บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจเสาวรสจากแหล่งเพาะปลูกในสถานีเกษตรหลวงปางดะพบว่า เสาวรสมีอาการใบด่างเหลือง สลับเขียวอย่างชัดเจน กระจายทั่วทั้งต้น ผิวใบเป็นคลื่น บางครั้งจะพบลักษณะของใบเล็กลง และเสียรูปร่าง เมื่ออาการรุนแรงขึ้น ใบจะซีดเหลือง และร่วงหล่นไป ส่วนผลพบลักษณะผิวเปลือกไม่เรียบ เปลือกหนาและแข็งกว่าปกติ บางครั้งผลจะบิดเบี้ยว ขนาดเล็กลง ซึ่งมีลักษณะอาการของโรคเช่นเดียวกับที่ ดวงใจ และคณะ (2531) ได้ทำการสำรวจโรคของเสาวรสตามแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญในประเทศไทย เช่น จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ชัยนาท ขอนแก่น และระยอง

เมื่อเก็บตัวอย่างใบเสาวรสที่แสดงอาการของโรค เพื่อนำมาศึกษาเชื้อสาเหตุด้วยวิธีการทดสอบพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุโรค โดยการปลูกเชื้อสาเหตุอาการใบด่างลงบนพืชทดสอบ 14 ชนิด ใน 6 วงศ์ ได้แก่ *Vigna sinensis* (L.) Savex-Hassk, *Phaseolus vulgaris* cv. Red Kidney, *Phaseolus aureus* L., *Cucumber sativas* cv. Parisienne, *Cucumis sativus* L., *Cucurbita moschata* (Duch.) Poir, *Brassica campestris var. chinensis*, *Brassica oleracea* var. *alvoglaba, Gomphrena globosa* L., *Chenopodium amaranticolor*, *Chenopodium murale*, *Cassia occidentalis*, *Nicotiana rustica* และ *Nicotiana tabacum* cv. White Burley พบว่ามีพืชทดสอบเพียง 4 ชนิด ใน 2 วงศ์ ที่เป็นพืชอาศัยของไวรัสสาเหตุของโรคชนิดนี้ สำหรับพืชที่ใช้ทดสอบพบว่าพืชที่แสดงอาการรอยแผลเฉพาะแห่งพบในวงศ์ *Chenopodiaceae* เพียงวงศ์เดียวเท่านั้น คือ *C. amaranticolor* และ *C. murale* โดย *C. amaranticolor* เกิดอาการแผลจุดสีเหลืองขนาดเล็กบนใบ ขอบแผลมีสีแดง เฉพาะบริเวณใบที่ปลูกเชื้อ หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน เช่นเดียวกับที่ Iwai *et al*. (1996) รายงานว่า ในการทดสอบพืชอาศัยของ PWV-AO ที่พบในเสาวรส ประเทศญี่ปุ่น พบว่า PWV-AO สามารถกระตุ้นให้เกิดอาการรอยแผลเฉพาะแห่งบน *C. amaranticolor* เช่นเดียวกัน ส่วน *C. murale* พบอาการรอยแผลเป็นจุดสีขาวปนน้ำตาลอ่อน บริเวณที่ปลูกเชื้อ โดยจะเริ่มพบลักษณะอาการรอยแผลเฉพาะแห่งหลังจากที่ปลูกเชื้อ 11 วัน พืชทดสอบที่แสดงอาการแบบกระจายทั่วทั้งต้น พบเพียง 2 ชนิด คือ *V. sinensis* (L.) และ *Cassia occidentalis* โดยทั้งสองชนิดแสดงอาการใบด่างแบบไม่มี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ขอบเขตชัดเจน กระจายทั่วทั้งต้น หลังจากปลูกเชื้อ 20 และ 23 วัน ตามลำดับ โดยให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับที่ ดวงใจ และคณะ (2531) ทำการศึกษาชนิดของพืชอาศัยในการทดสอบไวรัสในเสาวรสที่พบในประเทศไทย ซึ่งพบลักษณะอาการแบบกระจายทั่วทั้งต้นใน *V. sinensis* (L.) และ *Cassia occidentalis* เช่นเดียวกัน และพบว่าเชื้อสาเหตุดังกล่าวสามารถเข้าทำลายพืชทดสอบได้ 12 ชนิด จากพืชทั้งหมด 25 ชนิด ใน 7 วงศ์ ซึ่งจะทำให้แสดงอาการหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 5-20 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชทดสอบ ลักษณะอาการของโรคที่พบโดยทั่วไป คือ เชื้อทำให้เกิดอาการด่างเหลือง แพร่กระจายทั่วทั้งต้น ในวงศ์ *Amaranthaceae*, *Leguminosae* (บางชนิด) *Passifloraceae* และ *Solanaceae* ส่วนอาการแผลจุดเฉพาะแห่งจะพบในวงศ์ *Chenopodiaceae* และ *Leguminosae* (บางชนิด) โดยเชื้อจะไม่ทำให้เกิดอาการบนพืชทดสอบวงศ์ *Cucurbitaceae*

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรสนั้น พบว่าเมื่อนำตัวอย่างใบพืชสดที่แสดงอาการของโรค ไปทำการตรวจหาอนุภาคไวรัส ด้วยเทคนิค dip preparation โดยการย้อมสีแบบ negative stains ซึ่งใช้ phosphotungstic acid เมื่อนำไปตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน พบอนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นท่อนยาวคด มีขนาด 700-762 นาโนเมตร กว้าง 12 นาโนเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของอนุภาคของไวรัสจากการ dip preparation จากสารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ พบอนุภาคไวรัสมีลักษณะเช่นเดียวกันกับอนุภาคไวรัสที่ได้จากตัวอย่างใบพืชสด ขนาดยาวประมาณ 700 x 12 นาโนเมตร จากการ dip โดยใช้ใบพืชสดพบอนุภาคไวรัสอยู่รวมกันเป็นกลุ่มจำนวนมาก ซึ่งต่างกับอนุภาคไวรัสที่ได้จากการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ ซึ่งพบอนุภาคไวรัสจำนวนน้อย เนื่องจากวิธีการเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์อาจไม่เหมาะสม และข้อจำกัดของเครื่องมือ (เครื่องหมุนเหวี่ยง) ซึ่ง Fuji *et al*. (2003) ทำการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์กลุ่ม *Potyvirus* โดยนำไปแยกอนุภาคไวรัสด้วยการทำ sucrose density ultracentrifugation ซึ่งนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วสูงถึง 112,000g เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในการทดลองได้ใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงที่มีประสิทธิภาพไม่ถึงความเร็วดังกล่าว ทำให้อาจมีผลต่อการตกตะกอนของไวรัส จึงพบอนุภาคไวรัสเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจะต้องมีการปรับปรุงวิธีการเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์วิธีใหม่ และควรที่จะหาพืชอื่นสำหรับเป็นแหล่งผลิตและเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสแทนที่จะใช้จากใบเสาวรสที่แสดงอาการของโรคโดยตรง

จากการตรวจสอบโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของไวรัส สาเหตุอาการใบด่างของเสาวรส โดยการนำสารละลายไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์มาทำการศึกษาขนาดของโปรตีนโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซิสในอะคริลาไมด์เจลเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์ พบแถบของโปรตีนเพียงแถบเดียวขนาด 37 kDa ซึ่งเป็นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสสาเหตุอาการของโรค เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนที่ได้จาก

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

การสกัดโปรตีนทั้งหมดของพืชที่เป็นโรค ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน โดยไม่พบชัดเจนในโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากพืชปกติและพบว่ามีขนาดของโปรตีนเช่นเดียวกับ PWV ที่มีรายงานไว้แล้ว (Chang, 1992) ในขณะที่ Iwai *et al*. (1996) รายงานว่าขนาดของโปรตีนที่พบใน PWV ประเทศไต้หวันมีขนาด 35 kDa ซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโปรตีนของ PWV ที่ถูกรายงานไว้แล้ว แต่ยังจัดอยู่ในช่วงที่ระบุว่าโปรตีนขนาด 28.3-54.1 kDa อยู่ในกลุ่ม *Potyvirus* เช่นเดียวกัน (ICTVdB Descriptions, 2003)

เมื่อนำอาร์เอ็นเอจากการสกัดทั้ง 4 วิธี มาตรวจสอบการคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่แยกได้โดยการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจล เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พบแถบของ total RNA มีลักษณะแถบเข้มชัดเจน 2 แถบ ซึ่งเป็นแถบของ ribosomal RNA (rRNA) มีขนาดระหว่าง 5 กิโลเบส และ 2 กิโลเบส ซึ่งเป็นลักษณะของ 28s rRNA และ 18s rRNA ตามลำดับ (Ambion TechNotes, 2005) โดยพบชัดเจนจากอาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่ 1: SDS-phenol, วิธีที่ 2: CF-11 cellulose และ วิธีที่ 3: Guanidine thiocyanateในขณะที่อาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่ วิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit ไม่พบลักษณะดังกล่าว อาจเนื่องจากวิธีนี้ ใช้ปริมาณใบพืชตั้งต้นเพียง 0.1 กรัม ซึ่งน้อยกว่าวิธีอื่น ๆ ที่ใช้ใบพืชเริ่มต้นในการสกัดตั้งแต่ 2-6 กรัม ทำให้ได้ผลผลิตของ total RNA สูง เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีดังกล่าวจึงตรวจพบลักษณะของ 28s และ 18s rRNA ได้ชัดเจน

จากการตรวจสอบไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรสด้วยเทคนิค RT-PCR ซึ่งเมื่อนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธี พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดวิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate โดยมี guanidine thiocyanate เป็นองค์ประกอบของ extraction buffer เมื่อนำไปตรวจสอบค่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 ประมาณ 1.98 (จาก 5 ซ้ำ) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอที่สะอาด บริสุทธิ์ มีคุณภาพสำหรับการทำปฏิกิริยา RT-PCR ในขณะที่วิธีที่ 1: SDS-phenol, วิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate และ วิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit ได้ค่าอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 เท่ากับ 2.22, 1.77 และ 1.72 ตามลำดับ (จาก 5 ซ้ำ)

จากการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธี พบว่าวิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate ให้ปริมาณผลผลิตของ total RNA สูงสุด รองลงมาคือ วิธีที่ 2: CF-11 cellulose, วิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit และ วิธีที่ 1: SDS-phenol ตามลำดับ โดยอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดวิธีที่ วิธีที่ 2: CF-11 cellulose, วิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate และ วิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit สามารถใช้เป็นอาร์เอ็นเอเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของไวรัสได้ด้วยเทคนิค RT-PCR ในขณะที่อาร์เอ็นเอจากการสกัดด้วยวิธีที่ 1: SDS-phenol ไม่สามารถเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของไวรัสได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ด้วยเทคนิคดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีการปนเปื้อนของ SDS และ organic solvents อื่น ๆ ที่ใช้ในระหว่างขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเอ รวมทั้ง polysaccharides จากพืชด้วย ที่มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยา RT-PCR (Promega Corporation, 2005) ส่วนระยะเวลาในการสกัดอาร์เอ็นเอในแต่ละวิธีนั้นพบว่าวิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit ใช้เวลาในการสกัดน้อยที่สุด โดยใช้เวลาเพียง 35-40 นาที ส่วนวิธีที่ 3: Guanidine thiocyanateใช้เวลาในการสกัดประมาณ 3.45 ชั่วโมง วิธีที่ 2: CF-11 cellulose ใช้เวลา 7.30 ชั่วโมง ในขณะที่วิธีที่ 1: SDS-phenol ใช้เวลาในการสกัดนานถึง 13 ชั่วโมง ส่วนค่าใช้จ่ายในการสกัดอาร์เอ็นเอแต่ละวิธีนั้น พบว่าวิธีที่ 2: CF-11 cellulose มีค่าใช้จ่ายโดยประมาณต่อหนึ่งตัวอย่างต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับวิธีอื่น ๆ รองลงมาคือวิธีที่ 1: SDS-phenol และ วิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit ตามลำดับ ในขณะที่วิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate มีค่าใช้จ่ายในการสกัดอาร์เอ็นเอสูงที่สุด (ภาคผนวก) ดังนั้นในการเลือกใช้วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอนอกจากคำนึงถึงคุณภาพของอาร์เอ็นเอที่ได้แล้ว ขั้นตอนในการสกัดก็ควรทำได้สะดวก ไม่ยุ่งยาก ตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ และงบประมาณในการการสกัดด้วย

ปัจจุบันพบว่าเทคนิค RT-PCR ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบไวรัสในพืชชนิด ต่าง ๆ ได้อย่างจำเพาะเจาะจงและ ยังมีความไวในการตรวจสอบสูงอีกด้วย (Niimi *et al*., 1999; Franck *et al*., 1997; Hung *et al*., 2000) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงประยุกต์ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรส จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ degenerate primers (Pt1 และ Pt2) ซึ่งมีลำดับเบสที่กำหนดการสังเคราะห์กรดอะมิโนตำแหน่งอนุรักษ์ในส่วนโปรตีนห่อหุ้มของ PWV สายพันธุ์ต่าง ๆ พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดวิธีที่ 2: CF-11 cellulose, วิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate และ วิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit สามารถใช้เป็นอาร์เอ็นเอแม่แบบในการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของเชื้อสาเหตุด้วยวิธี RT-PCR ได้ ซึ่งจากการตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยการตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซิสบนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้อาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit จะไม่สามารถเห็นแถบของ 18s และ 28s rRNA แต่เมื่อนำอาร์เอ็นเอจากการสกัดด้วยวิธีดังกล่าวมาเป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ก็สามารถตรวจสอบการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของไวรัสได้ อาจเนื่องจากหลาย ๆ ปัจจัย เช่น ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ ปริมาณใบพืชเริ่มต้นที่ใช้ในการสกัด หรืออุณหภูมิระหว่างขั้นตอนการสกัด ในขณะที่อาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่ 1: SDS-phenol ไม่สามารถเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกได้ด้วยเทคนิคดังกล่าว อาจเนื่องจากวิธีนี้ใช้ SDS เป็นองค์ประกอบของ extraction buffer ซึ่งการปนเปื้อนของสารเคมีชนิดนี้ในระหว่างขั้นตอนการสกัดอาร์เอ็นเออาจรบกวนปฏิกิริยา RT-PCR ได้ (Promega Corporation, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

และเมื่อนำพืชปกติมาทำการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธีการสกัดทั้ง 4 วิธี มาทำปฏิกิริยา RT-PCR ไม่พบการเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิก

จากผลการทดลองพบว่า การสกัดอาร์เอ็นเอวิธีที่ 2: CF-11 cellulose เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบไวรัสในต้นเสาวรส ก่อนที่จะมีการนำท่อนพันธุ์ให้แก่เกษตรกรไปขยายพันธุ์ในพื้นที่เพาะปลูก เพราะเป็นวิธีที่ประหยัดต้นทุนในขั้นตอนการสกัดอาร์-เอ็นเอและใช้เวลาในการสกัดไม่นานมากนัก นอกจากนั้นยังได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพต่อการนำไปทำปฏิกิริยา RT-PCR อีกด้วย

เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ total RNA สูงสุดจากวิธีที่3: Guanidine thiocyanate มาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-PCR นั้น โดยทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นต่าง ๆ ขององค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา เช่น อาร์เอ็นเอแม่แบบใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.02, 0.2, 2, 20 และ 200 นาโนกรัม ความเข้มข้นของไพรเมอร์ตั้งแต่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ไมโคร-โมลาร์ และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ใช้ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2 และ 3 มิลลิโมลาร์

ในการทดลองเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเริ่มต้นที่ใช้เป็นอาร์เอ็นเอแม่แบบในการทำปฏิกิริยา RT-PCR พบว่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ระดับ 200 นาโนกรัม คือความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจพบการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิกของเชื้อสาเหตุโรคได้ด้วยเทคนิคดังกล่าว ในขณะที่ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเริ่มต้นที่ระดับต่ำกว่านี้ คือ 20, 2, 0.2 และ 0.02 นาโนกรัมไม่สามารถตรวจพบการเพิ่มปริมาณของอาร์เอ็นเอได้ Nagata *et al*. (2001) รายงานว่า สามารถตรวจพบ SPFMV ที่เข้าทำลายมันเทศด้วยเทคนิค RT-PCR โดยสามารถตรวจพบเชื้อดังกล่าวที่มีความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเริ่มต้นในระดับต่ำสุดเพียง 0.2 พิโคกรัม จาก total RNA อาจเนื่องจากในการทดลองนั้นใช้ guanidine thiocyanate-phenol (ISOGEN™, Nippon Gene, Toyama, Japan) ซึ่งเป็นชุดสกัดอาร์เอ็นเอที่มีจำหน่ายทางการค้า และใช้ guanidine thiocyanate เป็นองค์ประกอบของ extraction buffer ซึ่งได้ปริมาณ total RNA สูงสุดถึง 39.0 ไมโครกรัม ทำให้ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพ สะอาดและบริสุทธิ์ ไม่มีสารสกัดต่าง ๆ ปนเปื้อนในขั้นตอนการทำปฏิกิริยา RT-PCR ซึ่งสามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอที่ระดับความเข้มข้นต่ำถึงระดับพิโคกรัม

ส่วนในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา RT-PCR นั้น พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ระดับ 0.4 และ 0.6 ไมโครโมลาร์ ไม่สามารถตรวจพบแถบของดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ แต่ที่ระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.8 ไมโครโมลาร์ สามารถตรวจพบแถบของดีเอ็นเอได้ แต่ลักษณะของแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนมากนัก และพบว่าที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 1.0 ไมโครโมลาร์ คือระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ดี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ที่สุดและเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาซึ่งให้แถบของดีเอ็นเอชัดเจน โดยในการศึกษาไวรัสสาเหตุโรคพืชชนิดอื่นนั้น พบว่า Dovas and Katis (2003); Niimi *et al*. (2003) ใช้ปริมาณความเข้มข้นของไพรเมอร์ 1 ไมโครโมลาร์ เป็นองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อการตรวจสอบไวรัสพืชเช่นเดียวกัน

ในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา RT-PCR พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ สามารถตรวจพบแถบของดีเอ็นเอ แต่ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ ให้ลักษณะแถบของดีเอ็นเอที่เจือจางไม่คมชัด เหมือนกับที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง เพราะฉะนั้นในการทดลองสามารถเลือกใช้ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ตั้งแต่ 0.5-2.0 มิลลิโมลาร์ได้ สำหรับในการตรวจสอบไวรัสพืชชนิดอื่น ๆ พบว่า Dovas and Katis (2003); Niimi *et al*. (2003) ใช้ปริมาณความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เท่ากับ 1.5 มิลลิโมลาร์ เป็นองค์ประกอบของการทำปฏิกิริยา RT- PCR ในการตรวจสอบไวรัสสาเหตุของเชื้อที่เข้าทำลายองุ่นและลิลลี่ ในขณะที่ Nagata *et al*. (2001) ใช้ปริมาณความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เพียง 0.3 ไมโครโมลาร์เท่านั้น ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อตรวจหาเชื้อ SPFMV ในมันเทศ อาจเนื่องจากขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และงบประมาณของนักวิจัยแต่ละบุคคลที่ต้องการประหยัดค่าใช้จ่ายในการทดลอง โดยเลือกใช้ระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของแต่ละองค์ประกอบที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR ในขณะที่ระดับความเข้มข้นนั้นสามารถตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบพืชปลอดโรคให้แก่เกษตรกรหรือด่านกักกันพืชต่าง ๆ เมื่อมีตัวอย่างจำนวนมากได้

เมื่อนำผลผลิตจากการทำปฏิกิริยา RT-PCR มาทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาเปรียบเทียบความเหมือนด้วยโปรแกรม clustalW กับ *Potyvirus* ที่พบในเสาวรสจากข้อมูลใน GenBank จาก NCBI ที่มีรายงานจากประเทศต่าง ๆ ซึ่งพบว่า มี *Potyvirus* 2 ชนิด ที่พบในเสาวรสคือ PWV และ Cowpea aphid-borne mosaic virus พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับ PWV มากกว่า โดยเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PWV ที่มีรายงานจากประเทศไต้หวันและญี่ปุ่น 81 เปอร์เซ็นต์ (Accession number AF208662 และ D85849 ตามลำดับ) และลำดับนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวมีความเหมือนกับ PWV isolate University of Sydney (Accession number U67150) รายงานจากประเทศออสเตรเลีย 78 เปอร์เซ็นต์, PWV-M2 (Accession number AY433952) รายงานจากประเทศบราซิล 77 เปอร์เซ็นต์ และ Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate PE2 (Accession number AY253906) รายงานจากประเทศบราซิล 75 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 15) ดังนั้นจึงตั้งชื่อลำดับนิวคลีโอไทด์จากการหาลำดับเบสนี้ว่า PWV-CM

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PWV-CM มาเปรียบเทียบความเหมือนกับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ PWV ที่มีรายงานไว้ใน GenBank จาก NCBI พบว่า PWV-CM มีความเหมือนกับ Passionfruit woodiness virus-M2 และ Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate PE2 (Accession number AAR08937 และ AAP04516 ตามลำดับ) จากประเทศบราซิล 91 เปอร์เซ็นต์ อาจเนื่องจากเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดเป็นไวรัสกลุ่ม *Potyvirus* เช่นเดียวกันจึงมีตำแหน่งอนุรักษ์บริเวณเดียวกัน ทำให้มีลำดับการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนเหมือนกัน เมื่อนำไปเปรียบเทียบความเหมือนจากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนกับไวรัสกลุ่มเดียวกันจึงมีความคล้ายกันมากซึ่งในการทดลองการออกแบบไพรเมอร์เป็นเพียงส่วนหนึ่งของยีนโปรตีนห่อหุ้มไวรัส หากมีการออกแบบไพรเมอร์หรือทำการโคลนยีนของยีนโปรตีนห่อหุ้มนี้ทั้งหมด คาดว่าจะได้เปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับไวรัสชนิดใดชนิดหนึ่งมากกว่านี้ ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าไวรัสที่พบคือชนิดใด นอกจากนี้ลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมีความเหมือนกับ PWV isolate University of Sydney (Accession number AAB8115) รายงานจากประเทศออสเตรเลีย 89 เปอร์เซ็นต์ และ PWV รายงานจากประเทศไต้หวันและญี่ปุ่น (Accession number AAG43495 และ BAA24530 ตามลำดับ) 86 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งคุณสมบัติของ PWV-CM ก็คล้ายกับ PWV ที่มีรายงานในต่างประเทศและอยู่ในกลุ่ม *Potyvirus*

ในประเทศไทยพบว่ายังไม่มีรายงานการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่เข้าทำลายเสาวรส เพราะฉะนั้นน่าจะมีการทดลองเพิ่มเติมในการโคลนยีนของโปรตีนห่อหุ้ม PWV ทั้งหมดที่พบในเสาวรสของประเทศไทย เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสนี้ได้อย่างเฉพาะเจาะจงมากขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved