ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเทคนิค อาร์ที-พีซีอาร์ เพื่อการตรวจสอบโรคของเสาวรสที่เกิดจากเชื้อไวรัส

ผู้เขียน นางสาวสุดาพร ปุกแก้ว

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (โรคพืช)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
อาจารย์ ดร.อังสนา อัครพิศาล ประธานกรรมการ
ผศ. ดร.วิชชา สอาดสุด กรรมการ
ผศ. ดร.จิราพร ตยุติวุฒิกุล กรรมการ

บทคัดย่อ

จากการสำรวจพื้นที่เพาะปลูกเสาวรสในสถานีเกษตรหลวงปางดะ จังหวัดเชียงใหม่ พบว่าเสาวรสมีอาการใบด่าง ใบบิดเบี้ยว ผลเล็กและผิดรูป ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ทำความเสียหายอย่างรุนแรงต่อผลผลิต โดยมีสาเหตุจากเชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* คือ passionfruit woodiness virus (PWV) จากการปลูกเชื้อโดยวิธีกล พบว่าเชื้อสาเหตุของโรคสามารถกระตุ้นให้เกิดอาการเฉพาะแห่งบนพืชทดสอบคือ *Chenopodium amaranticolor* และ *Chenopodium murale* นอกจากนั้นยังกระตุ้นให้เกิดอาการแบบทั่วทั้งต้นใน *Cassia occidentalis* และ *Vigna sinensis* (L.) จากการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์แล้วนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน โดยการย้อมด้วยกรดฟอสโฟทังสติก 2% pH 7.2 พบอนุภาคไวรัสมีท่อนยาวคด ขนาดความยาวประมาณ 700 นาโนเมตร กว้าง 12 นาโนเมตร จากการทำอิเลคโตรโฟรีซิสโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าอนุภาคไวรัสประกอบด้วยโปรตีนห่อหุ้มขนาด 37 kDa ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ *Potyvirus* เทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคพืช ซึ่งเป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำและรวดเร็ว จึงนำมาใช้ในการพัฒนาการตรวจสอบโรคของเสาวรสที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสจากตัวอย่างใบเสาวรส โดยเปรียบเทียบ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดอาร์เอ็นเอ 4 วิธี คือ SDS-phenol, CF-11 cellulose, Guanidine thiocyanate และ Plant RNA isolation kit (UltraClean^{TM}, MO BIO Laboratories, Inc, USA) จากการทดลองพบว่าวิธี Guanidine thiocyanate ให้ปริมาณผลผลิตของอาร์เอ็นเอทั้งหมด (total RNA) สูงสุด คือ 6.75 ไมโครกรัม จากใบพืชเริ่มต้น 0.1 กรัม และการสกัดอาร์เอ็นเอวิธี CF-11 cellulose, Guanidine thiocyanate และ Plant RNA isolation kit สามารถเพิ่มปริมาณของแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการของไวรัสได้อย่างจำเพาะเจาะจงโดยมีขนาด 327 คู่เบส จากการทำปฏิกิริยาโดยใช้ degenerate primers ที่บริเวณตำแหน่งยีนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค PWV เมื่อได้ผลผลิตของ PCR จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วยความเข้มข้นของไพรเมอร์ 1.0 ไมโครโมลาร์ $MgCl_2$ 0.5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์ reverse transcriptase 5 ยูนิต และกรดนิวคลีอิกตั้งต้น 200 นาโนกรัม โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้น 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วตามด้วยอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จากนั้นเข้าสู่วงรอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 40 รอบ โดยขั้นตอนย่อยที่หนึ่ง ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที ขั้นตอนย่อยที่สอง ใช้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และขั้นตอนย่อยที่สาม ใช้อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที แล้วตามด้วยขั้นตอนสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 7 นาที เมื่อนำผลผลิตที่ได้มาตรวจสอบยืนยันผลการทดลองโดยการนำมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่า ลำดับนิวคลีโอ-ไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PWV สายพันธุ์ที่รายงานจากประเทศไต้หวันและญี่ปุ่น 81 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจะเห็นได้ว่า วิธีการตรวจสอบ PWV ด้วยเทคนิค RT-PCR สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และมีความจำเพาะเจาะจงสูงในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Development of RT-PCR Technique for Detection of Passionfruit Virus Diseases

Author Miss Sudaporn Pukkeaw

Degree Master of Science (Plant Pathology)

Thesis Advisory Committee Lect. Dr.Angsana Akarapisan Chairperson
Asst. Prof. Dr. Vicha Sardsud Member
Asst. Prof. Dr. Jiraporn Tayutivutikul Member

Abstract

Woodiness disease is a damaging disease of passionfruits. This disease was observed to wildspread in passionfruit growing area of The Royal Pangdha Research Station Chiang Mai Province, causing mosaic, rugosity and distortion of leaves, the malformation and smaller in size of fruits. The causal agent is passionfruit woodiness virus (PWV). Virus belongs to the genus *Potyvirus* induced local infection in *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale* and systemic infection in *Cassia occidentalis*, *Vigna sinensis* (L.) by sap inoculation. The particles of the virus were stained with 2 % phosphotungstic acid (pH 7.2) and examined in an electron microscope where filamentous potyvirus like particles (approximately: 700 nm long, 12 nm wide) were observed. The virus particles contained a single protein species of 37 kDa. The development of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique used to detect plant pathology should be reliable. To improve the detection method for passionfruit virus diseases in passionfruit leaves, where compared four RNA extraction methods that utilized either SDS-phenol, CF-11 cellulose, Guanidine thiocyanate and Plant RNA isolation kit (UltraClean™, MO BIO Laboratories, Inc, USA). The guanidine thiocyanate method gave the highest yield of total RNA (6.75 µg from 0.1g leaf sample). CF-11 cellulose, Guanidine thiocyanate and Plant RNA isolation kit method had potential to amplified a 327 PCR product with expected size and specific band for virus were obtained by RT-PCR using degenerate primers located in coat protein gene of PWV. The optimum condition for RT-PCR, the reaction mixture was containing 1.0 µM of primers, 0.5 mM $MgCl_2$, 5 units of reverse transcriptase and the crude nucleic acid extracts 200 ng. The cycling profile was as follows: first step at 42° C for 60 min, second step at 94°C for 3 min, 40 cycles

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

segmented in step 1: 20s at 94°C, step 2: 30s at 42° C, step 3: 30s at 72° C, followed by a final extension step at 72° C for 7 min. The viral origin of the amplified product was confirmed by sequencing, the new sequence had 81% nucleotide identity to PWV in the coat protein which had been published in Taiwan and Japan. The benefits of this RT-PCR based detection of PWV would be simple, rapid and specific.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved