



รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล

MOLECULAR DIAGNOSIS OF POTATO VIRUS DISEASES

โดย

พิภัทร เจียมพริยะกุล



The background of the slide features a large, faint watermark of the Mahachulalongkornrajavidyalaya University logo. The logo is circular, containing a central figure (likely a deity or royal figure) surrounded by Thai script and the English words "MAHACHULALONGKORAJAVIDYALAYA UNIVERSITY".

รายงานผลการวิจัย

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล
MOLECULAR DIAGNOSIS OF POTATO VIRUS DISEASES

การ จัดสรรงบประมาณวิจัย	ประจำปี 2551	จำนวน	บาท
การจัดสรรงบดำเนินงาน	ประจำปี 2552	จำนวน	บาท



รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล
MOLECULAR DIAGNOSIS OF POTATO VIRUS DISEASES

การจัดสรรงบประมาณวิจัย	ประจำปี 2551	จำนวน 423,000 บาท
	ประจำปี 2552	จำนวน 440,000 บาท



รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล
MOLECULAR DIAGNOSIS OF POTATO VIRUS DISEASES

การจัดสรรงบประมาณวิจัย	ประจำปี 2551	จำนวน 423,000 บาท
	ประจำปี 2552	จำนวน 440,000 บาท

The background of the slide features a large, faint watermark of the Mahachulalongkornrajavidyalaya University logo. The logo is circular, with the university's name in Thai script 'มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรญาณอุบล' at the top and 'MAHACHULALONGKORAJAVIDYALAYA UNIVERSITY' at the bottom. In the center is a depiction of a seated Buddha figure.

รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล
MOLECULAR DIAGNOSIS OF POTATO VIRUS DISEASES

การจัดสรรงบประมาณวิจัย	ประจำปี 2551	จำนวน 423,000 บาท
	ประจำปี 2552	จำนวน 440,000 บาท

The background of the slide features a large, faint watermark of the Mahachulalongkornrajavidyalaya University logo. The logo is circular, with the university's name in Thai script 'มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรญาณอุบล' at the top and 'MAHACHULALONGKORAJAVIDYALAYA UNIVERSITY' at the bottom. In the center is a depiction of a seated Buddha figure.

รายงานผลการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล
MOLECULAR DIAGNOSIS OF POTATO VIRUS DISEASES

การจัดสรรงบประมาณวิจัย	ประจำปี 2551	จำนวน 423,000 บาท
	ประจำปี 2552	จำนวน 440,000 บาท



รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล
MOLECULAR DIAGNOSIS OF POTATO VIRUS DISEASES

การจัดสรรงบประมาณวิจัย	ประจำปี 2551	จำนวน 423,000 บาท
	ประจำปี 2552	จำนวน 440,000 บาท

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล

MOLECULAR DIAGNOSIS OF POTATO VIRUS DISEASES

พิภัทร เจียมพิริยะกุล
PIPAT CHIAMPIRIYAKUL

ภาควิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้ ก็เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสสำคัญที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง โดยอาศัยเทคนิควิธีการของ reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) ซึ่งโครงการวิจัยฯ ประสบผลสำเร็จในการพัฒนาการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) โดยอาศัยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุลของ RT-PCR

โครงการวิจัยฯ ได้ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างใบของมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัสได้จำนวน 1,120 ตัวอย่าง จากแปลงเพาะปลูกของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และตาก ซึ่งเป็นจังหวัดในภาคเหนือ และจากโรงเรือนเพาะปลูกพืชทดลองของโครงการ ในช่วงเวลาตั้งแต่เดือนธันวาคม 2550 ถึงเดือนกรกฎาคม 2552 โดยทำการตรวจวินิจฉัยในเบื้องต้นและตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อไวรัส ด้วยดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดไวรัสในวิธีการ RT-PCR ในปีแรกของการศึกษา-วิจัย (ตค 2550 – กย 2551) นั้น โครงการวิจัยฯ ดำเนินการศึกษา-วิจัย ระบบ RT-PCR ที่เหมาะสมและสามารถประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบไวรัส 5 ชนิด ของมันฝรั่ง โดยได้มีการพัฒนาขั้นตอน-วิธีการสกัดแยกกรดนิวคลีอิก (total nucleic acid extraction) จากใบมันฝรั่งที่สดและเหมาะสมซึ่งสามารถใช้ได้กับการตรวจสอบไวรัสของมันฝรั่งทั้งชนิดที่มีสารพันธุกรรมเป็น RNA หรือ DNA และการพัฒนาระบบ RT-PCR เพื่อการตรวจสอบไวรัสที่มีหาง poly(A) ที่ปลาย 3' ของ RNA ในปีที่สอง (ตค 2551 – กย 2552) โครงการวิจัยฯ ได้ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบ PVA PVX PVY และ PLRV เพื่อให้ได้ระบบของ RT-PCR ที่เหมาะสม โดยทำการออกแบบดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะหรือกึ่งจำเพาะต่อชนิดของไวรัสทั้งสี่ชนิด โดยอาศัยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของไวรัสแต่ละชนิดจากฐานข้อมูลพันธุกรรม GenBank และนำมาใช้เป็นไพรเมอร์ใน PCR เพื่อทดสอบความจำเพาะเจาะจง และ

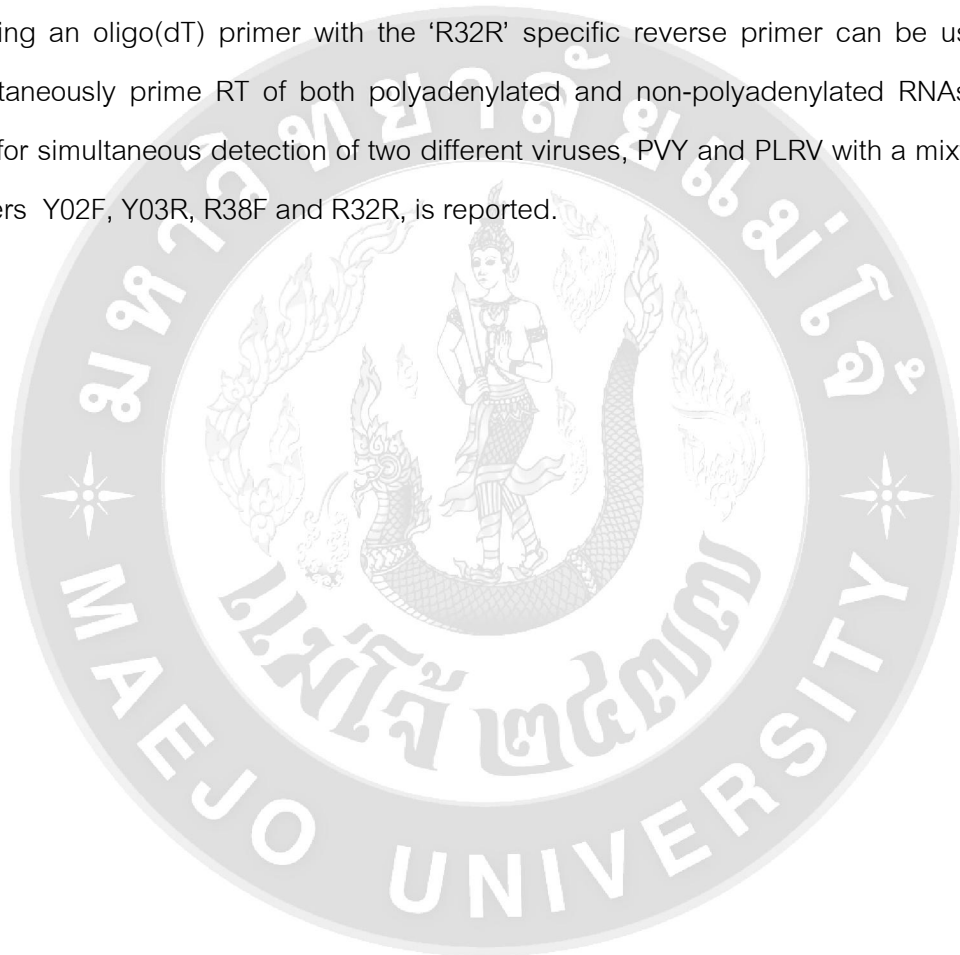
ความไวในการตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิด จากการทดสอบ โครงการวิจัยฯ ได้คัดเลือกและพัฒนา ระบบตรวจสอบ PVA PVX PVY และ PLRV ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ A05F/A04R, X01F/X02R, Y02F/Y03R และ R38F/R32R ในวิธี RT-PCR ตามลำดับ นอกจากนี้ โครงการวิจัยฯ ได้ทำการ พัฒนาระบบการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่งโดยการตรวจสอบ PVY และ PLRV จากเนื้อเยื่อ ใบ ในหลอดทดลองเดียวในครั้งเดียว โดยวิธีการตรวจสอบไวรัสในลักษณะ duplex RT-PCR ด้วย คู่ไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ร่วมกับ R38F และ R32R โดยใช้ oligo (dT) และ R32R เป็น ไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT)

ABSTRACT

The overall purpose of this research was to develop a reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR)-based method for detection of viruses in infected potato plant. *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) and *Potato leafroll virus* (PLRV) are four different virus species of the most important viruses infecting cultivated potatoes. RT PCR-based methods for detecting the four potato viruses were successfully developed in this study.

A total of 1,120 symptomatic leaf samples from field and from greenhouse were collected from December 2007 to July 2009 in three Northern provinces, Chiang Mai, Chiang Rai and Tak, of Thailand. Samples of symptomatic plants were analyzed for virus infection by RT-PCR using specific oligonucleotide primers. In the first year of this research project (Oct 2007 – Sep 2008), optimization and application of a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) system have been studied for detection of five potato viruses. A nucleic acids extraction protocol was developed for both potato-infecting DNA and RNA viruses. By using an oligo(dT) as a common primer for RNA templates containing a poly(A) tract, a RT-PCR system have been developed for detection of four potato viruses (PVA, PVS, PVX and PVY) which contained a poly(A) tract at their 3'-end. In the second year (Oct 2008 – Sep 2009), three viral genera including four potato viruses, potyvirus (PVA and PVY), potexvirus (PVX) and polerovirus (PLRV) were used to develop manifold systems of RT-PCR. Several specific or

degenerate oligonucleotide primers were designed on aligned virus sequences published in the GenBank covering the genome of different PVA, PVX, PVY and PLRV isolates, consensus regions were identified. These designed primers were used as either forward or reverse primers in PCR which were tested for their specificity and sensitivity. Four primer pairs, A05F/A04R, X01F/X02R, Y02F/Y03R and R38F/R32R, were preferred and used as a set of virus species-specific primer in PCR for development of RT-PCR methods for detecting PVA, PVX, PVY and PLRV, respectively. Furthermore, merging an oligo(dT) primer with the 'R32R' specific reverse primer can be used to simultaneously prime RT of both polyadenylated and non-polyadenylated RNAs, and PCR for simultaneous detection of two different viruses, PVY and PLRV with a mixture of primers Y02F, Y03R, R38F and R32R, is reported.



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คณะกรรมการวิจัยมหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการ การเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้พิจารณาและ สนับสนุนเงินทุนเพื่อการวิจัย เรื่อง การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่งโดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล ในปีงบประมาณ 2551 และ 2552 (ต่อเนื่อง เป็นเวลา 2 ปี)

ขอขอบคุณ อาจารย์สมจิตต์ กิจรุ่งเรือง หัวหน้าฝ่ายวิจัย และเลขานุการคณะกรรมการ วิจัยมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้คำปรึกษา-แนะนำที่มีคุณค่าอย่างมากต่อโครงการวิจัยฯ และผู้วิจัย ในการดำเนินโครงการ คุณบุญศรี ใจเบ็ง และคุณจำเนียร แก้วพา ในความอนุเคราะห์ห้วพันธุ์มัน ฝรั่งส่วนหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ เพื่อเปรียบเทียบการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากการ ติดเชื้อและการถ่ายทอดโรคผ่านทางห้วพันธุ์ ระหว่างห้วพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ (ผ่านการ ตรวจสอบการปราศจากไวรัสแล้ว) และห้วพันธุ์ที่ได้จากการเพาะปลูกในแปลงเกษตรในฤดูปลูก ก่อนหน้านี้

ขอขอบคุณ คุณสุใจ พุดน้อย ผู้จัดการฝ่ายจัดหาวัตถุดิบ และคณะเจ้าหน้าที่เกษตร บริษัท Pepsi-Cola (Thai) Trading จำกัด ที่ได้ให้การสนับสนุนข้อมูลเกี่ยวกับ แหล่งและพื้นที่การ เพาะปลูก การระบาดของโรค และความคิดเห็นอันเป็นประโยชน์ คุณวรพงษ์ หงส์เวียง เจ้าหน้าที่ ส่งเสริมการเกษตร และคณะ บริษัทเบอร์ลี่ ยุคเกอร์ ฟู้ดส์ ที่ได้อำนวยความสะดวกแก่คณะผู้วิจัย- สํารวจโรค ในการเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคในพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่ง จังหวัดตาก และความ อนุเคราะห์ที่พักแก่คณะผู้วิจัย

