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

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดทั้ง 2 strain (PMWaV-1 และ PMWaV-2) ในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยอาศัยเทคนิค Multiplex RT-PCR เริ่มจากการออกแบบไพรเมอร์บริเวณ (1) Heat shock protein gene (HS) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_HS_M_F และ PM1_HS_M_R ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 635 คู่เบส และ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_HS_M_F และPM2_HS_M_R ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 380 คู่เบส (2) บริเวณ Coat protein gene (CP) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_CP_M_F และ PM1_CP_M_R ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 428 คู่เบส และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_CP_M_F และ PM2_CP_M_R ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 727 คู่เบส หลังจากการสกัดอาร์เอ็นเอ ของเชื้อ PMWaV-1 และ PMWaV-2 จากใบสับปะรดเป็นโรคโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป แล้วนำมาทดสอบและปรับระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิให้เหมาะสมในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ cDNA โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับระยะ annealing ของ HS gene คือ 60 °ซ และ CP gene คือ 62 °ซ จากการทดสอบการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้จากยีน HS และ CP โดยเทคนิค multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ PMWaV-1 และ PMWaV-2 เพียง strain เดียว โดยเทคนิค RT-PCR ปรากฏว่า ให้ผลวิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis ตรงกัน

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-04-54

คำนำ

สับปะรดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย สามารถปลูกและเก็บผลผลิตได้ตลอดปี เพื่อใช้บริโภคสดภายในประเทศและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆมีมูลค่าส่งออกประมาณปีละ 13,000-15,000 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 โดยมีพื้นที่ปลูกสับปะรดเป็นอันดับ 1 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 ได้เป็นอย่างดี Lorenzen และคณะ (2006) 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 ชุดของไพรเมอร์ ประกอบด้วย upstream primer ที่พบในทั้ง 2 ไวรัส ส่วนอีก 2 downstream primer มีความจำเพาะกับไวรัสแต่ละชนิด โดยออกแบบไพรเมอร์ที่มีขนาดนิวคลีโอไทด์ 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 ฉะนั้นการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวทั้ง 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 โดยออกแบบไพรเมอร์บริเวณ

1.1 Heat shock protein gene (HS) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_HS_M_F และ PM1_HS_M_R สำหรับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_HS_M_F และPM2_HS_M_R (รูปที่ 1)

1.2 Coat protein gene (CP) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_CP_M_F และ PM1_CP_M_R สำหรับไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_CP_M_F และ PM2_CP_M_R (รูปที่ 1)

Primer	Sequence (5'-3')	Position	Gene	Virus strain
PM1_HS_M_F	CCACTCTGTGTTTCTCTCCAGG	37	HS	PMWaV-1
PM1_HS_M_R	CTCCCAGATAGTTATCTCCCATCG	672	HS	PMWaV-1
PM2_HS_M_F	CAAGGACGGGTCGGTAATGCTAG	59	HS	PMWaV-2
PM2_HS_M_R	CCAACGCTAAACAGTACGCATACC	439	HS	PMWaV-2
PM1_CP_M_F	CTAATGCACACAAGGTGATAGGATC	218	CP	PMWaV-1
PM1_CP_M_R	GCATCATCACCGTGTACTCTGGC	647	CP	PMWaV-1
PM2_CP_M_F	CGTAGCCGTAGTAGAAGGCAC	15	CP	PMWaV-2
PM2_CP_M_R	GAACTGCTTGGGTACTCCGTG	742	CP	PMWaV-2

ตารางที่ 1. รายละเอียดของไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน Heat shock protein (HS) และยีน Coat protein (CP) ให้มีความจำเพาะกับไวรัสแต่ละ strain (PMWaV-1 และ PMWaV-2)

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 แล้วพลิกหลอดขึ้นลง 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 และ coat protein gene ที่มีความจำเพาะกับไวรัส PMWaV แต่ละ strain และใช้ชุดสารเคมีของ QIAGEN OneStep RT-PCR ในการเพิ่มปริมาณ complementary DNA (cDNA) โดยมีปฏิกิริยา ดังนี้

5X QIAGEN OneStep RT-PCR buffer	4.0 ไมโครลิตร
dNTP 10 uM (2.5 uM each)	0.8 ไมโครลิตร
Primer PM1_HS_M_F (10 uM)	1.2 ไมโครลิตร
Primer PM1_HS_M_R (10 uM)	1.2 ไมโครลิตร

Primer PM2_HS_M_F (10 uM)	1.2 ไมโครลิตร
Primer PM2_HS_M_R (10 uM)	1.2 ไมโครลิตร
Enzyme Reverse Transcriptase Hot StarTaq DNA Polymerase	0.8 ไมโครลิตร
dH_2O (RNase-free water)	11.0 ไมโครลิตร
Template (RNA)	1.0 ไมโครลิตร
รวม	**20.0** ไมโครลิตร

นำหลอดที่ผสมปฏิกิริยามาใส่ในเครื่อง Thermal cycler เพื่อสังเคราะห์ cDNA ตาม program ดังนี้

	OneStep RT-PCR	**Profile**	
	50 °ซ	30 นาที	
	95 °ซ	15 นาที	
Denaturing	94 °ซ	45 วินาที	} 35 รอบ (cycle)
Annealing	60,62 °ซ*	45 วินาที	
Extension	72 °ซ	1 นาที	
	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 โดยการเติม PCR product ต่อ PEG (26.2% Polyethylene glycol 8000, 6.6 mM $MgCl_2$, 0.6 M sodium acetate) อัตรา 1 : 1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 -30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ PCR product อีกครั้ง จากนั้นนำมาเชื่อมต่อเข้าเวคเตอร์ pGEM-T-Easy และ heat shock เข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (DH5α) และคัดเลือกโคโลนีบนอาหาร 2xYT + ampicillin + IPTG + Xgal เลือกเฉพาะโคโลนีสีขาว เพื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารเหลว 2xYT จากนั้นสกัดพลาสมิดออกทำการสกัดพลาสมิดวิธี Alkaline lysis แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR พร้อมทั้งส่งตัวอย่างไปตรวจสอบลำดับเบส

4. ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับตัวอย่างพืชที่เก็บจากแปลงสับปะรด

โดยนำตัวอย่างสับปะรดที่เป็นโรคเหี่ยวมาแยกสกัดอาร์เอ็นเอ (ตามวิธีข้อ 2) แล้วเพิ่มปริมาณ cDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้จากยีน HS และ CP ด้วยเทคนิค multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ PMWaV-1 และ PMWaV-2 เพียง strain เดียว ด้วยเทคนิค

RT-PCR ได้แก่ ไพรเมอร์ Pa222-F1 (5’ACAGGAAGGACAACACTCAC-3’) และ Pa223-R1 (5’-CG CCAAACTTCAAGCAATC-3’) เพื่อตรวจหาไวรัส PMWaV-1 ส่วนไวรัส PMWaV-2 ใช้ไพรเมอร์ Pa224-F2 (5’-CATACGAACTAGACTCATACG-3’) และ Pa225-R2 (5’-CCATCCACCAATTTTAC TAC-3’) (วันเพ็ญ และคณะ, 2553)

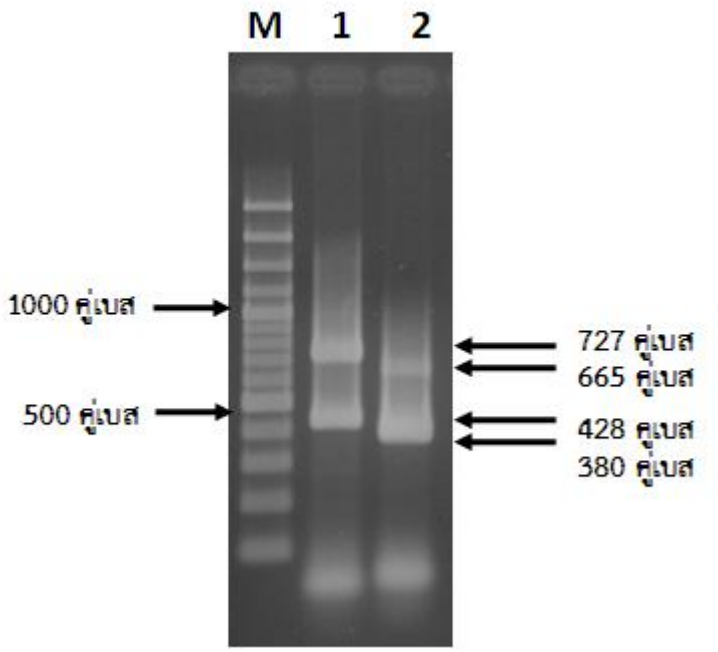
เวลาและสถานที่ ระยะเวลา ตุลาคม 2553 – กันยายน 2555
สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ออกแบบไพรเมอร์

ออกแบบไพรเมอร์ บริเวณ Heat shock protein gene ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_HS_M_F : 5’ CCACTCTGTGTTTCTCTCCAGG 3’ และ PM1_HS_M_R : 5’CTCCCAGATA GTTATCTCCCATCG 3’ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 635 คู่เบส และ ไพรเมอร์บริเวณ heat shock gene ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_HS_M_F: 5’ CAAGGA CGGGTCGGTAATGCTAG 3’ และPM2_HS_M_R : 5’ CCAACGCTAAACAGTA CGCATACC 3’ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 380 คู่เบส (รูปที่ 1)

สำหรับการออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ Coat protein gene ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_CP_M_F : 5’ CTAATGCACACAAGGTGATAGGATC 3’ และ PM1_CP_M_R : 5’GCATCA TCACCG TGTACTCTGGC 3’ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 428 คู่เบส และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_CP_M_F: 5’ CGTAGCCGTAGTAGA AGGCAC 3 และ PM2_CP_M_R : 5’ GAACTGCTTGGGTACTCC GTG 3’ ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 727 คู่เบส (รูปที่ 1)



รูปที่ 1. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 ของสับปะรดโดยเทคนิค Multiplex RT-PCR

M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder, Fermentas)

1 : ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน Heat shock protein

2 : ใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน Coat protein

2. ทดสอบและปรับระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิให้เหมาะสมในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ cDNA โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR

ผลการทดลอง พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับระยะ annealing ของ Heat shock gene คือ 60 °ซ และ Coat protein gene คือ 62 °ซ หลังจากนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ แล้วเชื่อมต่อเข้าเวคเตอร์ pGEM-T-Easy และ heat shock เข้าเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* (DH5α) และคัดเลือกโคโลนีบนอาหาร 2xYT +ampicillin +IPTG + Xgal เพื่อนำไปเลี้ยงเพิ่มปริมาณบนอาหารเหลว 2xYT จากนั้นสกัดพลาสมิดออก แล้วนำไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยเทคนิค PCR พร้อมทั้งส่งตัวอย่างไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่า ลำดับเบสตรงตามที่ออกแบบไว้ (รูปที่ 2)

ลำดับเบสของไวรัส PMWaV-1 จากจีโนมของ Coat protein gene (665 คู่เบส)

ATGGCTGATTCGAGCAAACAAAAACAACCTGAACATGCTGACTCTGGGCCTAAGACAGTGGAAGACCAAGTCAAGGAAATAATGAA
CCTACCTGTGCCGGGAGGTAGGACTACTGTGTCGACGTTTGAAGATTTGATAGCAGCCGAAAATGCTATAATTGATTTCACCAAGG
TTGATGTACCACGCATGATTAACGTTCCGATCCCAGGAATAGTTACTAATGCACACAAGGTGATAGGATCCAAAGCTCTGTGGGAG
TTGGGTAAATCGAAGGGTATATCAGAATCGGCGAAACACATGATCCAATTTTTGATGCAATCTTTCCAAGATATGTGCACCTTTTCT
ACATCACCGAAAGTTTCGGCGACTCAGAACTACTCCACCACAGCTAAGTATGATGGTAAAGATGTTAACGTCACGCACGAGGAGAT
CAGAATTGCTTTGAGCAACTCACTATCCAATTTGGGATACGATAATCCTATGAGACAGTTTGGGAGAGGTTTTACTTCCACAATTGT
TCAAGGACTGAGTTCTGGGAAGTTGGTGGTTAACACTAGGATATGTACTAAGAACGGAGTACCGAGGAATTATTACTCGTTCTATC
CAGATTGCTTACACGTAGAAGCCAGAGTACACGGTGATGATGCAGCGTTGGTAAGTGAGTTAGCCAGAATGGTAGCCATAAACAGA
GCAAACTCGAGTGGTTCTGGCGAACACAACGTCTTTGAGAAGACGGCTGTGTCCCCGCACATCTTTATGGGTGGACGCAAATAA

ลำดับเบสของไวรัส PMWaV-2 จากจีโนมของ Coat protein gene (803 คู่เบส)

ATGGCTCAGAATTACGTAGCCGTAGTAGAAGGCACTATTCTCGAAAGTTTGACGGCTCCACCTAAACGATTTAGAGTGGCGACGTC
TGATGTGGGGAAATATTACGATAGTAGCAAATACNCGCTCTGTAACGGGCGTAGCTACAGCCGAGAGGGATCGGTTACCAGCGATA
GAGGAAACTGAACTATTGGCAACAATCCCAACGGAAGCTTCAACAGATAAGGGTGTTATTCCTGAGACTGTTAAGAGGTCGAGTAA
TAAACCAGAAATAGTAGATGATGTATCAACGTTGCTGTTAAATCCTAGAAAGAACGTTGTACTAAATATTGGATCGGTTAAAACCGT
GCCAAAGGTAGTTAATCAGCCGGGTTTGATATCCCGGGAGATTGCTATCCGTATAGGAGAGGCTCTGAAGGAACATTGCAAACAAG
TTATGGGTTCGGATAGTAGTACGGACTTAGCTACATACTTTATACATTTGATTCAACTCGCTATTACGTTTTCTACATCCAAAAATA
GCGAATACAAAGAGTTTGACTATATAGAAACAGAGACGCAAAAGAAAATATACATCAAGGACGTGAGTGAGGTGGTTGAGAGAGCG
GCGATGAATTCGGGGTACGAAAACCCGTTTAGGCAATATATGCGTTATTTTACAAGCTCGAGTATAACACTAACTTTAAATGGTAAA
ATAACACCTAACGAGAGAACTATGGCTCATCACGGAGTACCCAAGCAGTTCTTTGCATATACTTACGATTTTATTGACCCCGACTA
TAGCCTCATGAATCATTCGGCGATTAATGCTTACAACTTAGCGAGGATTCAAGCATTTAAGAATAAGATAGCTTCAGTGAACAATAC
TATGCATAACACATACCAGCTGAACCAGGGAGCTGTTTCAGGGTAG

ลำดับเบสของไวรัส PMWaV-1 จากจีโนมของ Heat shock protein gene (690 คู่เบส)

ATGGAGGTGGGTATTGATTTTGGCACCACCTATTCCACTCTGTGTTTCTCTCCAGGTAAAGGAAATGATGGTTGTGTGGTAGAGAGTG
ACACGATATTTATACCTACTGTCGTTGGTTACAGGAAGGACAACACTCACGCCATAGGTTTGGGGGCACTGTTGGAAAAAGACTTAGA
GGTTTATCGTGATATAAAAAGGTATTTCGGACTCAACAAGTTCAACAAAGATGTGTATCTCGATAAATTGAAACCCACAATCGAGGTA
GTGATTGACGACTGGGGTTGTTCTATAGGACCAGTAGACGGTGCGAGAGGGAAAGCCAAATCAGTTCTCACTTTAGCCTCTGATTTTA
TAACGGGATTGGTACAACTAGCGATCAAGATGACGAATCAACAAGTATCTGTGTCTGTTTGTTCAGTACCAGCAGCTTACAATTCTTAT
CAAAGGAGTTTTATTTTTGAAAGTTGTAAGTTGAGCTCTATAAATGTGCAGGCGGTAGTAAACGAACCGACCGCAGCTGGATTGAGTG
CTTTCATAACTACCCCGAAAGCTTCTGTGAATTATTTGTTAGTCTACGATTTCGGAGGAGGCACTTTTGATAGTTCCTTACTCGTGGTT
GGGCCTGCGTACGTGGGAGTACTGGATTCGATGGGAGATAACTATCTGGGAGGCAGGGACGTAGATAACA

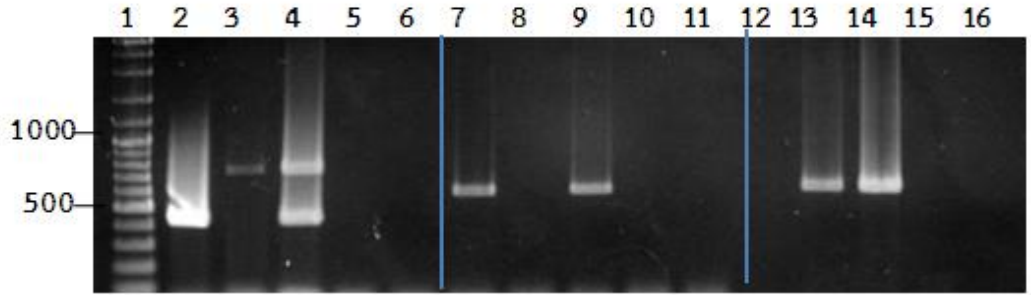
ลำดับเบสของไวรัส PMWaV-2 จากจีโนมของ Heat shock protein gene (610 คู่เบส)

CATACGAACTAGACTCATACGTGCTAAAATTAAAACCAGTGCACAGAGTGGAAGTGTTCAAGGACGGGTCGGTAATGCTAGGGGGTAT
TGGTGAAGGCCCTGATAGGACGGTCTCTGTAACGGATATCATATCCCTTTTTTCTAAAGCACTTATAAAGGAAGCGGAACAGTCTACT
GGACTACGCGTAACGGGTGCGGTGGTAACGGTACCAGCCGACTACAACTCTTTTAAACGTAGTTTTATAACTAACTGCATGAAAGACT
TGGGTATTCCAGTAAGGGCTATAGTAAATGAACCGACCGCTGCAGCGTTATATTCTTTATCTATATTACAAGAAAAGGATTTATTTCTG
TCTGTTTTTGACTTTGGTGGAGGGACGTTTGATGTGTCTTTTGTTAGAAAACTCGGAGATGTGGTATGCGTACTGTTTAGCGTTGGCG
ATAACTTTTTAGGGGGAAGGGATATCGACAGGGCGGTAGCAGCTGAGGTGAAGGCAAGAGTGGGCGAATCTATTGATACAGCTACATT
GTCATTATTTGCAGCGTCTATTAAAGAGGAGGTGACTAATGAGCCGAGGGCAAAGACGCACGTAGTAAAATTGGTGGATGG

รูปที่ 2. ลำดับเบสของไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 จากจีโนมของ Coat protein gene และ Heat shock protein gene

3. ทดสอบความเฉพาะเจาะจงของไพรเมอร์กับตัวอย่างพืชที่เก็บจากแปลงสับปะรด

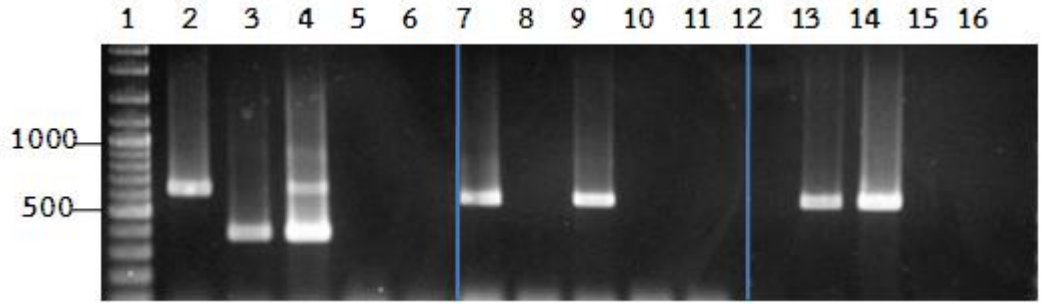
การเปรียบเทียบการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้จากยีน HS และ CP กับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ PMWaV-1 และ PMWaV-2 เพียง strain เดียว ได้แก่ ไพรเมอร์ Pa222-F1 และ Pa223-R1 เพื่อตรวจหาไวรัส PMWaV-1 ส่วนไวรัส PMWaV-2 ใช้ไพรเมอร์ Pa224-F2 และ Pa225-R2 จากตัวอย่างสับปะรดเป็นโรค ปรากฏว่า ผลการวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis เกิดแถบ (band) ของ PCR product จากการใช้ไพรเมอร์แบบ multiplex PCR ทั้งจากยีน Coat protein (PMWaV-1 = 428 คู่เบส, PMWaV-2 = 727 คู่เบส) และยีน Heat shock protein (PMWaV-1 = 635 คู่เบส, PMWaV-2 = 380 คู่เบส) ผลตรงกับการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ PMWaV แต่ละ strain (PMWaV-1 = 589 คู่เบส, PMWaV-2 = 609 คู่เบส) (รูปที่ 3) ฉะนั้นสามารถเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน CP หรือ HS ในการตรวจไวรัสโรคเหี่ยวสับปะรดทั้ง 2 strain โดยใช้เทคนิค multiplex PCR ซึ่งช่วยประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายได้เป็นอย่างดี



Multiplex RT-PCR (CP gene) RT-PCR RT-PCR

(PMWaV-1= 428 คู่เบส) (PMWaV-1= 589 คู่เบส) (PMWaV-2= 609 คู่เบส)

(PMWaV-2= 727 คู่เบส)



Multiplex RT-PCR (HS gene) RT-PCR RT-PCR

(PMWaV-1= 428 คู่เบส) (PMWaV-1= 589 คู่เบส) (PMWaV-2= 609 คู่เบส)

(PMWaV-2= 727 คู่เบส)

รูปที่ 3. ผลวิเคราะห์การตรวจสอบดีเอ็นเอของไวรัส PMWaV-1 และ PMWaV-2 ของสับปะรดโดยเทคนิค Multiplex RT-PCR (ไพรเมอร์ที่ออกแบบจากยีน HS และ CP) และ RT-PCR (ไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ PMWaV-1 และ PMWaV-2 เพียง strain เดียว)

1 : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp. DNA Ladder, Fermentas)

2, 7, 12 : ใบสับปะรดที่เกิดจากไวรัส PMWaV-1

3, 8, 13 : ใบสับปะรดที่เกิดจากไวรัส PMWaV-2

4, 9, 14 : ใบสับปะรดที่เกิดจากไวรัส PMWaV-1+PMWaV-2

5, 10, 15 : ใบสับปะรดปลอดโรค

6, 11, 16 : น้ำ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยวสับปะรดทั้ง 2 strain (PMWaV-1 และ PMWaV-2) ในปฏิกิริยาเดียวกัน โดยอาศัยเทคนิค Multiplex RT-PCR โดยการออกแบบไพรเมอร์บริเวณ (1) Heat shock protein gene (HS) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_HS_M_F : 5' CCACTCTGTGTTTCTCTCCAGG 3' และ PM1_HS_M_R : 5' CTCCCAGA TAGTTATCTCCC ATCG 3' ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 635 คู่เบส และ ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_HS_M_F: 5' CAAGGACGGGTCGGTAATGCTAG 3' และ PM2_HS_M_R : 5' CCAA CGCTAAACAGTA CGCATACC 3' ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 380 คู่เบส (2) ออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณ Coat protein gene (CP) ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-1 ได้แก่ PM1_CP_M_F : 5' CTAATGCACACAAGGTGATAGGATC 3' และ PM1_CP_M_R : 5'GCATCA TCACCG TGTACTCTGGC 3' ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 428 คู่เบส และไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อไวรัส PMWaV-2 ได้แก่ PM2_CP_M_F: 5' CGTAGCCGTAGTAGA AGGCAC 3 และ PM2_CP_M_R : 5' GAACTGCTTGGGTACTCC GTG 3' ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอขนาด 727 คู่เบส จากนั้นการสกัด อาร์เอ็นเอ ของเชื้อ PMWaV-1 และ PMWaV-2 จากใบสับปะรดเป็นโรค โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูป (MasterPure^{TM}RNA Purification Kit ของบริษัท EPICENTRE) แล้วนำมาทดสอบและปรับระยะเวลารวมทั้งอุณหภูมิให้เหมาะสมในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ cDNA โดยเทคนิค Multiplex RT-PCR พบว่า อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ได้แก่ เริ่มจาก 50 ^{o}C นาน 30 นาที เพื่อสังเคราะห์ cDNA จากนั้นเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR เริ่มจาก 95 ^{o}C นาน 30 นาที, (94 ^{o}C นาน 45 วินาที , 60 ^{o}ซ (HS) หรือ 62 ^{o}ซ (CP) นาน 45 วินาที , 72 ^{o}C นาน 60 วินาที) รวม 35 รอบตามด้วย 72 ^{o}C นานอีก 10 นาที 25 ^{o}C นานอีก 15 นาที หลังจากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของชิ้นดีเอ็นเอด้วยวิธี gel electrophoresis แล้วส่งไปตรวจสอบลำดับเบส พบว่า ลำดับเบสตรงตามที่ออกแบบไว้ จากการเปรียบเทียบการใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบไว้จากยีน HS และ CP โดยเทคนิค multiplex RT-PCR เปรียบเทียบกับไพรเมอร์ที่ใช้ตรวจสอบ PMWaV-1 และ PMWaV-2 เพียง strain เดียว โดยเทคนิค RT-PCR ปรากฏว่า ให้ผลวิเคราะห์ด้วยวิธี gel electrophoresis ตรงกัน ฉะนั้นการใช้เทคนิค multiplex PCR ในการตรวจไวรัสมากกว่า 1 strain ในพืชต้นเดียวกันเป็นการช่วยประหยัดเวลาและค่าสารเคมีซึ่งมีราคาแพงในการตรวจได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดขั้นตอนการตรวจหน่อสับปะรดว่าปลอดไวรัสทั้ง 2 strain หรือไม่ ก่อนจะนำไปปลูกหรือขยายพันธุ์ปลอดโรคต่อไป ซึ่งเป็นแนวทางช่วยลดการระบาดของโรคเหี่ยวสับปะรดในแปลงปลูก

เอกสารอ้างอิง

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

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

วันเพ็ญ ศรีทองชัย มัลลิกา นวลแก้ว สาวิตรี เขมวงศ์ และ เขมิกา โขมพัตร. 2553. การคัดเลือกและขยายหน่อพันธุ์สับปะรดปลอดไวรัสสาเหตุโรคเหี่ยว. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เล่ม 4: 2664-2675.

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.

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.