

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการใบด่างของเสาวรศ

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างเสาวรศที่มีอาการใบด่างจากพื้นที่ที่มีการระบาดของโรครุนแรง ในจังหวัดเชียงใหม่ คือ แหล่งเพาะปลูกในสถานีเกษตรหลวงปางดะ อ.สะเมิง พบว่าลักษณะอาการผิดปกติบนใบเสาวรศ คือ อาการใบด่างและใบด่างเหลืองปนกันอยู่ (ภาพ 2) ใบบิดเบี้ยวและหงิกงอ กระจายทั่วทั้งต้น (ภาพ 3) ผิวของผลพบอาการด่าง ไม่เรียบ มีขนาดเล็กกล และมึลักษณะผิดปกติจากปกติ (ภาพ 4) เมื่อปลูกเชื้อสาเหตุอาการใบด่างลงบนพีช 14 ชนิด 6 วงศ์ จากผลการทดลองมีพีชเพียง 4 ชนิด ใน 2 วงศ์ ที่เป็นพีชอาศัยของไวรัสสาเหตุของโรคนชนิดนี้ *C. amaranticolor* และ *C. murale* แสดงอาการแบบรอยแผลเฉพาะแห่ง (local lesion) โดย *C. amaranticolor* เกิดอาการแผลจุดสีเหลืองขนาดเล็กบนใบ และมีขอบแผลสีแดง เฉพาะบนใบที่ปลูกเชื้อประมาณ 7 วัน (ภาพ 5ก) ส่วน *C. murale* เกิดอาการแผลจุดสีขาวปนน้ำตาลอ่อน พบเฉพาะบนใบที่ปลูกเชื้อ ประมาณ 11 วัน (ภาพ 5ข) ส่วน *V. sinensis* (L.) และ *Cassia occidentalis* แสดงอาการแบบแพร่กระจายทั่วทั้งต้น โดยมีลักษณะอาการใบด่างแบบไม่มีขอบเขตชัดเจน หลังจากทีปลูกเชื้อ 20 และ 23 วัน ตามลำดับ (ภาพ 5ค และ 5ง) ดังรายละเอียดในตาราง 1



ภาพ 2 ลักษณะอาการใบด่าง (ก) และใบด่างเหลืองของเสาวรส (ข)

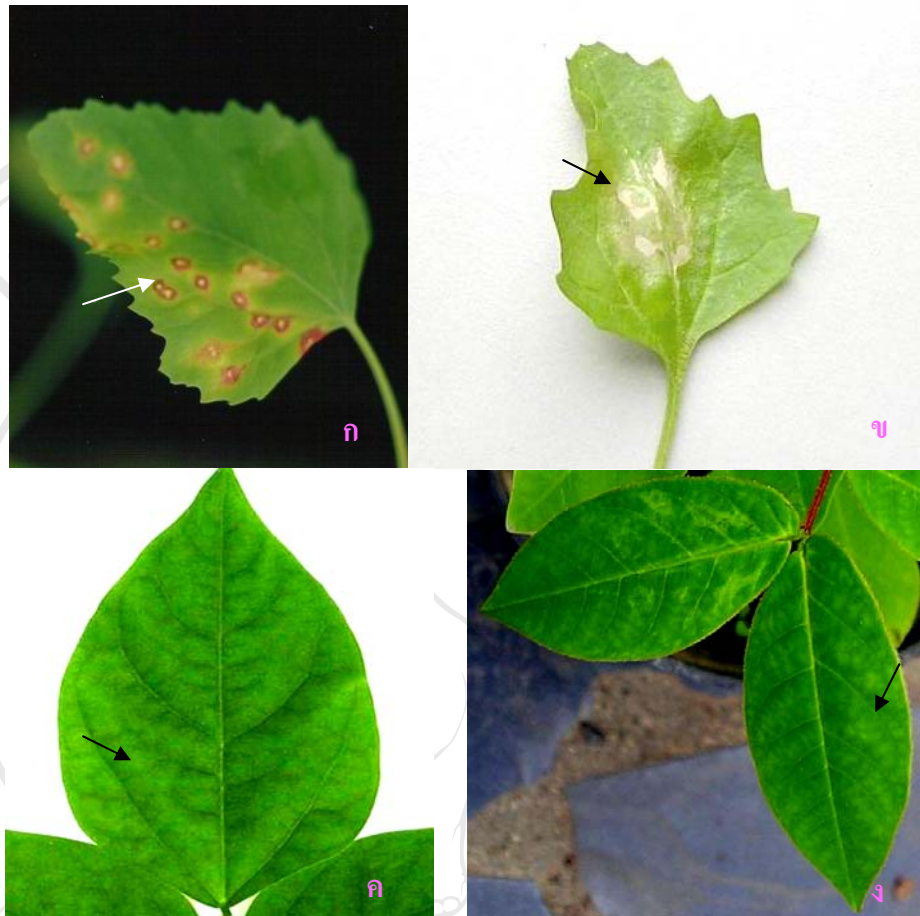


ภาพ 3 เถาเสาวรสแสดงอาการใบด่าง บิดเบี้ยว และหงิกงอ กระจายทั่วทั้งต้น



ภาพ 4 ลักษณะผลเสาวรสปกติ (ก) ลักษณะผลเสาวรสผิดรูปและมีขนาดเล็กจากปกติ (ข, ค)
และลักษณะอาการต่างของพืผลเสาวรส (ง)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 5 อาการบนพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อสาเหตุการใบต่างของเสาวรสีที่แยกจากใบเสาวรสีด้วยวิธีกล

- ก. คีโนโปเดียม (*Chenopodium amaranticolor*) แสดงอาการแผลเฉพาะแห่งเป็นจุดสีเหลืองขนาดเล็ก ขอบแผลสีแดง หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน
- ข. คีโนโปเดียม (*Chenopodium murale*) แสดงอาการแผลเฉพาะแห่งเป็นจุดเซลล์ตายสีขาวปนน้ำตาลอ่อน หลังจากปลูกเชื้อ 9 วัน
- ค. ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis* L.) แสดงอาการใบด่างแบบไม่มีขอบเขตชัดเจน หลังจากปลูกเชื้อ 20 วัน
- ง. ขี้เหล็กเทศ (*Cassia occidentalis*) แสดงอาการใบด่างแบบไม่มีขอบเขตชัดเจน หลังจากปลูกเชื้อ 23 วัน

ตาราง 1 ชนิดของพืชอาศัย อาการที่เกิดขึ้น และจำนวนวันที่แสดงอาการหลังจากปลูกเชื้อที่ทำให้เกิดอาการใบค่างของเสาวรศ (L- อาการแผลเฉพาะแห่ง, S- อาการแบบทั่วทั้งต้น)

พืชอาศัย	ชื่อสามัญ	ลักษณะอาการที่เกิดขึ้น	จำนวนวันที่เริ่มแสดงอาการหลังจากปลูกเชื้อ
Family <i>Amaranthaceae</i> <i>Gomphrena globosa</i> Linn.	บานไม่รู้โรย	-	-
Family <i>Chenopodiaceae</i> <i>Chenopodium amaranticolor</i> <i>Chenopodium murale</i>	คีนโปเดียม	L	7
	คีนโปเดียม	L	11
Family <i>Crucifereae</i> <i>Brassica oleracea</i> var. <i>alvoglaba</i> <i>Brassica campestris</i> var. <i>Chinensis</i>	คะน้าขอด	-	-
	กวางตุ้งคอก	-	-
Family <i>Cucurbitaceae</i> <i>Cucumber sativas</i> cv. <i>Parisienne</i> Pickling <i>Cucumis sativas</i> L. <i>Cucurbita moschata</i> (Duch.)Poir	แตงกวา	-	-
	แตงกวา	-	-
	ฟักทอง	-	-
Family <i>Leguminosae</i> <i>Cassia occidentalis</i> <i>Phaseolus aureus</i> (L.) <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Red Kidney <i>Vigna sinensis</i> (L.)	ขี้เหล็กเทศ	S	23
	ถั่วเขียว	-	-
	ถั่วแดงหลวง	-	-
	ถั่วพุ่ม	S	20
Family <i>Solanaceae</i> <i>Nicotiana rustica</i> <i>Nicotiana tabacum</i> cv. <i>White</i> Burley	ยาสูบ	-	-
	ยาสูบใบใหญ่	-	-

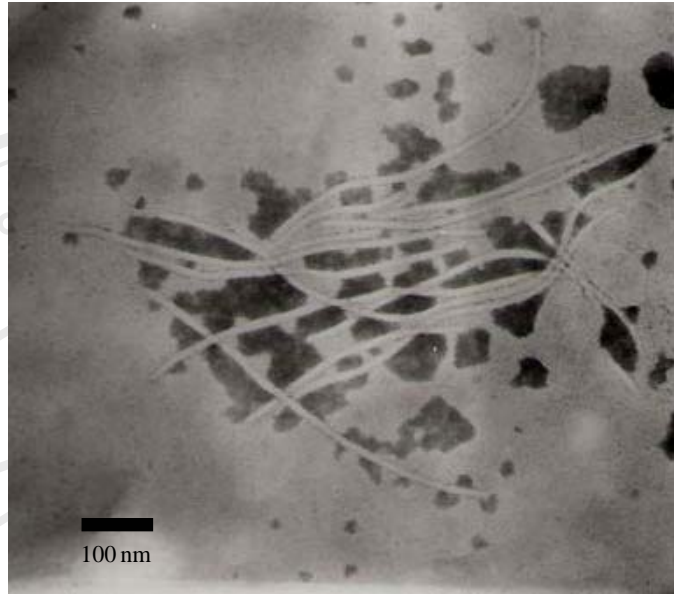
2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรศ

จากการศึกษาอนุภาคของไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรศจากใบพืชสดที่แสดงอาการของโรคด้วยวิธี dip preparation พบอนุภาคไวรัสมีลักษณะเช่นเดียวกันกับอนุภาคไวรัสที่ได้จากการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ คืออนุภาคไวรัสมีท่อนยาว คด ขนาด 700-762 นาโนเมตร กว้าง 12 นาโนเมตร โดยพบอนุภาคไวรัสจำนวนมากแน่นมาก อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (ภาพ 6)

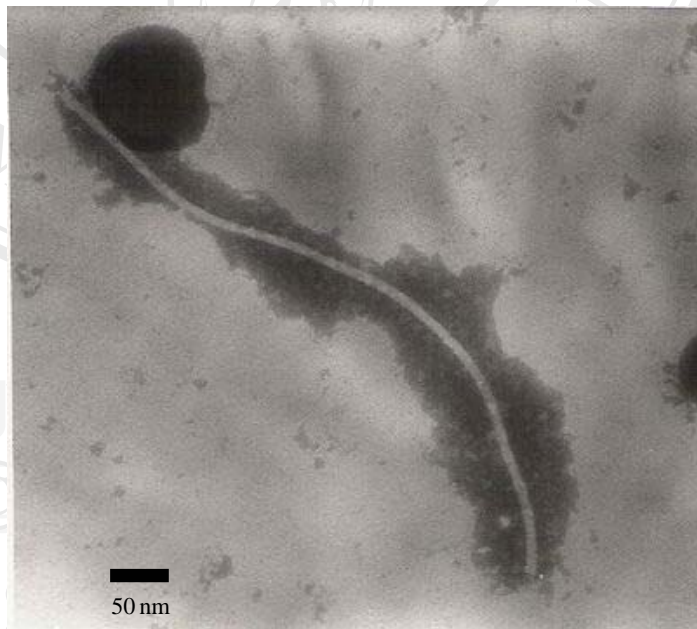
จากการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ เมื่อได้สารละลายไวรัสป่นข้างบริสุทธิ์นำสารละลายดังกล่าวไปทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสด้วยวิธี dip preparation แล้วย้อมสีแบบ negative stains ด้วย phosphotungstic acid เมื่อนำไปตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบอนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นท่อนยาวคด ขนาดประมาณ 700 x 12 นาโนเมตร เช่นเดียวกัน (ภาพ 7)

3. การตรวจสอบโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรศ

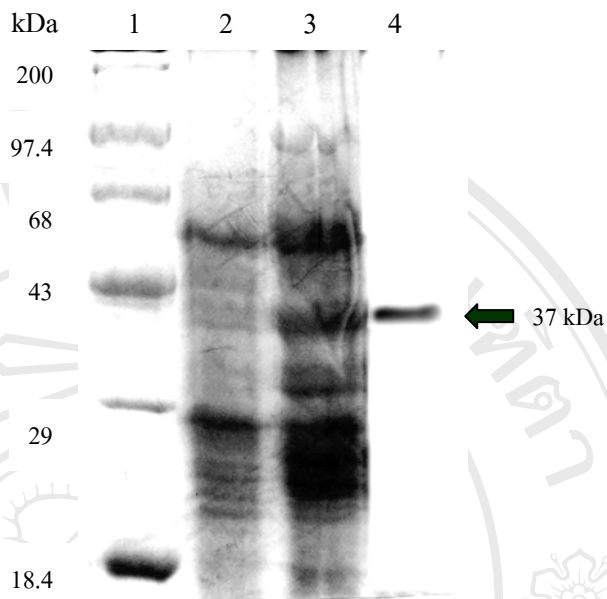
จากการนำสารละลายไวรัสป่นข้างบริสุทธิ์มาทำการศึกษานาฬิกาของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรศ โดยวิธี SDS-PAGE เข้มข้น 12% resolving gel โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนที่สกัดได้จากพืชปกติและพืชเป็นโรค พบแถบของโปรตีนเพียงแถบเดียว โดยมีขนาด 37 kDa ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสสาเหตุของโรค เมื่อเปรียบเทียบกับแถบของโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนทั้งหมดของพืชที่เป็นโรคซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกัน โดยไม่พบชัดเจนในโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากพืชปกติ (ภาพ 8)



ภาพ 6 ลักษณะอนุภาคไวรัสจากการ dip preparation ด้วยใบพืชสด



ภาพ 7 ลักษณะท่อนยาวคดของอนุภาคไวรัสจากการเตรียมสารละลายไวรัสบริสุทธิ์



ภาพ 8 แถบของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของอนุภาคไวรัสจากการทำอิเล็กโตร-โฟรีซิสแบบ SDS-PAGE (12% gel)

แถวที่ 1: โปรตีนมาตรฐาน (Molecular weight standards)

แถวที่ 2: โปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากใบเสาวรสปกติ

แถวที่ 3: โปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากใบเสาวรสที่แสดงอาการใบด่าง

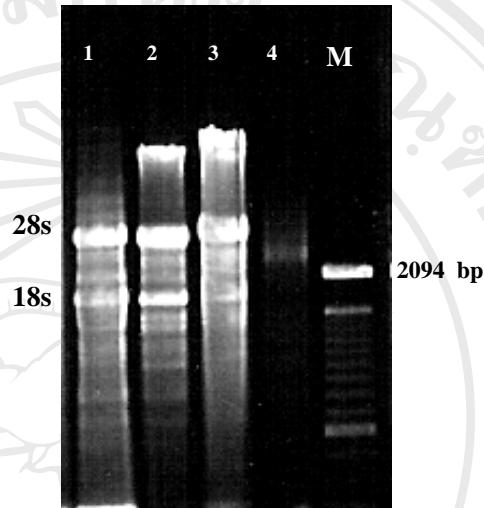
แถวที่ 4: แถบโปรตีนของอนุภาคไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรสที่แยกจากจังหวัดเชียงใหม่

4. การตรวจสอบไวรัสสาเหตุอาการใบด่างของเสาวรสด้วยเทคนิค RT-PCR

4.1 การตรวจสอบคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอ (total RNA) ที่สกัดได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธี มาตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอด้วยวิธี อิเล็กโตร โฟรีซิส โดยใช้ 1 % agarose gel ใช้ความต่างศักย์ 50 โวลท์ ประมาณ 40 นาที พบแถบของ total RNA มีลักษณะแถบเข้มชัดเจน 2 แถบ ซึ่งเป็นแถบของ ribosomal RNA (rRNA) มีขนาดระหว่าง 5 กิโลเบส และ 2 กิโลเบส เป็นลักษณะของ 28s rRNA และ 18s rRNA ตามลำดับ (Ambion TechNotes, 2005) โดยพบลักษณะดังกล่าวชัดเจนจากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากการสกัดวิธีที่ 1: SDS-phenol

วิธีที่ 2: CF-11 cellulose และ วิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate ส่วนวิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit พบแถบของอาร์เอ็นเอเพียงแถบเดียวที่ชัดเจน (ภาพ 9)



ภาพ 9 ลักษณะของ total RNA ที่สกัดได้จากการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธี
 แถวที่ 1; อาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่ 1: SDS-phenol
 แถวที่ 2; อาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่ 2: CF-11 cellulose
 แถวที่ 3; อาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate
 แถวที่ 4; อาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit
 แถว M ; ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

เมื่อนำอาร์เอ็นเอจากการสกัดในแต่ละวิธี มาตรวจสอบคุณภาพโดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer พบว่า อาร์เอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate ได้อาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพมากที่สุด คือ ได้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance ratio) ที่ความยาวคลื่น 260/280 ประมาณ 1.98 (ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ) ซึ่งเป็นอาร์เอ็นเอที่สะอาด บริสุทธิ์และมีคุณภาพสำหรับการทำปฏิกิริยา RT-PCR (Total RNA Kit, 2005) ส่วนวิธีที่ 1: SDS-phenol, วิธีที่ 2: CF-11 cellulose และ วิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit ได้อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสง 260/680 เท่ากับ 2.22, 1.77 และ 1.72 ตามลำดับ (ตาราง 2)

จากการคำนวณหาปริมาณความเข้มข้นของ total RNA ที่สกัดได้ในแต่ละวิธี พบว่าวิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate ให้ปริมาณของผลผลิต total RNA เฉลี่ยสูงสุดคือ 6.75 ไมโครกรัม จากใบพืชตั้งต้น 0.1 กรัม (จาก 5 ซ้ำ) วิธีที่ให้ผลรองลงมา คือ วิธีที่ 2: CF-11 cellulose โดยมีปริมาณความเข้มข้นของ total RNA เท่ากับ 4.56 ไมโครกรัม ส่วนวิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit ให้ปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ 3.48 ไมโครกรัม และวิธีที่ 1: SDS-phenol ให้ปริมาณความเข้มข้นของ total RNA น้อยที่สุดคือ 0.06 ไมโครกรัม ส่วนระยะเวลาในการสกัดอาร์เอ็นเอในแต่ละวิธีนั้นพบว่าวิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit ใช้เวลาในการสกัดน้อยที่สุด โดยใช้เวลาเพียง 35-40 นาที ส่วนวิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 3.45 ชั่วโมง วิธีที่ 2: CF-11 cellulose ใช้เวลา 7.30 ชั่วโมง ในขณะที่วิธีที่ 1: SDS-phenol ใช้เวลาในการสกัดนานถึง 13 ชั่วโมง (ตาราง 2)

ตาราง 2 เปรียบเทียบข้อมูลของอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสง (260/280) ปริมาณความเข้มข้นของ total RNA และเวลาที่ใช้ในการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธี

วิธีการสกัดอาร์เอ็นเอ	*อัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ 260/280 นาโนเมตร	*ปริมาณความเข้มข้นของ total RNA(μ g) / ใบพืช เริ่มต้น 0.1 กรัม	เวลาที่ใช้ในการสกัด (ชั่วโมง)
วิธีที่ 1: SDS-phenol	2.22	0.06	13
วิธีที่ 2: CF-11 cellulose	1.77	4.56	7.30
วิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate	1.98	6.75	3.45
วิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit	1.72	3.48	0.35-0.40

* ค่าเฉลี่ยจาก 5 ซ้ำ

4.2 การออกแบบไพรเมอร์

เมื่อทำการศึกษาริเวณอนุรักษ์จากกรดอะมิโนของลำดับเบสอาร์เอ็นเอในส่วนที่แปลรหัสเป็นโปรตีนห่อหุ้มของ *Potyvirus* รวมทั้ง PWV จากหลาย ๆ สายพันธุ์ที่มีรายงานไว้จากฐานข้อมูล GenBank จาก NCBI แล้วจึงทำการคัดเลือกลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ที่ได้จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโน โดยนำไปเปรียบเทียบความเหมือนด้วยการใช้โปรแกรม ClustalW เพื่อเลือกตำแหน่งอนุรักษ์ที่พบใน CP gene บน ssRNA ของไวรัส โดยเลือกตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสกรดอะมิโน VWCI(E/D)NG และ QMK(A/T)AAL ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แปลรหัสกรดอะมิโนดังกล่าวมาจากการเปรียบเทียบความเหมือนของ *Potyvirus* จำนวน 11 สายพันธุ์โดยการใช้โปรแกรม clustalW เช่นกัน พบว่า ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR เพื่อตรวจสอบไวรัสสาเหตุการใบด่างในเสาวรส (ตาราง 3)

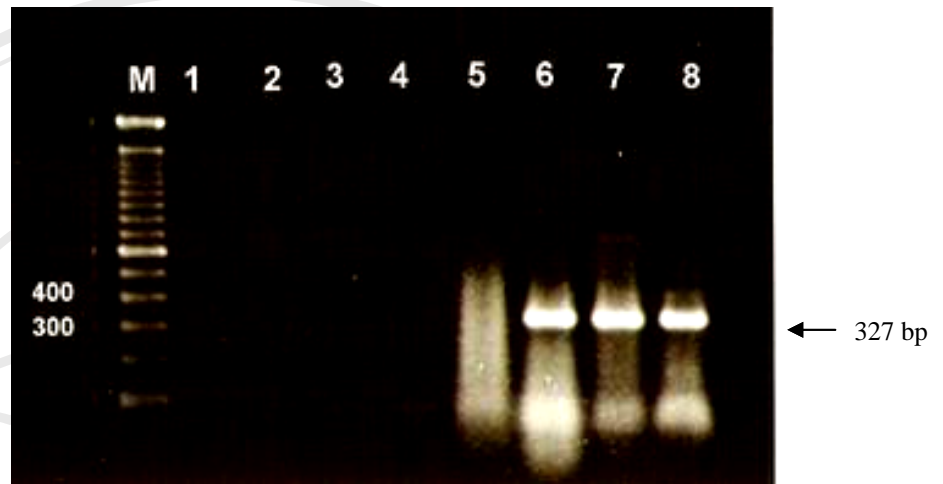
ตาราง 3 Degenerate primers ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Potyvirus* ในการทำปฏิกิริยา RT-PCR

ไพรเมอร์	ชนิด	ลำดับเบส	ความยาว (bp)	กำหนดการสังเคราะห์กรดอะมิโน	ขนาดของผลผลิต PCR (bp)
Pt1	upstream	5'- GTBTGGTGCATHGANAAAY GGMAC -3'	23	VWCI(E/D) NG	327
Pt2	downstream	5'- ARDGCDCGCDGYTTCAT YTG -3'	20	QMK(A/T)A AL	

หมายเหตุ : **B** คือ C,G หรือ T; **D** คือ A, G หรือ T; **H** คือ A, T หรือ C; **M** คือ A หรือ C; **N** คือ A, G, C หรือ T; **R** คือ A หรือ G และ **Y** คือ C หรือ T

4.3 การเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกด้วยวิธีอาร์ที-พีซีอาร์

ในการทดลองนี้ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบไวรัสสาเหตุการใบด่างของเสาวรส จากผลการทดลองพบว่า เมื่อใช้ degenerate primers (Pt1 และ Pt2) ซึ่งมีลำดับเบสที่กำหนดการสังเคราะห์กรดอะมิโนตำแหน่งอนุรักษ์ในส่วนโปรตีนห่อหุ้มของ potyvirus สายพันธุ์จากประเทศต่าง ๆ เมื่อนำผลผลิต RT-PCR ไปตรวจสอบโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส บนอะกาโรสเจลเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัดวิธีที่ 2: CF-11 cellulose วิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate และ วิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit สามารถใช้เป็นอาร์เอ็นเอแม่แบบในการตรวจสอบการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของเชื้อสาเหตุด้วยวิธี RT-PCR ได้ โดยแถบดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดตามที่ต้องการคือประมาณ 327 bp ในขณะที่อาร์เอ็นเอที่สกัดด้วยวิธีที่ 1: SDS-phenol ไม่สามารถเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกได้ด้วยเทคนิคดังกล่าว เมื่อทำการเปรียบเทียบการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธีจากพืชปกติ พบว่าไม่สามารถตรวจพบแถบของดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของไวรัสสาเหตุโรคได้ (ภาพ 10)



ภาพ 10 ผลการเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณกรดนิวคลีอิกของไวรัสจากการสกัดอาร์เอ็นเอทั้ง 4 วิธี

แถว M; ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

แถวที่ 1 และ 5; เสาวรสปกติ และ เสาวรสที่แสดงอาการของโรคเมื่อสกัดด้วยวิธีที่ 1: SDS-phenol ตามลำดับ

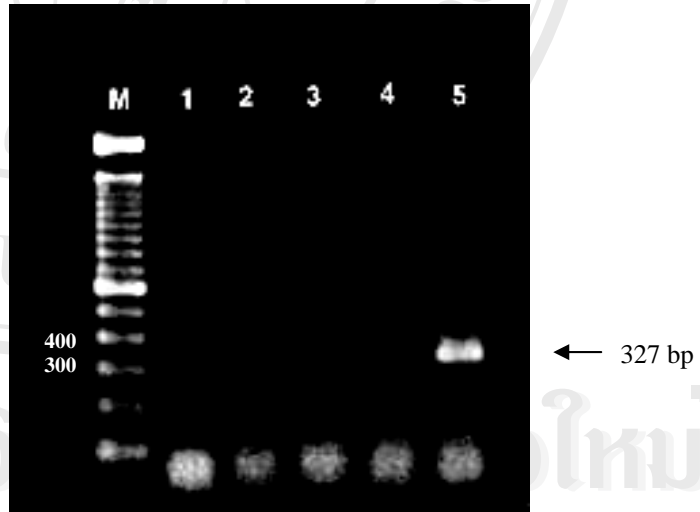
แถวที่ 2 และ 6; เสาวรสปกติ และ เสาวรสที่แสดงอาการของโรคเมื่อสกัดด้วยวิธีที่ 2: CF-11 cellulose ตามลำดับ

แถวที่ 3 และ 7; เสาวรสปกติ และ เสาวรสที่แสดงอาการของโรคเมื่อสกัดด้วยวิธีที่ 3: Guanidine thiocyanate ตามลำดับ

แถวที่ 4 และ 8; เสาวรสปกติ และ เสาวรสที่แสดงอาการของโรคเมื่อสกัดด้วยวิธีที่ 4: Plant RNA isolation kit ตามลำดับ

เมื่อนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ total RNA สูงสุดจากวิธีที่ 3 มาทำการศึกษา สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-PCR นั้น โดยทำการเปรียบเทียบความเข้มข้น ต่าง ๆ ขององค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา เช่น อาร์เอ็นเอแม่แบบใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.02, 0.2, 2, 20 และ 200 นาโนกรัม ความเข้มข้นของไพรเมอร์ตั้งแต่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 ไมโครโมลาร์ และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ใช้ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2 และ 3 มิลลิ-โมลาร์

ในการทดลองเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเริ่มต้นที่ใช้เป็นอาร์เอ็นเอ แม่แบบในการทำปฏิกิริยา RT-PCR พบว่าความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอที่ระดับ 200 นาโน-กรัม คือ ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอต่ำที่สุดที่สามารถตรวจพบการเพิ่มปริมาณกรด นิวคลีอิกของเชื้อสาเหตุโรคได้ด้วยเทคนิคดังกล่าว ในขณะที่ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ เริ่มต้นที่ระดับต่ำกว่านี้ คือ 20, 2, 0.2 และ 0.02 นาโนกรัมไม่สามารถตรวจพบการเพิ่ม ปริมาณของอาร์เอ็นเอได้ (ภาพ 11)



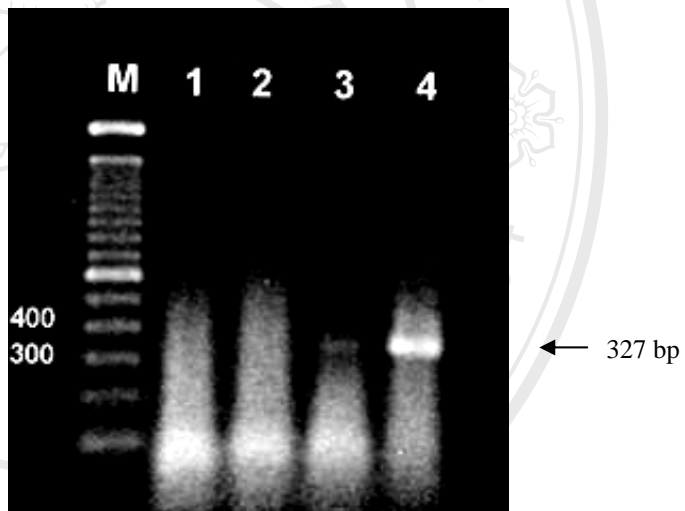
ภาพ 11 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอเริ่มต้นที่แตกต่างกันที่ใช้

เป็นองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา RT-PCR

แถว M; ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1-5 ; ความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอแม่แบบเท่ากับ 0.02, 0.2, 2, 20 และ 200 นาโนกรัม ตามลำดับ

ส่วนในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา RT-PCR นั้น พบว่าความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ระดับ 0.4 และ 0.6 ไมโครโมลาร์ ไม่สามารถตรวจพบแถบของดีเอ็นเอจากการเพิ่มปริมาณของกรดนิวคลีอิกได้ แต่ที่ระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ 0.8 ไมโครโมลาร์ สามารถตรวจพบแถบของดีเอ็นเอได้ แต่ลักษณะของแถบดีเอ็นเอไม่ชัดเจนมากนัก และพบว่าที่ความเข้มข้นของไพรเมอร์ 1.0 ไมโครโมลาร์ คือระดับความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่ดีที่สุดและเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาซึ่งให้แถบของดีเอ็นเอชัดเจน (ภาพ 12)



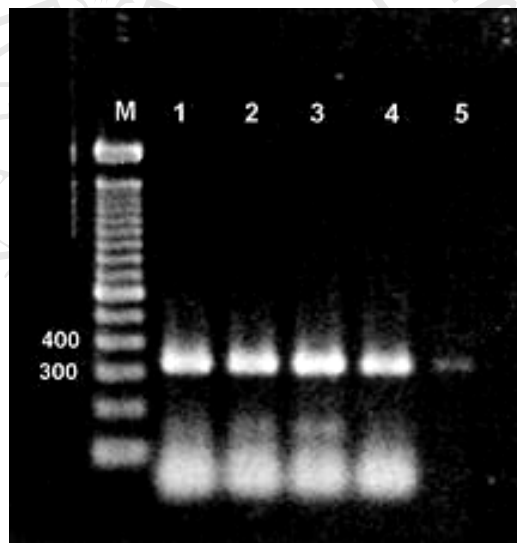
ภาพ 12 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่แตกต่างกันที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา RT-PCR

แถว M; ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1-4 ; ความเข้มข้นของไพรเมอร์ เท่ากับ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0

ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

ในการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยา RT-PCR พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองคือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 มิลลิโมลาร์ สามารถตรวจพบแถบของดีเอ็นเอ แต่ที่ความเข้มข้น 3.0 มิลลิโมลาร์ ให้ลักษณะแถบของดีเอ็นเอที่เจือจาง ไม่คมชัด เหมือนกับที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ ที่ใช้ในการทดลอง ดังนั้น $MgCl_2$ สามารถที่จะใช้ได้ตั้งแต่ 0.5-2.0 มิลลิโมลาร์ได้ (ภาพ 13)



ภาพ 13 ผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ $MgCl_2$ ที่แตกต่างกันที่ใช้เป็นองค์ประกอบในการทำปฏิกิริยา RT-PCR

แถว M; ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp DNA ladder

แถวที่ 1-4 ; ความเข้มข้นของ $MgCl_2$ เท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0

มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

4.4 การตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิต RT-PCR

เมื่อนำผลผลิตจากการทำปฏิกิริยา RT-PCR มาทำการตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ (ภาพ 14) มาเปรียบเทียบกับความเหมือนกับ *Potyvirus* ที่พบในเสาวรสจากข้อมูลใน GenBank จาก NCBI ที่มีรายงานจากประเทศต่าง ๆ ซึ่งพบว่า มี *Potyvirus* 2 ชนิด ที่พบในเสาวรสคือ PWV และ Cowpea aphid-borne mosaic virus ด้วยโปรแกรม clustalW พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มีความเหมือนกับ PWV มากกว่า โดยคล้ายกับ 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

เมื่อนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PWV-CM มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ PWV ที่มีรายงานไว้ใน GenBank จาก NCBI พบว่า PWV-CM มีความเหมือนกับ PWV-M2 และ Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate PE2 (Accession number AAR08937 และ AAP04516 ตามลำดับ) จากประเทศบราซิล 91 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวมีความเหมือนกับ PWV isolate University of Sydney (Accession number AAB8115) รายงานจากประเทศออสเตรเลีย 89 เปอร์เซ็นต์ และ PWV รายงานจากประเทศไต้หวันและญี่ปุ่น (Accession number AAG43495 และ BAA24530 ตามลำดับ) 86 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 16) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานของเชื้อสาเหตุจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และขนาดของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก ดังนั้น PWV-CM เป็นไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม *Potyvirus*

1: GTGTGGTGCATAGACAATGGAACCTTCACCAGATGTCAATGGCGTGTGGGTA
 V W C I D N G T S P D V N G V W V

52: ATGATGGACGGAGATGAACAAATTGAGTACCCACTCAAGCCAATGGTTGAA
 M M D G D E Q I E Y P L K P M V E

103: AATGCAAAGCCGACATTGAGACAAATCATGCATCACTTTTCAGATGCGGCT
 N A K P T L R Q I M H H F S D A A

156: GAAGCATAACATTGAAATGAGGAATTCTGAGGGACTGTACATGCCTAGGTAT
 E A Y I E M R N S E G L Y M P R Y

205: GGTCTTCTTAGGAACCTGAGGGACAAAAGTCTGGCGGATATGCATTGAT
 G L L R N L R D K S L A R Y A F D

256: TTCTATGAGGTCACCTCTAAGACGTCAGATAGAGCTAAAGAAGCTGTCACA
 F Y E V T S K T S D R A K E A V T

307: CAAATGAAAAGCCGCCCTTA
 Q M K A A A L

ภาพ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตัวอักษรปกติ) และการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโน (ตัวอักษรหนา)
 ของเชื้อไวรัสสาเหตุอาการไบบ่างของเสาวรส

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved

```

AF208662 GGTTCATGGTGTGGTGCATTGACAATGGCACTTCACCAAATGTTAATGGCACATGGGTA 960
D85849 GGTTCATGGTGTGGTGCATTGACAATGGCACTTCACCAAATGTTAATGGCACATGGGTA 922
U67150 GGTTCATGGTTTGGTGCATAGATAATGGAACCTTCACCTGATATAAATGGAGTCTGGGTA 441
AY433952 AGGTTTCATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTTCACCTGATGTAATGGAGTGTGGACC 420
AY253906 GGGTTCATGGTTTGGTGCATTGAAAATGGAACCTTCACCTGATGTGAATGGGGTGTGGACC 448
PWV-CM -----GTGTGGTGCATAGACAATGGAACCTTCACCAGATGTCAATGGCGTGTGGGTA 51
          ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** * ***** ***

AF208662 ATGATGGACGGAGAAGAACAATTGAATACCCATTGAAGCCGTTAGTTGAAAATGCCAG 1020
D85849 ATGATGGACGGAGAAGGACAATTGAATACCCATTGAAGCCGTTAGTTGAAAATGCCAG 982
U67150 ATGATGGATGGGGACGAACAAGTTGAATACCCCTCAAACCAATGGTTGAAAATGCAAAG 501
AY433952 ATGATGGATGGGGATGAACAAGTGAATTTCCGCTCAAACCCATCGTGGAAAACGCAAAA 480
AY253906 ATGATGGATGGGGATGAGCAAGTGAATTTCCGCTCAAACCCATCGTGGAGAATGCAAAA 508
PWV-CM ATGATGGACGGAGATGAACAATTGAGTACCCACTCAAGCCAATGGTTGAAAATGCAAAG 111
          ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AF208662 CCAACATTGAGACAAATTATGCATCACTTTTCAGATGCGGCTGAGGCATACATTGAGATG 1080
D85849 CCAACATTGAGACAAATTATGCATCACTTTTCAGATGCGGCTGAGGCATACATTGAGATG 1042
U67150 CCCACTCTCAGACAAATAATGCACCACCTTCTCAGATGCAGCTGAAGCGTACATTGAGATG 561
AY433952 CCCACACTCAGACAAATTATGCACCACCTTCTCAGACGCAGCTGAAGCGTATATTGAGATG 540
AY253906 CCCACACTCAGGCAAATTATGCACCATTTCTCAGACGCAGCTGAAGCGTATATTGAGATG 568
PWV-CM CCGACATTGAGACAAATCATGCATCACTTTTCAGATGCGGCTGAAGCATACATTGAAATG 171
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AF208662 AGAAATTCAAAGAGCCGTATATGCCTAGATATGGTACTCTGAGGAATTTGAGGGACTTG 1140
D85849 AGAAATTCAAAGAGCCGTATATGCCTAGATATGGTACTCTGAGGAATTTGAGGGACTTG 1102
U67150 AGATGCGCAAGTGGTCCCTACATGCCTAGGTATGGATTACTGCGTAATTTGAGGGACAAG 621
AY433952 AGAAATTCTGAAGGGTTCTACATGCCAGGTATGGACTGCTGAGGAATTTAAGAGACAAG 600
AY253906 AGAAATTCCGAAGGGTTCTACATGCCAGGTATGGACTACTGAGGAATTTAAGAGACAAG 628
PWV-CM AGGAATTTCTGAGGGACTGTACATGCCTAGGTATGGTCTTCTTAGGAACCTGAGGGACAAA 231
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AF208662 AGTTTGGCGAGGTATGCTTTTGATTCTATGAAGTAACCTCCAAGACGCCTAACAGAGCA 1200
D85849 AGTTTGGCGAGGTATGCTTTTGATTCTATGAAGTAACCTCCAAGACGCCTAACAGAGCA 1162
U67150 AATTTAGCGCGGTATGCATTTGACTTCTATGAAGTTAATGCTAAGACTTCTGATCGTGCT 681
AY433952 AGCTTAGCAAGGTATGCTTTTCGATTTCTATGAAGTACAGTCTAAGACTTCTGATAGAGCA 660
AY253906 AGCTTGGAAGGTACGCTTTTCGATTTCTATGAGGTACATCTAAGACTTCTGACAGAGCA 688
PWV-CM AGTCTGGCGGATATGCATTCGATTTCTATGAGGTACCTCTAAGACGTCAGATAGAGCT 291
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

AF208662 AGAGAAGCGGTAGCTCAAATGAAAGCCGCTGCCCTCGCGAACGTTTCTACTAGGTTGTTT 1260
D85849 AGAGAAGCGGTAGCACAAATGAAAGCCGCTGCCCTCGCGAACGTTTCTACTAGGTTGTTT 1222
U67150 CGAGAAGCAGTGGCACAGATGAAGGCTGCAGCCCTCAGTAATGTGACCAACAAGTTGTTT 741
AY433952 AGGGAAGCAATAGCACAAATGAAGGCTGCAGCTCTCGCCAACGTTAACACCAGGATGTTT 720
AY253906 AGGGAAGCAATAGCGCAGATGAAGGCTGCAGCTCTCGCCAACATTAACACCAGGATGTTT 748
PWV-CM AAAGAAGCTGTACACAAATGAAAGCCGCCCTTA----- 327
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

ภาพ 15 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ PWV-CM กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสที่เข้าทำลายเสาวรศ ที่มีรายงานจากประเทศต่าง ๆ

- Accession no. AF208662 คือ PWV รายงานจากประเทศไต้หวัน มีความ
เหมือนกับ PWV-CM 81 เปอร์เซ็นต์
- „ D85849 คือ PWV รายงานจากประเทศญี่ปุ่น มีความเหมือนกับ
PWV-CM 81 เปอร์เซ็นต์
- „ U67150 คือ PWV isolate University of Sydney รายงานจาก
ประเทศออสเตรเลีย มีความเหมือนกับ PWV-CM 78 เปอร์เซ็นต์
- „ AY433952 คือ PWV-M2 รายงานจากประเทศบราซิล มีความ
เหมือนกับ PWV-CM 77 เปอร์เซ็นต์
- „ AY253906 คือ Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate PE2
รายงานจากประเทศบราซิล มีความเหมือนกับ PWV-CM
75 เปอร์เซ็นต์

* คือ ตำแหน่งที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน

```

AAR08937 RFMVWCIENGTSPDVNGVWVTMMDGDEQVEFPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEM 180
AAP04516 GFMVWCIENGTSPDVNGVWVTMMDGDEQVEFPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEM 189
AAB8115 GFMVWCIENGTSPDINGVWVTMMDGDEQVEFPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEM 187
AAG43495 GFMVWCIENGTSPNVNGTWVMMDGEGQIEYPLKPLVENAQPTLRQIMHHFSDAAEAYIEM 360
BAA24530 GFMVWCIENGTSPNVNGTWVMMDGEGQIEYPLKPLVENAQPTLRQIMHHFSDAAEAYIEM 347
PWV-CM ---VWCIENGTSPDVNGVWVTMMDGDEQIEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDAAEAYIEM 57
      ****:*****:.*. *.*****: *:*:*****:*****:*****:*****
AAR08937 RNSEGFYMPRYGLLRNLRDKSLARYAFDFYEVTSKTSDRAREAIAQMKAALANVNTRMF 240
AAP04516 RNSEGFYMPRYGLLRNLRDKSLARYAFDFYEVTSKTSDRAREAIAQMKAALANINTRMF 249
AAB8115 RCASGPYMPRYGLLRNLRDKNLARYAFDFYEVNAKTSDRAREAVAQMKAALSNVTNKL 247
AAG43495 RNSKEPYMPRYGTLRNLRLDLARYAFDFYEVTSKTPNRAREAVAQMKAALANVSTRLF 420
BAA24530 RNSKEPYMPRYGTLRNLRLDLARYAFDFYEVTSKTPNRAREAVAQMKAALANVSTRLF 407
PWV-CM RNSEGLYMPRYGLLRNLRDKSLARYAFDFYEVTSKTSDRAREAVAQMKAAL----- 109
* :. ***** ***** .***** *:*:*****:*****:*****

```

ภาพ 16 การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการแปลรหัสลำดับ
นิวคลีโอไทด์ของ PWV-CM กับลำดับกรดอะมิโนของไวรัสที่เข้าทำลายเสาวรสที่มี
รายงานจากประเทศต่าง ๆ

Accession no. AAR08937 คือ PWV-M2 รายงานจากประเทศบราซิล มีความ
เหมือนกับ PWV-CM 91 เปอร์เซ็นต์

„ AAP04516 คือ Cowpea aphid-borne mosaic virus isolate
PE2 รายงานจากประเทศบราซิล มีความเหมือนกับ PWV-CM 91
เปอร์เซ็นต์

„ AAB8115 คือ PWV isolate University of Sydney
รายงานจากประเทศออสเตรเลีย มีความเหมือนกับ PWV-CM
89 เปอร์เซ็นต์

„ AAG43495 คือ PWV รายงานจากประเทศไต้หวัน มีความ
เหมือนกับ PWV-CM 86 เปอร์เซ็นต์

„ BAA24530 คือ PWV รายงานจากประเทศญี่ปุ่น มีความเหมือนกับ
PWV-CM 86 เปอร์เซ็นต์

* คือ ตำแหน่งที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกัน