นลง 30-40 ครั้ง

2.10 นำสารละลาย มาปั่น 10,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ นาน 10 นาที

2.11 ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol 500 ไมโครลิตร แล้ว quick spin (ล้าง 2 ครั้ง)

2.12 dry ตะกอนใน 37°ซ นานประมาณ 2 ชั่วโมง

2.13 ละลายตะกอนของ RNA ที่ได้ใน TE buffer 15-20 ไมโครลิตร

3. ทดสอบและปรับระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิให้เหมาะสมในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ cDNA โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR

นำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัด มาทำปฏิกิริยา RT-PCR แบบ OneStep โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากบริเวณ heat shock protein gene ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV แต่ละ strain และใช้ชุดสารเคมีของ QIAGEN OneStep RT-PCR ในการเพิ่มปริมาณ complementary DNA (cDNA)

5X QIAGEN OneStep RT-PCR buffer ไมโครลิตร	4.0
dNTP 10 uM (2.5 uM each) ไมโครลิตร	0.8
Primer PM1_HS_M_F (10 uM) ไมโครลิตร	1.2
Primer PM1_HS_M_R (10 uM) ไมโครลิตร	1.2
Primer PM2_HS_M_F (10 uM) ไมโครลิตร	1.2
Primer PM2_HS_M_R (10 uM) ไมโครลิตร	1.2
Enzyme Reverse Transcriptase Hot StarTaq DNA Polymerase ไมโครลิตร	0.8
dH_2O (RNase-free water) ไมโครลิตร	11.0
Template (RNA) ไมโครลิตร	1.0
รวม ไมโครลิตร	**20.0**

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

OneStep RT-PCR Profile

50 °ซ	30 นาที	
95 °ซ	15 นาที	
94 °ซ	45 วินาที	35 รอบ (cycle)
60 °ซ	45 วินาที	35 รอบ (cycle)
72 °ซ	1 นาที	35 รอบ (cycle)
72 °ซ	10 นาที	
25 °ซ	15 นาที	

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

จากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมต่อเข้าเวคเตอร์ pGEM-T-Easy และ heat shock เข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (DH5α) และคัดเลือกโคโลนีบนอาหาร 2xYT + ampicillin + IPTG + Xgal เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว เพื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารเหลว 2xYT จากนั้นสกัดพลาสมิดออก แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR พร้อมทั้งส่งตัวอย่างไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่า ลำดับเบสตรงตามที่ออกแบบไว้

เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555

สถานที่ - กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ บริเวณ heat shock protein gene ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV1 ได้แก่ PM1_HS_M_F : 5’ CCACTCTGTGTTTCTCTCCAGG 3’ และ PM1_HS_M_R : 5’CTCCCAGATA GTTATCTCCCATCG 3’ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 635 bp และ ไพรเมอร์บริเวณ heat shock gene ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV2 ได้แก่ PM2_HS_M_F: 5’ CAAGGACGGGTCGGTAATGCTAG 3’ และPM2_HS_M_R : 5’ CCAACGCTAAACAGTA CGCATACC 3’ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 380 bp

Sequence PMWaV1 from genome of Heat shock protein gene (ขนาด 690 bp)

ATGGAGGTGGGTATTGATTTTGGCACCACCTATTCCACTCTGTGTTTCTCTCCAGGTAAAGGAAATGATGGTTGTG
TGGTAGAGAGTGACACGATATTTATACCTACTGTCGTTGGTTACAGGAAGGACAACACTCACGCCATAGGTTTGG
GGGCACTGTTGGAAAAAGACTTAGAGGTTTATCGTGATATAAAAAGGTATTTCGGACTCAACAAGTTCAACAAAGA
TGTGTATCTCGATAAATTGAAACCCACAATCGAGGTAGTGATTGACGACTGGGGTTGTTCTATAGGACCAGTAGA
CGGTGCGAGAGGGAAAGCCAAATCAGTTCTCACTTTAGCCTCTGATTTTATAACGGGATTGGTACAACTAGCGAT
CAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAGTACCAGCAGCTTACAATTCTTATCAAAGGAGTTTT
ATTTTTGAAAGTTGTAAGTTGAGCTCTATAAATGTGCAGGCGGTAGTAAACGAACCGACCGCAGCTGGATTGAGT
GCTTTCATAACTACCCCGAAAGCTTCTGTGAATTATTTGTTAGTCTACGATTTCGGAGGAGGCACTTTTGATAGTT
CCTTACTCGTGGTTGGGCCTGCGTACGTGGGAGTACTGGATTCGATGGGAGATAACTATCTGGGAGGCAGGGACG
TAGATAACA

PMWaV1

Name of primer	Sequence (37-672)	%GC	Tm	Length (Base)	PCR Product (bp)
PM1_HS_M_F	CCACTCTGTGTTTCTCTCCAGG	54.5	56.7	22	635
PM1_HS_M_R	CTCCCAGATAGTTATCTCCCATCG	50	57.38	24	

Sequence PMWaV2 from genome of Heat shock protein gene (ขนาด 610 bp)

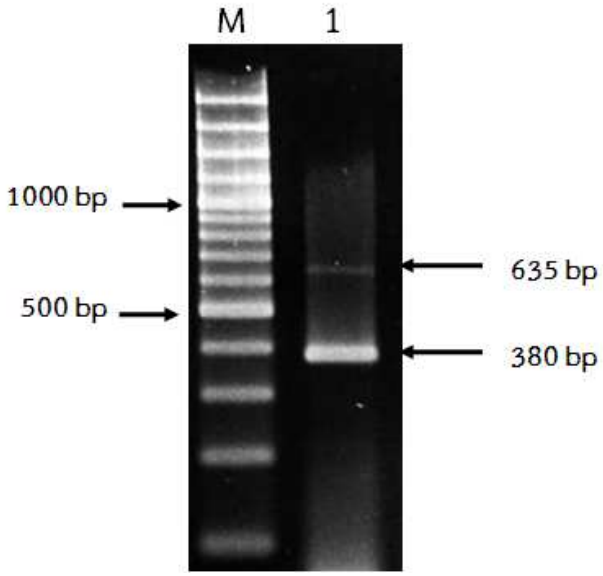
CATACGAACTAGACTCATACGTGCTAAAATTAAAACCAGTGCACAGAGTGGAAGTGTTCAAGGACGGGTCGGTAA
TGCTAGGGGGTATTGGTGAAGGCCCTGATAGGACGGTCTCTGTAACGGATATCATATCCCTTTTTTCTAAAGCACT
TATAAAGGAAGCGGAACAGTCTACTGGACTACGCGTAACGGGTGCGGTGGTAACGGTACCAGCCGACTACAACTC
TTTTAAACGTAGTTTTATAACTAACTGCATGAAAGACTTGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGACC
GCTGCAGCGTTATATTCTTTATCTATATTACAAGAAAAGGATTTATTTCTGTCTGTTTTTGACTTTGGTGGAGGGA
CGTTTGATGTGTCTTTTGTTAGAAAACTCGGAGATGTGGTATGCGTACTGTTTAGCGTTGGCGATAACTTTTTAGG
GGGAAGGGATATCGACAGGGCGGTAGCAGCTGAGGTGAAGGCAAGAGTGGGCGAATCTATTGATACAGCTACATT
GTCATTATTTGCAGCGTCTATTAAAGAGGAGGTGACTAATGAGCCGAGGGCAAAGACGCACGTAGTAAAATTGGT
GGATGG

PMWaV2

Name of primer	Sequence (59-439)	%GC	Tm	Length (Base)	PCR Product (bp)
PM2_HS_M_F	CAAGGACGGGTCGGTAATGCTAG	56	58.84	23	380
PM2_HS_M_R	CCAACGCTAAACAGTACGCATACC	50	57.38	24	

2. ทดสอบและปรับระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิให้เหมาะสมในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ cDNA โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR

ผลการทดลอง พบว่า อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ได้แก่ เริ่มจาก 50 °ซ นาน 30 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก 95 °ซ นาน 30 นาที, (94 °ซ นาน 45 วินาที , 60 °ซ นาน 45 วินาที , 72 °ซ นาน 60 วินาที) รวม 35 รอบตามด้วย 72 °ซ นานอีก 10 นาที 25 °ซ นานอีก 15 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 2% agarose ที่ 100 V. นาน 35-40 นาที พบว่าไวรัส PMWaV1 ให้แถบสีขาวขนาด 635 bp ส่วนไวรัส PMWaV2 ให้แถบสีขาวขนาด 380 bp (ภาพที่ 1) จากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมต่อเข้าเวคเตอร์ pGEM-T-Easy และ heat shock เข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (DH5a) และคัดเลือกโคโลนีบนอาหาร 2xYT +ampicillin +IPTG + Xgal เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว เพื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารเหลว 2xYT จากนั้นสกัดพลาสมิดออก แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR พร้อมทั้งส่งตัวอย่างไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่า ลำดับเบสตรงตามที่ออกแบบไว้



ภาพที่ 1. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 ของสับปะรดโดย

เทคนิค Multiplex RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ PM1_HS_M_F และ PM1_HS_M_R สำหรับ

PMWaV-1และใช้ไพรเมอร์ PM2_HS_M_F และ PM2_HS_M_R สำหรับ PMWaV-2

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder)

1 : ต้นสับปะรดเป็นโรคที่เกิดจาก PMWaV-1 + PMWaV-2

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดทั้ง 2 strain (PMWaV-1 และ PMWaV-2) ในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยอาศัยเทคนิค Multiplex RT-PCR เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์บริเวณ heat shock protein gene ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_HS_M_F : 5’ CCACTCTGTGTTTC TCTCCAGG 3’ และ PM1_HS_M_R : 5’CTCCCAGATA GTTATCTCCCATCG 3’ และ ไพรเมอร์บริเวณ heat shock gene ที่มีความ จำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_HS_M_F: 5’ CAAGGACG GGTCGGTAATGCTAG 3’ และPM2_HS_M_R : 5’ CCAACGCTAAA CAGTA CGCATACC 3’ จากนั้นการสกัด อาร์เอ็นเอ ของเชื้อ PMWaV-1 และ PMWaV-2 จากใบสับปะรดเป็นโรค โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure™RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE) แล้วนำมาทดสอบและปรับระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิให้เหมาะสมในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ cDNA โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR พบว่า อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมได้แก่ เริ่มจาก 50 °C นาน 30 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก 95

°C นาน 30 นาที, (94 °C นาน 45 วินาที , 60 °C นาน 45 วินาที , 72 °C นาน 60 วินาที) รวม 35 รอบตามด้วย 72 °C นานอีก 10 นาที 25 °C นานอีก 15 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis ใน 2% agarose ที่ 100 V. นาน 35-40 นาที พบว่าไวรัส PMWaV1 ให้แถบสีขาวขนาด 635 bp ส่วนไวรัส PMWaV2 ให้แถบสีขาวขนาด 380 bp จากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมต่อเข้าเวคเตอร์ pGEM-T-Easy และ heat shock เข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (DH5a) และคัดเลือกโคโลนีบนอาหาร 2xYT +ampicillin +IPTG + Xgal เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว เพื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารเหลว 2xYT จากนั้นสกัดพลาสมิดออก แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR พร้อมทั้งส่งตัวอย่างไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่า ลำดับเบสตรงตามที่ออกแบบไว้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2547. ยุทธศาสตร์สับปะรด Pineapple National Strategy 2547-2551.
51 หน้า.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2546. โรคเหี่ยว : ภัยคุกคามต่อการปลูกสับปะรดของไทย. วารสารโรคพืช (17) 1-2 :
48-53.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2546. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/2545. เอกสารสถิติการเกษตร เลขที่ 3/2545 กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 51 หน้า.

Beardsley, J.W. 1993. The pineapple mealybug complex; taxonomy, distribution and host relationships. *Acta Hort*. (ISHS) 334:383-386.

Dilokkunanant, U., S. Kladpan, R. Prateepasen and U. Suwanwong. 1996. Pineapple wilt disease in Thailand. *Thai. J. Agric*. 29: 337-348.

German, T.L., D.E. Ullman and U.B. Gunashinghe. 1992. Mealybug Wilt of Pineapple. Chapter 7 *In* Advance in Disease Vector Besearch vol. 9. pp. 241-258 ed. by K.F. Harris. Springer-Verlag New York.

Hu, J.S., D.M. Sether and D.E. Ullman. 1996. Detection of pineapple closterovirus in pineapple plants and mealybugs using monoclonal antibodies. *Plant Pathology* . 45: 829-836.

Lorenzen, J.H., L.M. Piche, N.C. Gudmestad, T. Meacham and P. Shiel. 2006. A multiplex PCR assay to characterize Potato virus Y isolates and identify strain mixtures. Plant Disease. 90 (7): 935-940.

Menzel, W., W. Jelkmann and E. Maiss. 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. J. of Virol. Methods. 99 (1-2): 81-92.

Olufemi J., P. Alabi, Lava Kumar and R.A. Naidu. 2008. Multiplex PCR for the detection of *African cassava mosaic virus* and *East African cassava mosaic Cameroon virus* in cassava. J. of Virol. Methods. 154 (1-2): 111-120.

Sether, D.M. and J.S Hu. 2002. Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology*. 92: 928-935.