ขอขอบคุณ คุณจิรพรรณ โสภี คุณอุษณีย์ แสนสบาย คุณฐาปนี เมฆหมอก คุณสุพัฒตรา จันทรสดี คุณวิภากรณ์ อินต้อม คุณพิมลพรรณ สีหาบุตร คุณพัชรวิภรณ์ ศรีชัย คุณนุชจारी มงคล คุณกาญจนา เกตุอินทร์ คุณจิรพรรณ กุลยะสอน คุณรํ้าพรรณ บุญท่อม คุณอัมพิกา สายน้ำเย็น และคุณเมธิ นนจันทร์ นักศึกษาในโครงการปฏิบัติการเพื่อการพัฒนาวิธีการวินิจฉัยโรคพืชและ การตรวจสอบเชื้อสาเหตุ โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล ภายใต้การควบคุมและให้คำปรึกษาของ อาจารย์ ดร.พิภัทร เจียมพิริยะกุล ห้องปฏิบัติการ “การวินิจฉัยโรคพืช” อาคารเฉลิมพระเกียรติ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณและขออุทิศคุณความดีอันจะเกิดจากประโยชน์ ในทางที่ขอบจากผลการวิจัยนี้แด่ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้มอบความรัก ความอบอุ่น ดูแล-เอาใจใส่ และให้การสนับสนุนแก่ผู้วิจัยให้ได้รับการศึกษาอย่างเต็มที่จนถึงขั้นสูงสุด ตลอดจนบูรพาจารย์ทุก ท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	15
การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคมันฝรั่งซึ่งแสดงลักษณะอาการที่คาดว่าจะมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส	15
การตรวจสอบและวินิจฉัยเบื้องต้น (preliminary detection and diagnosis) โดยอาศัยการแสดงลักษณะอาการของโรคบนมันฝรั่ง เพื่อการจำแนกโรคและไวรัสสาเหตุ	16
การตรวจสอบยืนยันไวรัสสาเหตุโรคที่มีการติดเชื้อบนมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการที่อาศัยหลักการของ polymerase chain reaction (PCR)	16
การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง	17
การทดสอบระบบการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง	20
การพัฒนาระบบการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง	22
การพัฒนาระบบการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง	23
ผลการทดลอง	25
การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคมันฝรั่งซึ่งแสดงลักษณะอาการที่คาดว่าจะมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส	25
การตรวจสอบและวินิจฉัยเบื้องต้น (preliminary detection and diagnosis) โดยอาศัยการแสดงลักษณะอาการของโรคบนมันฝรั่ง เพื่อการจำแนกโรคและไวรัสสาเหตุ	29
การตรวจสอบยืนยันไวรัสสาเหตุโรคที่มีการติดเชื้อบนมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการที่อาศัยหลักการของ polymerase chain reaction (PCR)	34

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง	43
การทดสอบระบบการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง	46
การพัฒนาระบบการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง	67
การพัฒนาระบบการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง	80
วิจารณ์ผล	85
สรุปผล	89
เอกสารอ้างอิง	90



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสสาเหตุโรคบนมันฝรั่งในเบื้องต้น	17
2 ปริมาณตัวอย่างโรคมันฝรั่งซึ่งแสดงลักษณะอาการที่คาดว่าจะมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสที่ได้ดำเนินการในปีที่ 1 และ ปีที่ 2 ของโครงการ (2550 - 2552)	26
3 ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบและใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสสาเหตุโรคบนมันฝรั่งที่สำคัญ 4 ชนิด	44
4 แสดงผลการตรวจสอบไวรัส <i>Potato virus A</i> , <i>Potato virus X</i> และ <i>Potato virus Y</i> ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 24 ตัวอย่าง (S101-S124) โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด	61
5 แสดงผลการตรวจสอบไวรัส <i>Potato virus A</i> , <i>Potato virus X</i> และ <i>Potato virus Y</i> ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 24 ตัวอย่าง (S125-S148) โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด	62
6 แสดงผลการตรวจสอบไวรัส <i>Potato virus A</i> , <i>Potato virus X</i> และ <i>Potato virus Y</i> ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 24 ตัวอย่าง (S149-S172) โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด	63
7 แสดงผลการตรวจสอบไวรัส <i>Potato virus A</i> , <i>Potato virus X</i> และ <i>Potato virus Y</i> ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 24 ตัวอย่าง (S173-S196) โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด	64

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไวรัสของมันฝรั่งในบริเวณแปลงเพาะปลูกของเกษตรกร ปีเพาะปลูก 2550-2551	27
2	การเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพการทดลองในกระถางหรือถุงปลูก-พลาสติกภายในและภายนอกโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (มุ้งตาข่าย) บริเวณแปลงปลูกพืชทดลอง ภาควิชาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยแม่โจ้	28
3	การเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพการควบคุมบนแปลงเพาะปลูกทดลองภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ และสถาบันตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	30
4	การเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพการควบคุมบนแปลงเพาะปลูกทดลองภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ และสถาบันตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้	31
5	การเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพการควบคุมบนแปลงเพาะปลูกทดลองภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ และสถาบันตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และการเก็บข้อมูล จำนวนหัว น้ำหนักรวม และลักษณะหัวมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติ	32
6	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus A</i> (PVA) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอ-ไพรเมอร์ (DNA primers) PV17 และ PV18 โดยใช้ oligo (dT) ₂₄ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	35

ภาพ		หน้า
7	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus X</i> (PVX) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส หมายเลข Acc No. 025 โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV19 และ PV20 โดยใช้ oligo (dT) ₂₄ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	37
8	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus Y</i> (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส หมายเลข Acc No. 025 โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV7 และ PV8 โดยใช้ oligo (dT) ₂₄ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	38
9	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus Y</i> (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 17 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV7 และ PV8 โดยใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็นไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	40
10	แสดงลักษณะอาการใบม้วน (leaf roll) ของมันฝรั่งที่การตรวจสอบลักษณะเบื้องต้นว่ามีสาเหตุจากการติดเชื้อ <i>Potato leaf roll virus</i> (PLRV) ในตัวอย่างโรคมันฝรั่ง จำนวน 7 ตัวอย่าง ซึ่งนำมาทำการตรวจสอบไวรัส โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV9 และ PV10	41
11	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato leaf roll virus</i> (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV9 และ PV10 โดยใช้ PV10 เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription	42

ภาพ		หน้า
12	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus A</i> (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S101-S124) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	47
13	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus A</i> (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S125-S148) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	48
14	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus A</i> (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S149-S172) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	49
15	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus A</i> (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S173-S196) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	50
16	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus X</i> (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S101-S124) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) X01F และ X02R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	52

ภาพ		หน้า
17	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus X</i> (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S125-S148) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) X01F และ X02R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	53
18	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus X</i> (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S149-S172) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) X01F และ X02R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	54
19	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus X</i> (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S173-S196) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) X01F และ X02R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	55
20	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus Y</i> (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S101-S124) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	57
21	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus Y</i> (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S125-S148) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	58

ภาพ		หน้า
22	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus Y</i> (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S149-S172) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	59
23	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus Y</i> (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S173-S196) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)	60
24	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato leaf roll virus</i> (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการใบม้วนและคาดว่าจะมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสจำนวน 9 ตัวอย่าง โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) R38F และ R32R โดยใช้ R32R เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription	66
25	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus A</i> (PVA) ในตัวอย่างมันฝรั่งจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R โดยใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription	69
26	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus X</i> (PVX) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อไวรัส หมายเลข Acc No. S127 โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV19 และ PV20 (Lane 1 – Lane 2) และคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ X01F และ X02R (Lane 3 – Lane 4) โดยใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription และใช้ cDNA ในปริมาณที่ต่างกัน ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)	70

ภาพ		หน้า
27	แสดงผลของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอขนาด 313 bp ที่มีความจำเพาะต่อ PVY และได้จากการตรวจสอบด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบระดับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เพื่อหาระดับอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาและให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่เหมาะสม ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 55-68 ^o C จำนวน 7 ระดับ ได้แก่ 55.8, 58.1, 60.0, 61.9, 64.5, 65.9 และ 68.0 ^o C	73
28	แสดงผลการตรวจสอบไวรัสของมันฝรั่ง 4 ชนิด ได้แก่ PVY ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ซึ่งให้ผลที่มีความจำเพาะต่อแถบดีเอ็นเอขนาด 313 bp (A) PVA ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ A05F และ A04R ซึ่งให้ผลที่มีความจำเพาะต่อแถบดีเอ็นเอขนาด 448 bp (B) PVS ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV05 และ PV06 ซึ่งให้ผลที่มีความจำเพาะต่อแถบดีเอ็นเอขนาด 683 bp (C) และ PVX ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ X01F และ X02R ซึ่งให้ผลที่มีความจำเพาะต่อแถบดีเอ็นเอขนาด 801 bp (D) จากตัวอย่างมันฝรั่งจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ Acc No S107, S108, S109, S110, S111 และ S112 ซึ่งแสดงผลการตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิดใน Lane ที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ ส่วน Lane M แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)) โดยแสดงให้เห็นถึงการไม่เกิดปฏิกิริยาแบบข้าม (cross reaction) ของคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R กับไวรัสชนิดอื่น (PVA, PVS และ PVX) นอกจากการเกิดปฏิกิริยากับ PVY เพียงชนิดเดียวแบบจำเพาะเจาะจง	74
29	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus Y</i> (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่ง จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R (Lane 1 – Lane 8) และคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV7 และ PV8 (Lane 9 – Lane 16) โดยใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription	76

ภาพ		หน้า
30	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato virus Y</i> (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่ง จำนวน 34 ตัวอย่าง ที่มีการเพาะปลูกในโรงเรือนเพาะปลูกพืช (โรงเรือนกระจก) โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R โดยใช้ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription	77
31	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato leaf roll virus</i> (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่ง ที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อ PLRV หมายเลข Acc No. S006_2 โดยอาศัย วิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) R38F และ R32R โดยใช้ R32R เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA และใช้ RNA template ในปริมาณที่แตกต่างกันในปฏิกิริยา reverse transcription	79
32	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato leaf roll virus</i> (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่ง ที่มีการติดเชื้อ PLRV หมายเลข Acc No. S006_2 โดยอาศัยหลักวิธีการ ของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) R38F และ R32R โดยใช้ R32R เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA และใช้ระดับอุณหภูมิ annealing ที่แตกต่างกันในปฏิกิริยา polymerase chain reaction	81
33	แสดงผลการตรวจสอบ <i>Potato leaf roll virus</i> (PLRV) และ <i>Potato virus Y</i> (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด หมายเลข Acc No. S109 โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) R38F และ R32R และ คู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R โดยใช้ R32R และ oligo (dT) ₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription	83

คำนำ

มันฝรั่ง (potato: *Solanum tuberosum*) พืชเศรษฐกิจที่มีศักยภาพสูงพืชหนึ่ง เป็นที่นิยมเพื่อการบริโภคและเป็นที่ต้องการในปริมาณสูงเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร และแปรรูปในปัจจุบัน โดยมีแนวโน้มของปริมาณความต้องการที่เพิ่มสูงขึ้นไปในอนาคต ผลการสำรวจและวิจัยรายงานว่า มีการขยายพื้นที่เพาะปลูก และการเพิ่มผลผลิตมันฝรั่งภายในประเทศ แต่ก็ยังไม่เพียงพอกับปริมาณความต้องการซึ่งอาจส่งผลให้ต้องมีการนำเข้ามันฝรั่งจากต่างประเทศเพื่อชดเชยปริมาณที่ไม่เพียงพอ นอกเหนือจากการนำเข้าหัวพันธุ์มันฝรั่งเพื่อนำมาใช้เพาะปลูกจากต่างประเทศ แม้จะได้มีการวิจัยและความพยายามที่จะผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีคุณภาพภายในประเทศก็ตาม

ปัญหาสำคัญในการเพิ่มผลผลิตต่อไร่ของมันฝรั่งและการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีคุณภาพ คือการติดเชื้อและการเกิดโรค โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสซึ่งมักจะทำความเสียหายที่รุนแรงต่อผลผลิตมันฝรั่งและการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่ง ซึ่งเป็นผลมาจากอุปสรรค-ปัญหาที่แท้จริงในทางปฏิบัติของการตรวจสอบเชื้อไวรัสและการวินิจฉัยโรคไวรัสที่ต้องอาศัยเทคนิควิธีการที่ยุ่งยากซับซ้อน และจำเป็นต้องอาศัยการตรวจวินิจฉัยในระดับห้องปฏิบัติการโดยผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะทาง ซึ่งในขั้นตอน-วิธีปฏิบัติการตรวจสอบเชื้อไวรัส วินิจฉัยโรคอาจต้องใช้เวลา 2-4 สัปดาห์ ซึ่งมักล่าช้าเกินกว่าที่จะดำเนินการควบคุมโรค และผลที่ได้มักจะไม่มีความชัดเจนแม่นยำอีกด้วย ส่งผลให้มีการพัฒนาของโรคและการแพร่ระบาดเกินกว่าระดับที่จะสามารถควบคุมได้ และเป็นสาเหตุทำให้ไม่ประสบผลสำเร็จในการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งคุณภาพที่ปลอดโรคเชื้อไวรัสจากรายงาน การเกิดโรคของมันฝรั่งที่ติดเชื้อเข้าทำลายโดยเชื้อไวรัส พบว่ามีไวรัสสาเหตุโรคชนิดต่างๆ มากถึง 40 ชนิด เช่น *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY), *Potato virus S* (PVS) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) เป็นต้น ซึ่งโรคไวรัสเหล่านี้สามารถก่อให้เกิดความเสียหายทั้งคุณภาพและปริมาณของผลผลิตมันฝรั่งอย่างรุนแรง มีรายงานการระบาดของโรคไวรัสในมันฝรั่งที่เพาะปลูกในประเทศไทยเพียงไม่กี่ชนิด ได้แก่ PVX, PVY, PVS และ PLRV (ธีระ, 2532) ทั้งนี้เนื่องจากข้อจำกัดในการตรวจสอบ-วินิจฉัยโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส ในขณะที่ประเทศไทยโดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มีประกาศในราชกิจจานุเบกษา เรื่องกำหนดศัตรูพืชเป็นสิ่งต้องห้ามตาม พ.ร.บ. กักพืช พ.ศ. 2507 (ฉบับที่ 6) พ.ศ. 2550 ได้กำหนดไวรัสสาเหตุโรคของมันฝรั่ง 13 ชนิด ได้แก่ *Alfalfa mosaic virus* (AMV ; Alfamovirus), *Andean potato latent virus* (APLV; Tymovirus), *Andean potato mottle virus* (APMV; Comovirus), *Potato black ringspot virus* (PBRV; Nepovirus), *Potato deforming mosaic virus* (PDMV; Geminivirus),

Potato mop-top virus (PMTV; *Pomovirus*), *Potato yellow dwarf virus* (PYDV; *Nucleorhabdovirus*), *Potato yellowing virus* (PYV; *Alfamovirus*), *Potato yellow vein virus* (PYVW; *Closterovirus*), *Tobacco rattle virus* (TRV; *Tobravirus*), *Tobacco streak virus* (TSV; *Ilarvirus*), *Tomato black ring virus* (TBRV; *Nepovirus*) และ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV; *Tospovirus*) เป็นศัตรูพืชต้องห้ามจากทุกแหล่ง เนื่องจากเป็นศัตรูพืชกักกัน

การเพาะปลูกมันฝรั่งในประเทศไทย จังหวัดเชียงใหม่ซึ่งเป็นจังหวัดในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนบนมีการผลิตมันฝรั่งมากที่สุดในเขตพื้นที่ของประเทศ โดยมีพื้นที่เพาะปลูก 25,527 ไร่ และให้ผลผลิตปริมาณ 67,596 ตัน ในปีเพาะปลูก 2552 รองลงมาได้แก่ จังหวัดตากซึ่งเป็นจังหวัดในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง มีพื้นที่เพาะปลูก 15,477 ไร่ และให้ผลผลิตปริมาณ 35,915 ตัน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 51.1 และ 31.0 ของพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งทั้งหมดในภาคเหนือ และคิดเป็นพื้นที่เพาะปลูกรวมกันร้อยละ 80.7 ของพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งทั่วประเทศ นอกจากนี้จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดตากซึ่งมีพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งและจัดเป็นแหล่งผลิตส่วนใหญ่ของประเทศแล้ว ยังมีการเพาะปลูกในพื้นที่หลายจังหวัดในภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัด เชียงราย ลำพูน และ ลำปาง คิดเป็นพื้นที่เพาะปลูกรวมกันร้อยละ 17.5 ของพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งทั่วประเทศ และบางจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดเลย และ สกลนครซึ่งคิดเป็นพื้นที่เพาะปลูกรวมกันประมาณร้อยละ 1.8 ของพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งทั่วประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551)

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล (molecular technique) เป็นแนวทางในการปฏิบัติที่สามารถแก้ไขปัญหาและอุปสรรคที่เป็นข้อจำกัดต่างๆ ได้ โดยการประยุกต์ใช้ PCR หรือ RT-PCR ซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณชิ้นส่วนที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ ไพร์เมอร์ (DNA primers) ที่ได้จากการออกแบบโดยอาศัยข้อมูลและผลการศึกษาวเคราะห์พันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล (Molecular genetics) และลำดับเบสบนรหัสพันธุกรรมของไวรัสชนิดต่างๆ ที่เป็นสายพันธุ์สาเหตุโรคของมันฝรั่งที่มีการแพร่ระบาดในพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งในประเทศไทยที่ได้จากการสำรวจโรคในโครงการวิจัยนี้ ด้วยหลักการของการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของสารพันธุกรรมของไวรัสเป้าหมายที่ต้องการตรวจสอบด้วยไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไวรัสชนิดต่างๆ แต่ละชนิด สามารถใช้เป็นวิธีตรวจสอบ (detection) จำแนก (identification) ชนิดของไวรัสได้ เพื่อการผลิตชุดตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง ที่มีประสิทธิภาพ ทั้งความจำเพาะเจาะจง (specificity) เพื่อความถูกต้องแม่นยำ และความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบ อีกทั้งสามารถปฏิบัติได้สะดวก และให้ผลการวินิจฉัยที่รวดเร็ว

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาและผลิต ชุดตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง ด้วยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล โดยการศึกษา-วิเคราะห์พันธุกรรมระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ที่เป็นสาเหตุโรคของมันฝรั่งในประเทศไทย และการตรวจสอบ-จำแนกไวรัส เพื่อแก้ปัญหาอุปสรรคในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่งให้มีประสิทธิภาพและสะดวกในการปฏิบัติ



การตรวจเอกสาร

การวินิจฉัยโรคและการจำแนก-ตรวจสอบสาเหตุโรคพืชได้อย่างถูกต้องแม่นยำในระยะเวลาอันสั้น และสามารถปฏิบัติได้โดยสะดวกรวดเร็ว นับเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งในการดำเนินการต่างๆ เพื่อการจัดการโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยผลจากการวินิจฉัยโรคและการจำแนก-ตรวจสอบสาเหตุที่แท้จริงของโรคพืชนั้นๆ จะถูกนำมาใช้เป็นข้อมูลที่สำคัญในการพิจารณาเพื่อการตัดสินใจในการวางแผนและดำเนินการเพาะปลูก ตลอดจนการกำหนดแนวทาง-วิธีการในการควบคุมการแพร่กระจายและการแพร่ระบาดของโรค โดยการตรวจสอบการติดเชื้อระดับแปลงเพาะปลูกเพื่อการผลิต เมล็ดพันธุ์ หัวพันธุ์ หรือส่วนขยายพันธุ์ของพืช (planting materials) และการกำจัดคัดทิ้งซึ่งรวมถึงการตรวจสอบการติดเชื้อสาเหตุโรคหรือปนเปื้อนมากับส่วนของเมล็ดพันธุ์ หัวพันธุ์ หรือส่วนขยายพันธุ์ของพืช และกักกันพืชหรือส่วนขยายพันธุ์ที่ตรวจสอบ-จำแนกพบการติดเชื้อหรือปนเปื้อนเชื้อสาเหตุโรคเหล่านี้ ตามกฎ ระเบียบ ข้อบังคับ และพระราชบัญญัติ ตามประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (quarantine regulations)

นอกจากนี้ การวินิจฉัยโรคและการจำแนก-ตรวจสอบสาเหตุโรค ยังนับเป็นกระบวนการที่สำคัญและจำเป็นอย่างยิ่งในการศึกษา-วิจัยทางโรคพืชวิทยาแขนงต่างๆ อาทิ การศึกษาด้านระบาดวิทยาของโรค การศึกษาถึงความสำคัญของปริมาณความสูญเสียผลผลิตกับระดับความรุนแรงของโรคบนพืช ตลอดจนการเสาะแสวงหาแนวทาง-วิธีการในรูปแบบใหม่เพื่อเป็นกลยุทธ์ในการควบคุมการเกิดโรค เนื่องจากการวินิจฉัยโรคและการจำแนก-ตรวจสอบสาเหตุโรค เป็นกระบวนการในเบื้องต้นของการศึกษาทุกแขนงในโรคพืชวิทยา

แนวทาง-วิธีการที่มักนิยมปฏิบัติในการวินิจฉัยโรคพืช โดยทั่วไปได้แก่ การพิจารณาโดยการสังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืชด้วยตาเปล่า โดยเปรียบเทียบกับลักษณะปกติบนพืชนั้นๆ ซึ่งในแนวทาง-วิธีการนี้อาจอาศัยการจำแนกโรคและสาเหตุโรคโดยวิธีการในระดับห้องปฏิบัติการ เช่น การใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อสาเหตุบนอาหารคัดเลือก (selective media) ร่วมกับการศึกษาเนื้อเยื่อพืช และลักษณะของเชื้อสาเหตุโรคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถใช้เพื่อการยืนยันผลการวินิจฉัยโรค ซึ่งในบางกรณีของโรคและการวินิจฉัยโรคนับว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสมเนื่องจากสะดวก ค่าใช้จ่ายไม่สูง และสามารถให้ผลการวินิจฉัยได้ถูกต้อง (Stowell and Gelernter, 2001) แต่เนื่องจากการปฏิบัติโดยแนวทาง-วิธีการเหล่านี้ มักจำเป็นต้องอาศัยนักโรคพืชที่มีความเชี่ยวชาญเฉพาะทาง ซึ่งมีทักษะในการปฏิบัติ

ความต้องการที่จะใช้เทคนิค-วิธีการที่สะดวกในทางปฏิบัติ และไม่ยุ่งยากซับซ้อน ซึ่งไม่จำเป็นต้องอาศัยความรู้ความชำนาญขั้นสูงของผู้ปฏิบัติ อีกทั้งควรเป็นวิธีการซึ่งให้ผลการวินิจฉัย

ตรวจสอบ หรือจำแนกที่รวดเร็ว ใช้ระยะเวลาอันสั้น โดยมีความถูกต้อง-แม่นยำ มีความไว (sensitive) ในการตรวจสอบ กล่าวคือ สามารถตรวจสอบได้แม้มีเชื้อสาเหตุโรคในระดับปริมาณที่ต่ำ ซึ่งมีประโยชน์อย่างมากในการตรวจสอบการติดเชื้อได้ในระยะต้นๆ ของการพัฒนาโรค หรือในขณะที่ยังไม่ปรากฏลักษณะอาการที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า ด้วยข้อจำกัดของวิธีการวินิจฉัยโรคและการจำแนก-ตรวจสอบสาเหตุโรค โดยอาศัยลักษณะอาการ และวิธีการแบบดั้งเดิม ซึ่งไม่สามารถตอบสนองของความต้องการดังที่กล่าวข้างต้น ทำให้ในช่วงเวลากว่า 20 ปี ที่ผ่านมา ได้มีความพยายามในการพัฒนาแนวทาง-วิธีการใหม่ๆ เพื่อการตรวจสอบ-จำแนก เชื้อสาเหตุโรค โดยเฉพาะการพัฒนาการวินิจฉัยโรคโดยอาศัยเทคโนโลยีทางแอนติบอดี (antibodies) และกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) (Ward *et al.*, 2004)

การวินิจฉัยโรคพืชโดยอาศัยกรดนิวคลีอิก (nucleic acid-based diagnostics) ซึ่งวิธีการต่างๆ ที่อาศัยกรดนิวคลีอิก ไม่ว่าจะเป็นการใช้ดีเอ็นเอตรวจจับ (DNA probe) และ/หรือ อาศัยปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์ (Polymerase Chain Reaction : PCR) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนที่มีบริเวณที่จำเพาะเจาะจง ก็ตาม ได้รับความนิยมในการนำมาประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง ในขณะเดียวกันได้มีการนำมาประยุกต์ใช้และพัฒนาวิธีการเพื่อการวินิจฉัยโรคและการตรวจสอบ-จำแนกเชื้อสาเหตุโรคพืช (Martin *et al.*, 2000) โดยเฉพาะวิธีซึ่งอาศัยเทคนิคของ PCR นั้น จะให้ผลที่มีความไว (sensitive) และความจำเพาะเจาะจงสูงมากในการตรวจสอบ-จำแนกเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งการพัฒนาวิธีการส่วนใหญ่ก็เพื่อการตรวจสอบดีเอ็นเอของเชื้อสาเหตุโรค (pathogen DNA) เช่น รา และแบคทีเรีย โดยที่ดีเอ็นเอนั้นมีความเสถียร (stable) และเตรียมได้โดยไม่ยุ่งยากมากนักเมื่อเทียบกับอาร์เอ็นเอ (McCartney *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้วิธีการซึ่งอาศัยเทคนิค PCR กับการตรวจสอบอาร์เอ็นเอ (RNA) สามารถปฏิบัติได้โดยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอที่ให้เป็นแม่แบบ ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) โดยการทำงานของเอนไซม์ reverse transcriptase ก่อนที่จะนำดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้นั้นใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบใน PCR ซึ่งที่เรียกว่าเป็นวิธี reverse transcription PCR (RT-PCR) ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้ ได้มีการพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบ-จำแนกไวรัสพืช (Waterhouse and Chu, 1995) อย่างกว้างขวาง

การตรวจสอบและจำแนกชนิดของไวรัสพืช มีการปฏิบัติในหลากหลายเทคนิควิธี ซึ่งได้มีการพัฒนาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นตามลำดับอย่างต่อเนื่อง โดยสามารถจำแนกตามหลักการ-และแนวทางวิธีการปฏิบัติ (Matthews, 1993; Martin, 1998; Hull 2002) ได้ดังนี้

1) วิธีที่เกี่ยวข้องกับการมีกิจกรรมทางชีววิทยา (biological activities) ของไวรัส เช่น การทดสอบความสามารถในการติดเชื้อบนพืชทดสอบ (infectivity assay), การใช้ indicator hosts,

การใช้ host range, การทดสอบวิธีการถ่ายทอดโรค, การศึกษาผลกระทบต่อนี้ในระดับเซลล์ (cytological effects) เป็นต้น

2) วิธีที่อาศัยคุณลักษณะทางกายภาพ (physical properties) ของอนุภาคไวรัส เช่น การศึกษา stability และ physicochemical properties, การวิเคราะห์ค่าจำเพาะภายใต้สภาพการหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (ultracentrifugation), การตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณและคุณภาพอนุภาคไวรัส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope), การทดสอบวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของไวรัสบริสุทธิ์ เป็นต้น

3) วิธีที่อาศัยคุณลักษณะโปรตีนของไวรัส (viral proteins) เช่น เทคนิควิธีทางเซรุ่มวิทยา (serological methods) ซึ่งมีการประยุกต์-ดัดแปลงวิธีที่หลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น วิธี precipitation, วิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), serologically specific electronmicroscopy เทคนิควิธีทาง electrophoresis เช่น sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นต้น

4) วิธีที่เกี่ยวข้องกับคุณลักษณะกรดนิวคลีอิก(สารพันธุกรรม)ของไวรัส (viral nucleic acid) เช่น การตรวจสอบชนิด และขนาด ของกรดนิวคลีอิก, วิธี nucleic acid hybridization และวิธี polymerase chain reaction (PCR) เป็นต้น

Polymerase chain reaction (PCR) เป็นปฏิกิริยาซึ่งอาศัยหลักการของการเกิดปฏิกิริยาในหลอดทดลอง (*in vitro*) ของเอนไซม์ DNA polymerase ในการเพิ่มทวีปริมาณ ($10^6 - 10^9$ เท่า ของ template เริ่มต้น) DNA fragment ที่สนใจ ด้วยคู่ของ DNA primer ที่ถูกออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจง (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988) ในการตรวจสอบและจำแนกชนิดของไวรัสพืช โดย PCR นั้นไม่สามารถใช้ได้โดยตรงต่อไวรัสพืชส่วนใหญ่ซึ่งมีจีโนม (virus genome) เป็น RNA อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเทคนิควิธี reverse transcription (RT) สามารถสังเคราะห์ cDNA จาก RNA (genome) template โดยการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ reverse transcriptase ร่วมกับ DNA primer และใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เป็น template เริ่มต้น ใน PCR (RT-PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอนไซม์โพรไมเอเรส (polymerase chain reaction: PCR) ซึ่งเป็นวิธีการในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณในจำนวนของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อคู่ดีเอ็นเอโพรไมเออร์ในหลอดทดลอง จัดเป็นเทคนิคที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการนำมาประยุกต์เพื่อการตรวจสอบ-วินิจฉัยโรคพืช

ในการเกิดปฏิกิริยาของ PCR สายคู่ของดีเอ็นเอจะถูกทำให้แยกออกจากกันเป็น 2 สาย โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 94 -96 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อระดับอุณหภูมิลดต่ำลงมายังที่ระดับ

40 – 65 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระดับอุณหภูมิที่สามารถเกิดการเกาะจับ (binding) ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ทั้งสองเส้น บนตำแหน่งของดีเอ็นเอซึ่งมีลำดับเบสที่มีลักษณะเป็นสายคู่สม (complementary) กับลำดับเบสบนดีเอ็นเอไพรเมอร์ โดยดีเอ็นเอไพรเมอร์แต่ละตัว จะมีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณปลายทั้งสองข้างของดีเอ็นเอบริเวณที่จะมีการเพิ่มปริมาณ โดยเหตุที่ไพรเมอร์นั้นเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว (single stranded DNA) ที่มีความยาวไม่มากนัก ซึ่งสามารถเกาะจับดีเอ็นเอเป้าหมายได้อย่างจำเพาะเจาะจง โดยการเข้าคู่กันของเบส (base) ที่มีความเป็นคู่สม (complementary) ทำให้มีการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอ็นไซม์ และได้ผลผลิตที่มีความจำเพาะเจาะจง การสร้างสายที่สองของดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นสายคู่สม ที่ระดับอุณหภูมิ 68 – 72 องศาเซลเซียส มีการสังเคราะห์ต่อให้ได้สายที่ยาวขึ้นจากไพรเมอร์ด้วย ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟต (deoxyribonucleoside triphosphates : dNTPs) โดยเอ็นไซม์โพรไมเอร์ส (DNA polymerase) ซึ่งมีความเสถียร (คงทน) ที่อุณหภูมิสูง (thermostable) การเพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเกิดภายใต้สภาพของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิตามระดับที่แตกต่างอย่างต่อเนื่อง โดยมีการซ้ำหลายรอบ (25 ถึง 40 รอบ) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 – 3 ชั่วโมง และให้ผลผลิตหลายล้านเท่าจากดีเอ็นเอแม่แบบเริ่มต้น PCR เป็นเทคนิคที่มีความไวสูง ซึ่งสามารถเพิ่มปริมาณจากดีเอ็นเอแม่แบบที่มีปริมาณต่ำมากๆ

ในบรรดาวิธีการที่มีการประยุกต์ เพื่อการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคนั้น เทคนิควิธีการตรวจซึ่งอาศัยส่วนของกรดนิวคลีอิกของเชื้อสาเหตุโรคนั้นถือเป็นเทคนิค-วิธีการแนวทางหนึ่งที่เป็นที่รู้จักและได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในศักยภาพและประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิธีการต่างๆ ที่อาศัยหลักการของปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพรไมเอร์ส (polymerase chain reaction : PCR) ซึ่งให้ประสิทธิภาพสูงในความรวดเร็ว ความจำเพาะเจาะจง และความไวระดับที่สูง ของการตรวจสอบ (Henson and French, 1993; McCartney *et al.*, 2003) โดยแม้แต่ไวรัสส่วนใหญ่ซึ่งมีอาร์เอ็นเอ (RNA) เป็นสารพันธุกรรม เทคนิควิธีการของ PCR ก็สามารถตรวจสอบได้ โดยการถอดรหัส RNA แบบย้อนกลับให้ได้ DNA ก่อนนำไปทำปฏิกิริยาใน PCR (Schaad *et al.*, 2003)

ไวรัสสาเหตุโรคที่สำคัญของมันฝรั่ง ได้แก่ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคแต่ละชนิด โดยวิธีการระดับโมเลกุลซึ่งอาศัยหลักการของปฏิกิริยา RT-PCR และไวรัสแต่ละชนิดมีลักษณะต่างๆ ทางชีววิทยา และการเป็นเชื้อสาเหตุก่อโรคแก่มันฝรั่ง ดังมีรายละเอียดที่ได้อธิบายพอสังเขป ดังนี้

Potato virus A (PVA)

ความรุนแรงของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อ PVA มีความผันแปรตามปัจจัยหลัก 3 ประการ ได้แก่ ไอโซเลทของไวรัส พันธุ์ของมันฝรั่ง และสภาพแวดล้อม แต่การติดเชื้อของ PVA บนมันฝรั่งสามารถสร้างความเสียหาย และทำให้ผลผลิตของหัวลดลงได้ถึงร้อยละ 40 การติดเชื้อ PVA เพียงชนิดเดียวบนมันฝรั่ง มักไม่แสดงลักษณะอาการ แต่หากมีการพัฒนาของโรคอาจก่อให้เกิดปรากฏแสดงลักษณะอาการต่างแบบไม่รุนแรง (mild mosaic) ใบย่นเป็นคลื่น (rugosity) หรืออาจแสดงลักษณะอาการยอดแห้งตาย ในขณะที่มันฝรั่งจะมีการสูญเสียผลผลิตอย่างมาก หากมีการติดเชื้อร่วมกับไวรัสอื่น ได้แก่ PVX และ PVY

PVA มีการติดเชื้อและแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในมันฝรั่งที่ทำการเพาะปลูกในยุโรปและอเมริกาเหนือ และพบการติดเชื้อ-แพร่ระบาดได้น้อยกว่า PVY ในเขตอบอุ่น โดยพบการถ่ายทอดในธรรมชาติผ่านเพลี้ยอ่อนได้หลายชนิด เพลี้ยอ่อนที่สำคัญในการถ่ายทอดไวรัสได้แก่ *Aphis frangulae*, *Aulocorthum solani*, *Macrosiphum euphorbiae* และ *Myzus persicae* การถ่ายทอดของ PVA ผ่านทางเพลี้ยอ่อนแมลงพาหะ ก็มีลักษณะเช่นเดียวกับ potyvirus ชนิดอื่นๆ ซึ่งการถ่ายทอดจะขึ้นอยู่กับเอ็นไซม์ helper component proteinase ที่ไวรัสผลิตขึ้น และการมีลำดับของกรดอะมิโน DAG (aspartic acid – alanine - glycine) ในโปรตีนห่อหุ้ม ในขณะที่ไม่พบรายงานการถ่ายทอดผ่านเมล็ด

PVA มีกลุ่มพีชอาศัยอยู่ในพีชวงศ์ Solanaceae เช่น ยาสูบ และมันฝรั่ง เป็นต้น มีอนุภาคลักษณะท่อนยาวคด ขนาดความยาว 730 นาโนเมตร และความกว้างของอนุภาคมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11 นาโนเมตร สารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) มีขนาดความยาวประมาณ 10 กิโลเบส (Kekarainen et al., 1999) และมีการจัดเรียงตัวของยีนต่างๆ เป็นตำแหน่งตามลำดับเช่นเดียวกันกับ potyvirus อื่น ได้แก่ PVY

Potato virus X (PVX)

Potato virus X (PVX) จัดอยู่ใน genus Potexvirus ไอโซเลทส่วนใหญ่มักก่อให้เกิดปรากฏลักษณะอาการต่างไม่รุนแรง (mild mosaic) ที่ใบ หรืออาจไม่ปรากฏลักษณะอาการภายหลังการติดเชื้อ (symptoms) บนมันฝรั่ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพื้นที่บริเวณเพาะปลูกซึ่งมีระดับอุณหภูมิที่สูง โดยอาจทำให้เกิดการลดลงของผลผลิตในพืชประมาณร้อยละ 10 แม้ว่าจะพบปริมาณไวรัส (PVX) ในพืชที่มีการติดเชื้อในระดับที่สูงก็ตาม นับเป็นแหล่งของไวรัสที่สำคัญในการติดเชื้อแพร่ระบาดต่อไปในระดับแปลงเพาะปลูก แต่ PVX บาง strain สามารถติดเชื้อและชักนำให้เกิดลักษณะอาการแผลขีดแห้งตาย (necrotic streaks) ต่างอย่างรุนแรง (reverse mosaic) ใบแสดง

ลักษณะย่นเป็นคลื่น ไม่เรียบ (crinkling and rugosity) และอาจก่อให้เกิดความสูญเสียผลผลิตในระดับสูง ซึ่งผลผลิตอาจลดลงถึงร้อยละ 50 หากเกิดการติดเชื้อมาร่วมกับ PVY

PVX มีพืชอาศัยอยู่ในวงศ์ Solanaceae ได้แก่ มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum*) ลำโพง (*Datura stramonium*) ยาสูบ (*Nicotiana sp.*) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) และพืชนิยม (*Petunia sp.*) เป็นต้น

PVX เป็นไวรัสที่มีการถ่ายทอดโรคผ่านทางวิธีกล (mechanical inoculation) และมีการแพร่ระบาดในธรรมชาติ จากการสัมผัสกันระหว่างต้น จากต้นที่มีการติดเชื้อมาติดกับต้นปกติ การปนเปื้อนบนเครื่องมือ-อุปกรณ์ในแปลงเพาะปลูก ตลอดจนการปนเปื้อนหรือติดไปกับมนุษย์หรือวัสดุต่างๆ ที่ได้มีการสัมผัสกับพืชที่เป็นโรค หัวพันธุ์มันฝรั่ง (seed potato tubers) ที่ปกติ อาจได้รับการติดเชื้อในช่วงระยะเวลาระหว่างการเก็บรักษา โดยการสัมผัสกับหัวพันธุ์ที่มีการติดเชื้อ (infected tuber) แม้แต่การสัมผัสของรากก็อาจก่อให้เกิดการติดเชื้อไวรัสได้ในระดับแปลงปลูก แต่ก็มีได้เป็นสาเหตุที่สำคัญนัก

แม้พบปริมาณของไวรัส PVX สูงมากในพืชที่มีการติดเชื้อ แต่ไม่พบการถ่ายทอดไวรัสชนิดนี้ผ่านเพลี้ยอ่อน (aphids) ในขณะที่พบการถ่ายทอดผ่านเพลี้ยกระโดด (plant hopper) และแมลงปากกัดบางชนิด นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดไวรัสชนิดนี้จากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นปกติได้จากการสัมผัส (กัดกิน) โดยวิธีกล (mechanical contact) มีรายงานการถ่ายทอดไวรัสชนิดนี้ผ่านทางส่วนของซีสปอร์ (zoospore) ของรา *Synchytrium endobioticum* และก่อให้เกิดการติดเชือบนยาสูบ แต่ไม่พบการถ่ายทอดผ่านเมล็ดหรือละอองเกสร (true seed or pollen)

PVX เป็นไวรัสที่มีอนุภาคลักษณะท่อนยาวคด โดยมีการห่อหุ้มสารพันธุกรรมซึ่งเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) ด้วยโปรตีน โดยปราศจากการห่อหุ้มด้วยไขมัน (envelope) มีความยาวของอนุภาคอยู่ระหว่าง 470 – 580 นาโนเมตร และความกว้างของอนุภาคมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 นาโนเมตร อนุภาคมีองค์ประกอบของ RNA และโปรตีน คิดเป็นร้อยละ 6 และ 94 ตามลำดับ

อาร์เอ็นเอซึ่งเป็นสารพันธุกรรมของ PVX เป็นโมเลกุลที่มีลักษณะของสายเดี่ยว เส้นบวก (linear positive – sense ssRNA) ที่มีความยาว 6,435 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 5 open reading frames (ORFs) โดยมี methylated nucleotide cap m7G5 pppGpA และหาง Poly (A) ที่ปลาย 5' และ 3' ของ RNA ตามลำดับ ORF ของ PVX ที่มีการเรียงตัวอยู่บนสารพันธุกรรมที่เป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ประกอบด้วย ORF1 มีการแปลรหัสสารพันธุกรรมให้โปรตีนขนาด 166 กิโลดาลตัน ซึ่งทำหน้าที่ในกิจกรรมของเอนไซม์ RNA-dependent และ RNA polymerase (Morozov *et.al.*, 1990) ส่วน ORF 2, 3 และ 4 ที่เรียกว่า triple black แปลรหัสสังเคราะห์โปรตีน

ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนย้ายระหว่างเซลล์ (cell-to-cell movement) ของไวรัส (Lough *et. al.*, 1998; 2000) ซึ่งมีการทำงานร่วมกับส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) (Santa Cruz *et. al.*, 1998) และ ORF 5 มีการแปรรหัสให้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค โดย ORF ทั้งหมดของ PVX มีการจัดเรียงตามตำแหน่งบนสารพันธุกรรมอาร์เอ็นเอของไวรัส ในลักษณะเช่นเดียวกันกับไวรัสในสกุล (Genus Potexvirus)

Potato virus Y (PVY)

PVY ก่อให้ปรากฏลักษณะอาการได้ในหลายลักษณะทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของมันฝรั่ง และ strain ของ PVY ในมันฝรั่งพันธุ์ที่มีการเพาะปลูกทั่วไป มักแสดงลักษณะอาการ ใบด่างและปรากฏรอยแผลแห้งตาย (mottling and necrosis) และอาจมี ใบย่นเป็นคลื่น ต้นแสดงอาการ แคระแกรนหรือใบร่วง จากการติดเชื้อ PVY^O และ PVY^C strain ในขณะที่ PVY^N strain มักก่อให้เกิดมันฝรั่งแสดงลักษณะอาการด่างที่ใบ (mottling และ mosaic) มันฝรั่งมักแสดงลักษณะอาการที่รุนแรงอย่างมาก เมื่อมีการติดเชื้อไวรัสอื่นร่วมด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อร่วมกับ PVX ซึ่งมีรายงานความสูญเสียผลผลิตสูงถึงร้อยละ 80 ของผลผลิตที่คาดว่าจะได้รับ (de Bokx and Huttinga, 1981) PVY^{NTN} สาเหตุโรคที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อหัวมันฝรั่งซึ่งทำให้ปรากฏลักษณะอาการเป็นวงที่บริเวณผลในระยะเริ่มต้นและพัฒนาเป็นแผลไหม้แห้งจนเห็นได้อย่างชัดเจน ในระยะที่เก็บรักษาในโรงเก็บ

PVY เป็นไวรัสที่มีพืชอาศัยกว้างในธรรมชาติ ซึ่งพบปรากฏในพืชอย่างน้อย 41 ชนิด ใน 4 วงศ์ strain ต่างๆ ของ PVY มักปรากฏพบในมันฝรั่ง และพืชอื่นๆ ในวงศ์ Solanaceae สามารถถ่ายทอดไปยังพืชต่างๆ ได้มากกว่า 400 ชนิด ซึ่งโดยอาศัยวิธีการในการปลูกเชื้อบนยาสูบใบเล็ก (*Nicotiana glutinosa*) ให้ลักษณะอาการด่าง (mottling) แบบแพร่กระจายทั่วต้น โดยอาจมีระดับความรุนแรงที่ต่ำหรือสูงก็ได้ อาการที่แสดงบนยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana tabacum*) ปรากฏลักษณะของเส้นใบใส (vein clearing) และตามด้วยอาการด่าง (mottling) กับ PVY ทุก strain ยกเว้น PVY^N strain ซึ่งชักนำให้มันฝรั่งแสดงอาการแห้งตายที่เส้นใบ (veinal necrosis) ในขณะที่ลำโพง (*Datura stramonium*) ต้านทานและไม่ปรากฏลักษณะอาการกับ PVY ทุก strain

PVY มีการถ่ายทอดได้ในธรรมชาติผ่านทางเพลี้ยอ่อนได้มากกว่า 40 ชนิด โดยแตกต่างกันในประสิทธิภาพของการถ่ายทอดในแต่ละชนิด ซึ่งเพลี้ยอ่อนพาหะของ PVY ที่สำคัญ ได้แก่ *Macrosiphon euphorbiae*, *Aphis fabae*, *Myzus persicae* และ *Rhopalosiphoninus latysiphon* เป็นต้น ทั้งนี้ ความสามารถในการถ่ายทอดของเพลี้ยอ่อนนั้นยังขึ้นอยู่กับโปรตีน helper component และการมีกรดอะมิโน DAG (triplet) ในส่วนของโปรตีนห่อหุ้มของ PVY ด้วย

PVY มีอนุภาคของไวรัสลักษณะท่อนยาวคด ขนาดความยาว 730 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) ซึ่งห่อหุ้มด้วยโปรตีน โดยปราศจากการห่อหุ้มด้วยไขมัน (envelope) โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสประกอบขึ้นจากโปรตีนหน่วยย่อย (coat protein subunit) ขนาด 30 กิโลดาลตัน จากลำดับของกรดอะมิโน 267 ตัว ส่วนของพันธุกรรมอาร์เอ็นเอของไวรัสมีขนาดความยาวประมาณ 10 กิโลเบส

Potato leafroll virus (PLRV)

ลักษณะอาการที่แสดงออกของมันฝรั่งภายหลังการติดเชื้อ PLRV ใบอ่อนแสดงลักษณะอาการม้วนขึ้นเข้าหากันของขอบด้านข้าง สีซีดจาง โดยเฉพาะใบล่าง และกิ่งก้านใบมีการตั้งชูขึ้น ลักษณะอาการมีการพัฒนาต่อในส่วนของยอดที่มีลักษณะแคระแกรน และแข็งเกร็ง อาจมีบาดแผลแห้งตาย (necrosis) ในเนื้อเยื่อท่อลำเลียงอาหารในส่วนของลำต้นและก้านใบ พบการสร้าง callose จำนวนมากในท่อลำเลียงน้ำ ทั้งในส่วนของลำต้นและหัว พบการสะสมแป้งที่ใบเพิ่มสูงขึ้นกว่าปกติ 2 – 3 เท่า ในขณะที่แป้งในส่วนของหัวมีปริมาณลดลง ทั้งนี้เนื่องจากมีความเสียหายในส่วนท่อลำเลียงอาหาร และส่งผลกระทบต่อกระบวนการเคลื่อนย้าย ได้มีการให้ข้อสังเกตว่า อาจมิได้เป็นเพียงผลกระทบจากการเกิดแผลแห้งตาย (necrosis) ในเซลล์ท่อลำเลียงอาหารเท่านั้น แต่อาจเนื่องมาจากการขัดขวางของการเคลื่อนย้ายในลักษณะ photoassimilate จากส่วนของคลอโรพลาสต์ (chloroplast) ไปยังไซโตซอล (cytosol) โดยการทำงานของ triose-phosphate translocator (Riesmeier *et al.*, 1993) ซึ่งสามารถขัดขวางการเข้าสู่ท่อลำเลียงอาหาร (phloem) ของน้ำตาล (sucrose) ในมันฝรั่งที่เกิดการติดเชื้อ PLRV โดยโปรตีนที่ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายน้ำตาล (sucrose transporter protein) โดยทั่วไปมักไม่ปรากฏอาการที่หัว ซึ่งอาจพบได้ในมันฝรั่งบางพันธุ์ ได้แก่ Green Mountain และ Russet Burbank ที่พบอาการของ net necrosis ภายในหัว

ความเสียหายในผลผลิตอาจสูงถึงร้อยละ 50 หากเพาะปลูกมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อ PLRV ที่หัว และผลผลิตหัวที่ได้มีขนาดเล็กกว่าขนาดปกติ โดยพบการสูญเสียในระดับที่รุนแรงมากขึ้นหากติดเชื้อร่วมกับไวรัสชนิดอื่น เช่น PVX หรือ PVY

PLRV มีพืชอาศัยอยู่ในวงศ์ Solanaceae ได้แก่ ลำโพง (*Datura stramonium*) ก่อให้เกิดลักษณะอาการแผลแห้งตายบริเวณระหว่างเส้นใบ หรือใบบานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa*) ซึ่งไม่ได้อยู่ในวงศ์ Solanaceae ไวรัสชนิดนี้พบได้ทั่วโลกในทุกพื้นที่ที่ทำการเพาะปลูกมันฝรั่ง โดยเฉพาะพื้นที่บริเวณที่มีภูมิอากาศเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของพาหะ

PLRV มีการถ่ายทอดโรคในธรรมชาติผ่านทาง เพลี้ยอ่อน แมลงพาหะ ซึ่งมีรายงานการถ่ายทอดไวรัสนี้ได้เ็นเพลี้ยอ่อนหลายชนิด โดยเฉพาะ *Myzus persicae* นับเป็นชนิดที่มี

ความสำคัญที่มีประสิทธิภาพสูงในการถ่ายทอด ลักษณะโดยทั่วไปของการถ่ายทอดไวรัสชนิดนี้ผ่านทางเพลี้ยอ่อน จำเป็นต้องมีระยะพักตัวของไวรัสภายในแมลงพาหะก่อนการถ่ายทอดไวรัสไปยังต้นอื่นๆ (persistent manner) เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ทั้งนี้เพลี้ยอ่อนสามารถถ่ายทอดไวรัสได้ทั้งในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย และมีการคงอยู่ของไวรัสได้ตลอดอายุไขของเพลี้ยอ่อน แต่ไม่พบการถ่ายทอดไวรัสชนิดนี้ผ่านการปลูกเชื้อโดยวิธีกล เมล็ด เกสร ในขณะที่การติดตาม ทาบ กิ่ง สามารถถ่ายทอดไวรัสได้

อนุภาคของ PLRV มีลักษณะทรงกลม (isometric) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 24 นาโนเมตร และไม่มีชั้นไขมันห่อหุ้ม โดยประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกร้อยละ 30 และโปรตีนร้อยละ 70 โดยโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มมีขนาดน้ำหนัก 26.3 กิโลดาลตัน ส่วนของสารพันธุกรรมของไวรัสเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งมีขนาดความยาวประมาณ 6 กิโลเบส ไม่มี Poly (A) ที่ปลาย 3' ของ RNA ประกอบด้วย Open Reading Frame (ORF) จำนวน 8 แห่ง (Ashoub *et al.*, 1998)

ไวรัสสาเหตุโรคของมันฝรั่ง (potato viruses) ที่มีรายงานพบมากถึง 40 ชนิด (species) (Ryazantsev and Zavriev, 2009) มักประสบปัญหาและข้อจำกัดในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง เนื่องจากสาเหตุหลายประการ ได้แก่

1) การแสดงออกของอาการ (symptom expression) บนมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคมีลักษณะแพร่กระจายของอาการที่คล้ายคลึงกัน โดยเฉพาะการเกิดโรค-แพร่ระบาดในระดับแปลงปลูกของเกษตรกรมักเป็นการติดเชื้อก่อโรคร่วมกันของเชื้อโรคต่างๆ มากกว่าหนึ่งชนิด (mix infection) ทั้งนี้การแสดงอาการของโรคไวรัสอาจผันแปรไปตามระยะการเจริญเติบโต (growth stage) ของมันฝรั่ง และปัจจัยสภาพแวดล้อมที่ทำการเพาะปลูกโดยเฉพาะอุณหภูมิ เช่น *Potato leafroll virus* (PLRV; *Polerovirus*) ไวรัสบางชนิดที่มีการติดเชื้อบนมันฝรั่งไม่ปรากฏลักษณะอาการที่ชัดเจน (no conspicuous symptoms) ที่เอื้อต่อการตรวจ-จำแนก เช่น *Potato virus S* (PVS; *Carlavirus*) และ *Potato virus M* (PVM; *Carlavirus*) ในขณะที่ไวรัสบางชนิด เช่น *Potato yellow mosaic virus* (PYMV; *Begomovirus*) *Potato yellowing virus* (PYV; *Alfavirus*) และ *Potato virus M* (PVM; *Carlavirus*) ที่มีการติดเชื้อบนมันฝรั่งแต่ไม่ปรากฏแสดงอาการโรค (symptomless) ทำให้ไม่สามารถใช้ลักษณะอาการ (typical symptoms) ในการวินิจฉัยโรค-จำแนกไวรัสสาเหตุที่แท้จริง

2) การตรวจ-จำแนกไวรัสบางชนิดโดยอาศัยพืชทดสอบหรือพืชดัชนี โดยการปลูกเชื้อไวรัสหรือการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทางพาหะและสังเกตลักษณะอาการบนพืชทดสอบหรือพืชดัชนี ไวรัสบางชนิด เช่น *Potato yellow mosaic virus* (PYMV; *Begomovirus*) อาจไม่ปรากฏแสดงอาการบนพืชทดสอบหรือพืชดัชนี ดังนั้นการตรวจ-จำแนกไวรัสโดยวิธีนี้จำเป็นต้องอาศัยผลจาก

การวินิจฉัยเบื้องต้นก่อน และสามารถปฏิบัติใช้กับไวรัสบางชนิดเท่านั้น ซึ่งต้องใช้เวลาานาน (2-3 สัปดาห์) ภายหลังจากการปลูกเชื้อทดสอบ) อีกทั้งผลการจำแนกไวรัสที่ได้จากวิธีดังกล่าวอาจคลาดเคลื่อนจากเทคนิควิธีการปฏิบัติ และการวิเคราะห์จำแนกลักษณะอาการ

3) การตรวจสอบสัณฐานวิทยา (morphology) ของอนุภาคไวรัส ภายใตกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยทั่วไปสามารถตรวจ-จำแนกไวรัสได้ในระดับสกุล (genus) เท่านั้น ไม่สามารถจำแนกชนิด (species) ของไวรัสได้ ข้อจำกัดในทางปฏิบัติที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของไวรัส ได้แก่ ไวรัสบาง type ของ *Tobacco rattle virus* (TRV; *Tobravirus*) ไม่สร้างอนุภาคในพืชติดเชื้อ (non-virus particle-producing (NM) type) ไวรัสบางชนิดมีปริมาณอนุภาคต่ำในพืช เช่น *Potato mop top virus* (PMTV; *Pomovirus*) อนุภาคไวรัสในสกุล *Begomovirus* มักไม่คงทนในสภาพน้ำคั้นขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ดังนั้น การตรวจสอบโดยวิธีนี้ จึงไม่เหมาะในการตรวจ-จำแนกชนิดไวรัส และยังต้องปฏิบัติโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาสูง ค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบ และจำเป็นต้องปฏิบัติการโดยผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะทางเท่านั้น

4) การตรวจสอบไวรัส โดยเทคนิควิธีทางเซรุ่มวิทยา (serological methods) นับเป็นวิธีที่นิยมและปฏิบัติอย่างแพร่หลาย แต่ก็มีข้อจำกัดในประสิทธิภาพหลายประการ ได้แก่ (1) จำเป็นต้องมี แอนติบอดี (antibody) ที่จำเพาะต่อไวรัสที่ต้องการตรวจสอบ (detection) จึงจะสามารถตรวจสอบได้ ซึ่งไวรัสหลายชนิดไม่มีการผลิตและจำหน่ายแอนติบอดี (antibody) ที่มีจำเพาะ ส่วนแอนติบอดีที่มีการผลิตและจำหน่ายทางการค้าก็มีราคาสูงมาก (2) แอนติบอดี (antibody) ที่มีจำเพาะต่อไวรัส อาจไม่สามารถตรวจสอบไวรัสชนิดเดียวกันที่ต่าง isolates ได้ เนื่องจากความผันแปรทางพันธุกรรม (genetic variation) ภายในไวรัสชนิดนั้น เช่นกรณีของ *Potato virus V* (PVV; *Potyvirus*) (3) การปรากฏผลการตรวจสอบจาก “cross-reaction” ซึ่งเกิดจากการที่แอนติบอดีที่ใช้ในการตรวจสอบนั้น ให้ผลบวก (positive results) ในการตรวจสอบกับไวรัสชนิดอื่นที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน (closely relate) โดยทั่วไปมักเป็นไวรัสที่จัดอยู่ในสกุลเดียวกัน ส่งผลให้ไม่สามารถการตรวจ-จำแนกชนิดของไวรัสได้ และ (4) ในหลายกรณีที่เทคนิควิธีทางเซรุ่มวิทยามีความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบไม่เพียงพอทำให้ตรวจสอบไม่พบเนื่องจากปริมาณไวรัสในพืชต่ำเกินกว่าที่จะสามารถตรวจสอบ

การประยุกต์ใช้ PCR หรือ RT-PCR ในการตรวจสอบและจำแนกชนิดของไวรัสพืชนับว่าเป็นเทคนิควิธีการที่มีศักยภาพและมีประสิทธิภาพสูง (Candresse *et al.*, 1998) ซึ่งสามารถสังเคราะห์เพิ่มปริมาณ DNA product ตามขนาดที่คาดได้โดยตรง และสามารถตรวจสอบได้โดย gel electrophoresis โดยความจำเพาะเจาะจง (ความถูกต้องแม่นยำในการตรวจสอบและจำแนกชนิดของไวรัส) ขึ้นอยู่กับการออกแบบ primer การตรวจสอบไวรัสมันฝรั่งโดยอาศัยหลักวิธีการ

ของ reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ได้มีการศึกษาและรายงานในการประยุกต์ใช้ในลักษณะที่แตกต่างกันไปในไวรัสหลายชนิด (Singh *et al.*, 1996; Singh and Singh, 1998; Nie and Singh 2000; Peiman and Xie, 2006; Du *et al.*, 2006) ซึ่งจำเป็นที่จะต้องศึกษา-วิจัย ให้ได้รูปแบบและวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิดในแต่ละรูปแบบของการประยุกต์ใช้ โดยพิจารณาถึงความหลากหลายและความผันแปรทางพันธุกรรมของไวรัส เพื่อความถูกต้องแม่นยำในการตรวจสอบ



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคมันฝรั่งซึ่งแสดงลักษณะอาการที่คาดว่ามิสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส

ตัวอย่างโรคของมันฝรั่ง ได้จากการเก็บรวบรวมส่วนใบของมันฝรั่งแต่ละต้นที่แสดงอาการโรคติดเชื้อไวรัส นับเป็น 1 ตัวอย่างโรค โดยแหล่งของโรคที่ทำการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคได้จาก 3 แหล่งใหญ่ๆ ได้แก่

1.1 ตัวอย่างโรคที่ได้จากการสำรวจโรคที่มีการติดเชื้อไวรัส และเก็บรวบรวมตัวอย่างใบของมันฝรั่ง ในบริเวณแปลงเพาะปลูกของเกษตรกร พื้นที่จังหวัด เชียงใหม่ เชียงราย และตาก

1.2 ตัวอย่างโรคที่ได้จากการสังเกตลักษณะอาการโรคและเก็บรวบรวมตัวอย่างใบของมันฝรั่งที่ได้จากโครงการวิจัยฯ ได้ทำการเพาะปลูกในกระถาง (กระถางละ 1 ต้น) ภายใต้สภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (มุงตาข่าย) และภายนอกโรงเรือน ภายใต้สภาพธรรมชาติ ที่บริเวณแปลงปลูกพืชทดลองของภาควิชาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยแม่โจ้

1.3 ตัวอย่างโรคที่ได้จากการสังเกตลักษณะอาการโรคและเก็บรวบรวมตัวอย่างใบของมันฝรั่งที่ได้จากโครงการวิจัยฯ ได้ทำการเพาะปลูกบนแปลงเพาะปลูกทดลอง ภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ และสถาบันตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

การเก็บรวบรวมตัวอย่างใบมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการโรคติดเชื้อไวรัส ในสภาพแปลงเพาะปลูกของเกษตรกร (ข้อ 1.1) และในสภาพการเพาะปลูกทดลองในกระถาง ภายใต้สภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (มุงตาข่าย) และภายนอกโรงเรือน ภายใต้สภาพธรรมชาติ (ข้อ 1.2) และในสภาพการเพาะปลูกบนแปลงเพาะปลูกทดลอง ภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง (ข้อ 1.3) ของโครงการวิจัยฯ นั้น อาศัยลักษณะอาการจำเพาะของโรคไวรัสของมันฝรั่งที่มีการรายงาน และลักษณะอาการที่แสดงโดยทั่วไปของการติดเชื้อไวรัส ได้แก่ รูปแบบของลักษณะอาการที่แสดงออกแบบแพร่กระจายทั้งต้น (systemic symptom) หรือ อาจมีลักษณะแบบเฉพาะแห่ง (local symptom) โดยลักษณะอาการของโรคได้แก่ การแสดงความผิดปกติที่ใบ เช่น ใบต่างผิดรูปร่าง ย่น หัก เป็นคลื่น ม้วน เส้นใบไหม้ ขอบใบหยัก เป็นต้น โดยทั่วไปมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อมักมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ เช่น แคระแกรน ในพื้นที่บริเวณเพาะปลูกมักพบการระบาดของแมลงพาหะโรค เช่น แมลงหีขาว เพลี้ยอ่อน เป็นต้น

ใบมันฝรั่งตัวอย่างโรคที่ได้จากการเก็บรวบรวม จะได้รับการเก็บแยกแต่ละตัวอย่าง และเก็บรักษาในกล่องรักษาอุณหภูมิต่ำ (cooling box) ตลอดระยะเวลาระหว่างการเดินทางจนกว่าจะถึงห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างโรคแต่ละตัวอย่างจะได้รับการขึ้นทะเบียนตัวอย่างโรค โดยระบุหมายเลขตัวอย่าง (accession number) บันทึกรายงานลักษณะอาการที่สังเกตได้และบันทึกภาพทุกตัวอย่าง ก่อนทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C (Deep freezer) เพื่อนำไปใช้เป็นตัวอย่างเพื่อตรวจสอบหาไวรัสและหรือ ใช้เป็นแหล่งของไวรัส (source of inoculum) ในการปลูกเชื้อไวรัสไปยังมันฝรั่งปกติในการวิจัยนี้

2. การตรวจสอบและวินิจฉัยเบื้องต้น (preliminary detection and diagnosis) โดยอาศัยการแสดงลักษณะอาการของโรคบนมันฝรั่ง เพื่อการจำแนกโรคและไวรัสสาเหตุ

พิจารณาลักษณะอาการผิดปกติที่สามารถเห็นได้ด้วยตาเปล่า (macrosymptoms) บนมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส การพิจารณาลักษณะอาการที่แสดงออกแบบทั่วทั้งต้น เพื่อพิจารณาลักษณะของการเจริญเติบโต โดยการสังเกตและพิจารณาว่ามีลักษณะรูปร่างสัดส่วนและอัตราการเจริญเติบโตที่ปกติหรือไม่ และพิจารณาแยกเฉพาะส่วนของมันฝรั่ง ได้แก่ ส่วนของลำต้น ที่ส่วนยอด และส่วนโคนต้น ว่ามีลักษณะอาการที่สามารถจำแนกโรค และไวรัสสาเหตุ ได้หรือไม่ และที่สำคัญการแสดงออกของลักษณะอาการที่ใบ โดยเฉพาะใบอ่อน ซึ่งการติดเชื้อไวรัสมักแสดงลักษณะอาการแบบแพร่กระจาย (systemic symptom) ในลักษณะอาการ ใบต่าง ใบย่น ลักษณะเป็นคลื่น ใบหงิก ใบลดรูป ปรากฏรูปร่างผิดไปจากปกติ ใบเกร็ง เส้นใบปูดนูน เป็นต้น

การพิจารณาลักษณะอาการตัวอย่างโรคที่ทำการเก็บรวบรวม มีการปฏิบัติใน 3 ระดับ คือ 1) ระดับแปลงปลูกของเกษตรกร หรือ โรงเรือนเพาะปลูกพืชทดลอง 2) ระดับห้องปฏิบัติการวินิจฉัย และ 3) ภาพถ่ายที่ทำการบันทึกลักษณะอาการ ก่อนเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ -80°C

3. การตรวจสอบยืนยันไวรัสสาเหตุโรคที่มีการติดเชื้อบนมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการที่อาศัยหลักการของ polymerase chain reaction (PCR)

การตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อของไวรัสสาเหตุโรคบนมันฝรั่ง ในตัวอย่างใบมันฝรั่งที่รวบรวมได้ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80°C ในการวิจัยนี้ได้เลือกเทคนิควิธีการที่อาศัยหลักการของ polymerase chain reaction (PCR) และโดยเหตุที่ไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่งซึ่งโครงการวิจัยฯ ได้ พิจารณาและวางแผนการวิจัยเพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบวินิจฉัย จำนวน 4 ชนิดนั้น ได้แก่ *Potato virus A (PVA)*, *Potato virus X (PVX)*, *Potato virus Y (PVY)* และ *Potato leafroll virus*

(PLRV) ล้วนแล้วแต่เป็นไวรัสที่มี อาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (ssRNA) เป็นสารพันธุกรรม ดังนั้น เพื่อที่จะสามารถตรวจสอบยืนยันไวรัสสาเหตุโรคที่มีการติดเชื้อมันฝรั่งได้ โดยเทคนิควิธีการที่อาศัยหลักการของ polymerase chain reaction (PCR) จึงจำเป็นต้องทำการสังเคราะห์ สายแรกของดีเอ็นเอ (First strand DNA synthesis) จาก อาร์เอ็นเอสายเดี่ยวที่เป็นสารพันธุกรรมของไวรัสแต่ละชนิดให้ได้เสียก่อนจึงจะสามารถเข้าสู่ปฏิกิริยา PCR ในลำดับต่อไป

ในการวิจัยนี้ ได้ทำการตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสสาเหตุโรคมันฝรั่งในเบื้องต้น โดยเทคนิค-วิธีการ RT-PCR ด้วยคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ได้มีการตีพิมพ์เผยแพร่มาก่อนหน้า ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอไพรเมอร์ ดังแสดงรายละเอียดใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสสาเหตุโรคมันฝรั่งในเบื้องต้น

ดีเอ็นเอไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' – 3')	จำเพาะกับชนิดไวรัส	ขนาดของผลผลิต PCR (bp)	อ้างอิง
PV17	GTTGGAGAATTCAAGATCCTGG	PVA	255	R. P. Singh & M. Singh, 1998
PV18	TTTCTCTGC CACCTC ATCG			
PV19	(C/T)ACTGC AGGCGC AACTCC	PVX	565	M. Peiman & C. Xie, 2006
PV20	GTCGTTGGATTG(C/T)GCCCT			
PV7	ACGTCC AAAATGAGAATGCC	PVY	480	R. P. Singh <i>et al.</i> , 1996
PV8	TGGTGT TCG TGATGTGACCT			
PV9	CGCGCT AACAGAGTTCAGCC	PLRV	336	R. P. Singh <i>et al.</i> , 1995
PV10	GCA ATGGGGGTCCAATCAT			

4. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อมันฝรั่ง

ในการประยุกต์ใช้หลักการของ PCR เพื่อการตรวจสอบยืนยันไวรัสที่มีการติดเชื้อมันฝรั่ง มีความจำเป็นที่ต้องพัฒนาวิธีการในขั้นตอนต่างๆ ซึ่งได้แก่ (1) การเตรียมกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) จากใบมันฝรั่งตัวอย่างโรค (2) การออกแบบดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา reverse transcription (RT) และ polymerase chain reaction (PCR) ตลอดจนการให้ประสิทธิผลในการตรวจสอบ-จำแนกไวรัสที่มีการติดเชื้อมันฝรั่ง (3) การศึกษาสภาพการเกิดปฏิกิริยาและส่วนผสม-สัดส่วนที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา reverse transcription (RT) (4)การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วน DNA ใน polymerase chain reaction

ภายใต้สภาพการเกิดปฏิกิริยาและส่วนผสม-สัดส่วนที่เหมาะสม และ (5) gel electrophoresis และการวิเคราะห์ผล ที่มีความเหมาะสม และให้ประสิทธิผลในการใช้ตรวจสอบยืนยันชนิดของไวรัสสาเหตุโรคของมันฝรั่ง

4.1 วิธีการเตรียมกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) จากใบมันฝรั่ง

บดใบมันฝรั่งน้ำหนัก 150 มิลลิกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ A ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร จนละเอียด บรรจุใส่หลอด microcentrifuge และหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสแล้วเติมด้วย 1 เท่าปริมาตรของ chloroform ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 16,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนด้วย isopropanol โดยเก็บตะกอนหลังจากการหมุนเหวี่ยงที่ 16,000 xg เป็นเวลา 20 นาที ซึ่งผึ่งให้แห้งในอากาศก่อน นำไปละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE เพื่อใช้เป็นตัวตัวอย่างของกรดนิวคลีอิก ในขั้นตอนต่อไปของการตรวจสอบไวรัส

4.2 การออกแบบดีเอ็นเอไพรเมอร์

คู่มือดีเอ็นเอไพรเมอร์ สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 200-900 คู่เบส ได้ถูกพัฒนาและออกแบบในการศึกษาวิจัยนี้ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของพันธุกรรม PVA, PVX PVY และ PLRV ตามลำดับ ได้จากการสืบค้นและรวบรวมจากฐานข้อมูลออนไลน์ GenBank: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) โดยโปรแกรม PrimerSelect และ MegAlign ใน DNASTar biocomputing software (DNASTar, Inc.) และวิเคราะห์เปรียบเทียบความจำเพาะต่อไวรัส ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

4.3 ปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

RT เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ first-strand cDNA ที่จะใช้เป็นแม่แบบใน PCR ขั้นตอนต่อไป ซึ่งปฏิกิริยา RT มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ที่ 42 °C ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ oligo (dT)₂₄ หรือ specific DNA primer เป็น DNA primer (reverse) ซึ่งส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา มีดังต่อไปนี้

Template RNA (total RNA)	0.1-1.0 µg
Primer (oligo (dT) ₂₄)	100 pmol
5X reaction buffer	4 µl
RNase Inhibitor	20 U
dNTP mix (10 mM each)	2 µl
M-MuLV reverse transcriptase	200 U
DEPC – treated water	to 20 µl

4.4 การเพิ่มปริมาณชิ้น DNA โดย PCR

PCR เป็นปฏิกิริยาที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณชิ้นส่วน (fragment) ที่ต้องการ โดยใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้ (ในข้อ 4.3) เป็น DNA template ความจำเพาะเจาะจงในการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ได้จากการกำหนด-ออกแบบ คู่ DNA primer (ในข้อ 4.2) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ DNA แม่แบบ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ DNA polymerase ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา มีดังต่อไปนี้

Template DNA (cDNA)	2 µl
dNTP mix (2.5 mM each)	4 µl
10X reaction buffer	5 µl
Taq DNA polymerase	0.25 U
Forward primer (10 µM)	2 µl
Reverse primer (10 µM)	2 µl
Nuclease-free water	to 50 µl

Temperature cycle profile

94°C	เป็นเวลา	2	นาที	} 35 รอบ
94°C	เป็นเวลา	60	วินาที	
50-60°C	เป็นเวลา	60	วินาที	
72°C	เป็นเวลา	60	วินาที	
72°C	เป็นเวลา	5	นาที	

4.5 Agarose gel electrophoresis

ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) จะถูกนำมาพิจารณาและประเมินผลโดยการทำ electrophoresis ใน 2% agarose gel ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE โดยใช้ PCR product ตัวอย่างละ 10 µl หยดลงใน gel แต่ละหลุม ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 50 volts เป็นเวลานาน 100 นาที และย้อมแถบ DNA ด้วย ethidium bromide โดย de-stain ด้วยน้ำสะอาด ก่อนวิเคราะห์ – ประเมินผลการแสดงรูปแบบของแถบ DNA บน UV transilluminator

5. การทดสอบระบบการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง

การทดสอบระบบการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง จำนวน 4 ชนิดไวรัส ได้แก่ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) โครงการวิจัยฯ ได้ทำการทดสอบระบบการตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิด กับตัวอย่างโรคจากเนื้อเยื่อส่วนใบที่แสดงลักษณะอาการผิดปกติ จำนวนไม่ต่ำกว่า 400 ตัวอย่าง ในแต่ละชนิดของไวรัสที่ทำการตรวจสอบ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจสอบ ได้แก่ ความถูกต้องแม่นยำ ความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของไวรัส ความไวในการตรวจสอบ และการแสดงผลของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเหมาะสม และมีความจำเพาะเจาะจงสูงในการเกิดปฏิกิริยา

ในการทดสอบระบบการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่งของ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX) และ *Potato virus Y* (PVY) นั้น ได้ใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น DNA primer (reverse) ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ในขณะที่ ปฏิกิริยา reverse transcription ในกระบวนการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสในมันฝรั่งของ *Potato leafroll virus* (PLRV) ได้ใช้ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ออกแบบให้มีความจำเพาะเจาะจง (specific DNA primer) เป็น DNA primer (reverse) ของปฏิกิริยา

การทดสอบและคัดเลือกคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ ที่มีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาใน RT-PCR และมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เพื่อตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิด ปฏิบัติการโดยตรวจสอบเปรียบเทียบกับตัวอย่างกรดนิวคลีอิก ที่ได้จากการสกัดแยกจากเนื้อเยื่อใบของมันฝรั่งซึ่งผ่านการตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อ และการปราศจากการติดเชื้อไวรัสชนิดนั้นๆ ที่ต้องการตรวจสอบแล้ว ภายหลังการทดสอบ คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ ที่มีประสิทธิภาพในการเกิดปฏิกิริยาใน RT-PCR และมีประสิทธิภาพในการนำมาใช้เพื่อตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิดที่ได้รับการคัดเลือกข้างต้น จะถูกนำไปทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจสอบต่อไป

5.1 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA)

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) โดยการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'A05F': 5'-CGATTTAGGTACTGCTGGGACTCA-3' และ 'A04R': 5'-CCTGGGCATGTATGTTTCTC-3' สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของ *Potato virus A* (PVA) ที่ตำแหน่ง 8639-8662 และ 9066-9086 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ขนาด 448 คู่เบส ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 58^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากดีเอ็นเอแม่แบบ (first-strand cDNA) ที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ที่ 42^o ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น DNA primer (reverse)

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX)

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) โดยการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'X01F': 5'- TGCCGATCTCAAGCCACTCTCC -3' และ 'X02R': 5'- ACTGGGGTAGGCGTCGGTTATGTA -3' สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของ *Potato virus X* (PVX) ที่ตำแหน่ง 5594-5615 และ 6371-9394 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ขนาด 801 คู่เบส ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 58^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากดีเอ็นเอแม่แบบ (first-strand cDNA) ที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ที่ 42^o ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น DNA primer (reverse)

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY)

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) โดยการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'Y02F': 5'-TGAGAATGCAAA ACCAAC(A/C)CTTAG -3' และ 'Y03R': 5'- ATCCTC GGTGGTGTGCCTC -3' สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและ

ย้อนกลับ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของ *Potato virus Y* (PVY) ที่ตำแหน่ง 9014-9036 และ 9308-9326 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ขนาด 313 คู่เบส ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 58^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากดีเอ็นเอแม่แบบ (first-strand cDNA) ที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ที่ 42^o ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น DNA primer (reverse)

5.4 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato leafroll virus* (PLRV)

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato leafroll virus* (PLRV) โดยการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'R38F':5'-GCACGGCAGTATTCAAGAT-3' และ 'R32R': 5'-ACCACTGCCAATAGATGAGAC -3' สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของ *Potato leafroll virus* (PLRV) ที่ตำแหน่ง 5441-5459 และ 5625-5645 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ขนาด 205 คู่เบส ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 58^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากดีเอ็นเอแม่แบบ (first-strand cDNA) ที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ที่ 42^o ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ 'R32R': 5'-ACCACTGCCAATAGATGAGAC-3'

6. การพัฒนาระบบการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง

เพื่อให้เกิดประสิทธิผลสูงสุดในการตรวจสอบไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่ง 4 ชนิด ได้แก่ PVA, PVX, PVY และ PLRV จากเนื้อเยื่อใบของมันฝรั่ง โครงการวิจัยฯ จำเป็นต้องมีการปรับปรุงขั้นตอนต่างๆ ในการปฏิบัติตรวจสอบให้มีความเหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด เพื่อให้ได้ระบบของการตรวจสอบไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่งทั้ง 4 ชนิด การปรับปรุงวิธีการ ขั้นตอน ตลอดจนการปฏิบัตินั้น

มีอยู่หลายขั้นตอน ได้แก่ การเตรียมตัวอย่างโรคในส่วนใบของมันฝรั่ง การแยกสกัดกรดนิวคลีอิก (total nucleic acid; DNA and RNA) จากเนื้อเยื่อใบของมันฝรั่ง การทำปฏิกิริยาถอดรหัสแบบย้อนกลับ (reverse transcription) เพื่อการสังเคราะห์ cDNA ที่จะใช้เป็น DNA template ในขั้นตอนต่อไปของ PCR ตลอดจน การแสดงผลของรูปแบบแถบดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรสเจล ภายหลังการย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารเคมีที่สามารถเรืองแสงได้ภายใต้สภาพช่วงคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) โดยในทุกขั้นตอนในการปฏิบัติแล้วแต่มีความสำคัญและมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวิธีการดังกล่าวในการประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบไวรัส ดังนั้น ในการวิจัยนี้ จึงได้ศึกษา ทดลอง และเปรียบเทียบผลที่ผันแปรจากปัจจัยที่แตกต่าง เพื่อแสวงหาสภาพที่เหมาะสม เพื่อพัฒนาระบบการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น ทั้งในส่วนของความจำเพาะเจาะจง (specificity) และความไว (sensitivity) ในการตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิด

6.1 การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato virus A* จากเนื้อเยื่อใบ โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ A05F และ A04R และมีการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA

6.2 การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato virus X* จากเนื้อเยื่อใบ โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ X01F และ X02R และมีการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA

6.3 การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato virus Y* จากเนื้อเยื่อใบ โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ Y02F และ Y03R และมีการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA

6.4 การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato leafroll virus* (PLRV) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato leafroll virus* (PLRV) จากเนื้อเยื่อใบ โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ R38F และ R32R โดยใช้ R32R เป็นไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA

7. การพัฒนาระบบการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง

การพัฒนาระบบการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่งจากเนื้อเยื่อใบ ในหลอดทดลองเดี่ยวในครั้งเดียว โดยวิธี RT-PCR เพื่อการตรวจสอบไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ *Potato virus Y* (PVY) และ

Potato leafroll virus (PLRV) ในปฏิกิริยาเดียวกัน ด้วยคู่ไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ร่วมกับ R38F และ R32R โดยใช้ oligo (dT)₂₄ และ R32R เป็นไพรเมอร์ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA กับตัวอย่าง Acc No. S109 ซึ่งให้ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ PVY และ PLRV มาเป็นตัวอย่างในการตรวจสอบเพื่อการพัฒนากระบวนการวินิจฉัยโรคไวรัส



ผลการทดลอง

1. การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคมันฝรั่งซึ่งแสดงลักษณะอาการที่คาดว่ามิสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส

การเก็บรวบรวมตัวอย่างใบมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการโรคติดเชื้อไวรัส ในสภาพแปลงเพาะปลูกของเกษตรกร ในสภาพการเพาะปลูกทดลองในกระถาง ภายใต้สภาพโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (มุงตาข่าย) และภายนอกโรงเรือน ภายใต้สภาพธรรมชาติ และในสภาพการเพาะปลูกบนแปลงเพาะปลูกทดลอง ภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ของโครงการวิจัยฯ นั้น อาศัยลักษณะอาการจำเพาะของโรคไวรัสของมันฝรั่งที่มีการรายงาน และลักษณะอาการที่แสดงโดยทั่วไปของการติดเชื้อไวรัส ได้แก่ รูปแบบของลักษณะอาการที่แสดงออกแบบแพร่กระจายทั่วทั้งต้น (systemic symptoms) หรือ อาจมีลักษณะแบบเฉพาะแห่ง (local symptom) โดยลักษณะอาการของโรคได้แก่ การแสดงความผิดปกติที่ใบ เช่น ใบด่าง ผิดรูปร่าง ย่น หัก เป็นคลื่น ม้วน เส้นใบไหม้ ขอบใบหยัก เป็นต้น โดยทั่วไปมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อ มักมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ เช่น แคระแกรน ในพื้นที่บริเวณเพาะปลูกมักพบการระบาดของแมลงพาหะโรค เช่น แมลงหวี่ขาว เพลี้ยอ่อน เป็นต้น

ใบมันฝรั่งตัวอย่างโรคที่ได้จากการเก็บรวบรวม ตัวอย่างโรคแต่ละตัวอย่างจะได้รับการขึ้นทะเบียนตัวอย่างโรค โดยระบุหมายเลขตัวอย่าง (accession number) บันทึกรายงานลักษณะอาการที่สังเกตได้และบันทึกภาพทุกตัวอย่าง ก่อนทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °ซ (Deep freezer) เพื่อนำไปใช้เป็นตัวอย่างเพื่อตรวจสอบหาไวรัสและหรือ ใช้เป็นแหล่งของไวรัส (source of inoculum) ในการปลูกเชื้อไวรัสไปยังมันฝรั่งปกติในการวิจัยนี้

ตัวอย่างโรคมันฝรั่งซึ่งแสดงลักษณะอาการที่คาดว่ามิสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส ที่ได้จากการเก็บรวบรวม ตลอดระยะเวลาที่ทำการวิจัยเป็นเวลา 2 ปี ซึ่งจำแนกตามแหล่งของตัวอย่าง มีปริมาณ (จำนวน) 1,120 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 2 โดยปีที่ 1 ของการวิจัยนั้น โครงการวิจัยฯ ได้มุ่งเน้นและให้ความสำคัญกับโรคไวรัสที่เกิดกับมันฝรั่งและมีการแพร่ระบาดในพื้นที่เพาะปลูกของเกษตรกรในหลายพื้นที่ที่เป็นแหล่งผลิตใหญ่ของมันฝรั่ง ได้แก่ พื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และตาก ซึ่งจากการสำรวจและเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยมีการดำเนินการและปฏิบัติอย่างต่อเนื่องตลอดการวิจัยในปีที่ 1 (2550-2551) โดยเฉพาะช่วงฤดูเพาะปลูก (เดือนพฤศจิกายน ถึง เดือน กุมภาพันธ์) ในบริเวณพื้นที่การเพาะปลูกมันฝรั่ง จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และตาก และฤดูฝน ในพื้นที่เพาะปลูกจังหวัดตาก ดังแสดงในภาพที่ 1 ทำให้สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคที่คาดว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัสของมัน

ฝรั่งจากแปลงเพาะปลูกของเกษตรกรได้ จำนวน 440 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) ขณะเดียวกันในปีแรกของการวิจัย โครงการได้ทำการเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพโรงเรือนเพาะปลูกพืช (มุ้งตาข่าย) และ ภายนอกโรงเรือนเพาะปลูกพืชภายใต้สภาพธรรมชาติ บริเวณแปลงปลูกพืชทดลอง ภาควิชาอารักขาพืช มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้มีการดำเนินการและปฏิบัติอย่างต่อเนื่องตลอดการวิจัยในปีที่ 1 (2550-2551) ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยใช้หัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าที่ผ่านการตรวจสอบ-รับรองการปลอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรค และหัวพันธุ์มันฝรั่งที่ได้จากการปลูกของเกษตรกรในฤดูปลูกก่อนหน้านี้ และเก็บรักษาในห้องเย็นที่ระดับอุณหภูมิ 2-4 °C เป็นระยะเวลา 8-9 เดือนก่อนนำมาใช้เป็นหัวพันธุ์เพื่อการเพาะปลูก และสามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคที่คาดว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัสของ มันฝรั่งจากการปลูกทดลองทั้งภายใต้สภาพโรงเรือนเพาะปลูกพืช (มุ้งตาข่าย) และ ภายนอกโรงเรือนเพาะปลูกพืชภายใต้สภาพธรรมชาติ ได้ จำนวน 250 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ปริมาณตัวอย่างโรคมันฝรั่งซึ่งแสดงลักษณะอาการที่คาดว่าจะมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส ที่ได้ดำเนินการในปีที่ 1 และ ปีที่ 2 ของโครงการ (2550 - 2552)

แหล่งของตัวอย่างโรค	ปริมาณจำนวนตัวอย่างโรค (ตัวอย่าง)	
	ปีที่ 1 (2550-2551)	ปีที่ 2 (2551-2552)
แปลงเพาะปลูกของเกษตรกร		
- พื้นที่จังหวัดเชียงใหม่	250	80
- พื้นที่จังหวัดเชียงราย	90	-
- พื้นที่จังหวัดตาก	100	-
การเพาะปลูกมันฝรั่งทดลอง (โครงการ)		
- ภายในโรงเรือนเพาะปลูกพืช (มุ้งตาข่าย)	150	-
- ภายนอกโรงเรือนเพาะปลูกพืช	100	-
- ภายในโรงเรือนเพาะปลูกพืช (โรงเรือนกระจก)	-	350
รวม	690	430



ภาพที่ 1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคไวรัสของมันฝรั่ง ในบริเวณแปลงเพาะปลูกของเกษตรกร ปี
เพาะปลูก 2550-2551 ก) ส่วนหนึ่งของพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ข) ส่วนหนึ่งของพื้นที่
จังหวัดเชียงราย ค) ส่วนหนึ่งของพื้นที่จังหวัดตาก ง) คณะสำรวจและเก็บรวบรวม
ตัวอย่างโรคไวรัสของมันฝรั่ง



ภาพที่ 2 การเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพการทดลองในกระถางหรือถุงปลูกพลาสติก ภายในและภายนอกโรงเรือนปลูกพืชทดลอง (มุ้งตาข่าย) บริเวณแปลงปลูกพืชทดลอง ภาควิชา อารักขาพืช มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ก) การเตรียมวัสดุปลูก ข) บริเวณเพาะปลูกภายในและภายนอกโรงเรือนปลูกพืชทดลอง

ในปีที่ 2 ของการวิจัย โครงการวิจัยฯ ได้มุ่งเน้นและให้ความสำคัญกับการแสดงลักษณะอาการในความผิดปกติอันมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสต่างๆ ในมันฝรั่งเพื่อการตรวจสอบเชื้อไวรัส และการวินิจฉัยโรคเบื้องต้น โดยทำการเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพการควบคุมบนแปลงเพาะปลูกทดลอง ภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ และสถาบันตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้มีการดำเนินการและปฏิบัติอย่างต่อเนื่องตลอดการวิจัยในปีที่ 2 (2551-2552) ดังแสดงในภาพที่ 3 ทำให้สามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคที่คาดว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัสของมันฝรั่งจากการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางหัวพันธุ์มันฝรั่งที่ได้จากการปลูกของเกษตรกรในฤดูปลูกก่อนหน้านี้ จำนวน 350 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2) ขณะเดียวกัน โครงการวิจัยฯ ยังคงให้ความสำคัญกับโรคไวรัสที่เกิดกับมันฝรั่งและมีการแพร่ระบาดในพื้นที่เพาะปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ที่เป็นแหล่งผลิตใหญ่ของมันฝรั่ง ซึ่งได้แก่ พื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งของเกษตรกรในจังหวัดเชียงใหม่ และสามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคที่คาดว่าเกิดจากการติดเชื้อไวรัสของมันฝรั่งจากแปลงเพาะปลูกของเกษตรกรได้ จำนวน 80 ตัวอย่าง (ตารางที่ 2)

2. การตรวจสอบและวินิจฉัยเบื้องต้น (preliminary detection and diagnosis) โดยอาศัยการแสดงลักษณะอาการของโรคบนมันฝรั่ง เพื่อการจำแนกโรคและไวรัสสาเหตุ

โดยอาศัยการแสดงลักษณะอาการของโรคติดเชื้อไวรัสที่ปรากฏหรือมีการแสดงออกในความผิดปกติบนมันฝรั่ง โดยเฉพาะการแสดงอาการของโรคแบบแพร่กระจาย (systemic symptoms) การพบประชากรแมลงพาหะไวรัสหนาแน่นสูงในพื้นที่เพาะปลูก และรูปแบบการแพร่ระบาดในระดับแปลงเพาะปลูก ตลอดจนการอ้างอิงจากรายงานลักษณะอาการของโรคติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดที่แตกต่างกันบนมันฝรั่ง ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงหรือใกล้เคียงกันมากในลักษณะอาการที่แสดงออกโดยเฉพาะที่ส่วนใบ ทำให้ยากแก่การที่จะนำลักษณะอาการของโรคมาใช้ในการจำแนกโรคเพื่อการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่งในเบื้องต้น โดยพบว่า ลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสบนมันฝรั่ง มักมีความผันแปรในระดับความรุนแรงของการแสดงออกของอาการ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์ของมันฝรั่ง คุณภาพของหัวพันธุ์มันฝรั่งในการปราศจากไวรัสสาเหตุโรค หรือมีการติดเชื้อไวรัสและสามารถเป็นแหล่งของไวรัสในการแพร่ระบาดได้ในแปลงปลูกอย่างรวดเร็ว การติดเชื้อไวรัสบนมันฝรั่งต้นหนึ่งๆเพียงชนิดเดียวหรือการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิด อายุของมันฝรั่งในช่วงระยะเวลาของการติดเชื้อและพัฒนาการของโรคภายใต้สภาพแวดล้อมที่แตกต่าง เช่น ฤดูกาล ระดับอุณหภูมิ ตลอดจนการระบาดของประชากรแมลง



ภาพที่ 3 การเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพการควบคุมบนแปลงเพาะปลูกทดลอง ภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ และสถาบันตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้มีการดำเนินการและปฏิบัติอย่างต่อเนื่องตลอดการวิจัยในปีที่ 2 (2551-2552) ก) การเตรียมแปลงและวัชระยะหลุมปลูก ข) การปลูกมันฝรั่งด้วยหัวพันธุ์ ค) มันฝรั่งที่เจริญเติบโต ง) การวินิจฉัยโรคในเบื้องต้นโดยอาศัยลักษณะอาการในความผิดปกติอันมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสต่างๆ



ภาพที่ 4 การเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพการควบคุมบนแปลงเพาะปลูกทดลอง ภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ และสถาบันตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้มีการดำเนินการและปฏิบัติอย่างต่อเนื่องตลอดการวิจัยในปีที่ 2 (2551-2552) การศึกษาลักษณะอาการโดยการบันทึกภาพถ่าย ก) และ ค) และการจดบันทึก ข) และ ง) เพื่อการวินิจฉัยโรคไวรัสในเบื้องต้น และการตรวจทานเปรียบเทียบผลการวินิจฉัย (double check)



ภาพที่ 5 การเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพการควบคุมบนแปลงเพาะปลูกทดลอง ภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ และสถาบันตรวจสอบคุณภาพและมาตรฐานผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ได้มีการดำเนินการและปฏิบัติอย่างต่อเนื่องตลอดการวิจัยในปีที่ 2 (2551-2552) การศึกษาลักษณะอาการโดยการบันทึกภาพถ่าย ก) ผลผลิตหัวมันฝรั่งของแต่ละต้น ข) การเก็บข้อมูล จำนวนหัว น้ำหนักรวม และลักษณะของหัว ค) หัวมันฝรั่งที่แสดงลักษณะผิดปกติ และ ง) ใบของมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการของโรคที่ติดเชื้อไวรัส

พาหะ ได้แก่ เพลี้ยอ่อน ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยในการก่อให้เกิดความผันแปรในระดับความรุนแรงในการแสดงออกของลักษณะอาการของโรค และยังปรากฏลักษณะอาการที่หลากหลายแต่มีความคล้ายคลึงกันมากด้วยปัจจัยดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้ อาจพบมีการแสดงอาการต่างที่ไม่รุนแรงหรืออาจไม่ปรากฏลักษณะอาการผิดปกติใดๆ เลย ในมันฝรั่งที่ตรวจสอบยืนยันพบการติดเชื้อของ PVA ในภายหลัง การแสดงลักษณะอาการใบม้วนของมันฝรั่งที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ PLRV ซึ่งมีลักษณะอาการที่คล้ายคลึงกับการแสดงออกในความผิดปกติที่เกิดจากสาเหตุอื่น เป็นต้น

การตรวจสอบและวินิจฉัยโรคเบื้องต้น โดยอาศัยการแสดงลักษณะอาการนั้น พบว่า การที่ลักษณะอาการของโรคไวรัสนั้นมีลักษณะแพร่กระจายทั่วทั้งต้น (systemic symptom) และลักษณะอาการที่มีการรายงานนั้น ยากต่อการนำมาใช้ในการจำแนกโรคและสาเหตุโรค ยิ่งไปกว่านั้น การติดเชื้อหรือแสดงลักษณะอาการของโรค ในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร และในสภาพแปลงเพาะปลูกทดลองในกระถาง มักปรากฏลักษณะอาการร่วมกัน เช่น ใบด่าง หักงอ เส้นใบผิดปกติ ใบรูปร่างผิดปกติ ต้นแคระแกรน ทำให้ลักษณะอาการของตัวอย่างโรคส่วนใหญ่ ไม่สามารถจำแนกโรคและไวรัสสาเหตุโรคได้อย่างถูกต้องแม่นยำโดยวิธีซึ่งอาศัยการแสดงลักษณะอาการของโรค

อย่างไรก็ตาม ลักษณะที่พบได้ในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร โรงเรือนปลูกพืชทดลอง (มุงตาข่าย) และโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง พอสรุปได้โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มอาการดังนี้

- ลักษณะอาการ แคระแกรนของต้นมันฝรั่ง
- ลักษณะอาการ ใบผิดปกติ และ/หรือขอบใบหยัก
- ลักษณะอาการ ใบลดรูป มีขนาดเล็กกว่าปกติ มักปรากฏที่ใบอ่อน ใบยอด
- ลักษณะอาการใบด่าง ทั้งที่ปรากฏขอบเขตต่างชัดเจน (mosaic) และที่ไม่ปรากฏขอบเขตต่างชัดเจน (mottle)
- ลักษณะอาการใบหัก ย่น ลักษณะเป็นคลื่นไม่เรียบ
- ลักษณะอาการใบม้วน ก้านชี้ชันขึ้นกว่าปกติ ร่วมกับลักษณะเกร็งของทั้งต้น
- ลักษณะอาการปรากฏที่บริเวณเส้นใบ ปลาย หรือ ใต้ หรือแสดงอาการแผลแห้งตาย (necrosis) ที่เส้นใบ โดยเฉพาะเส้นกลางใบ

ทั้งนี้ ลักษณะอาการของตัวอย่างโรคของมันฝรั่งแต่ละตัวอย่างที่ได้รับการขึ้นทะเบียนตัวอย่างโรคโดยระบุหมายเลขตัวอย่าง (accession number) บันทึกรายงานลักษณะอาการที่สังเกตได้และบันทึกภาพทุกตัวอย่าง ก่อนทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อนำไปตรวจสอบยืนยันชนิดของไวรัสที่สำคัญบางชนิด ได้แก่ PVA, PVS, PVX, PVY และ PLRV ที่มีการติดเชื้อ

สาเหตุโรคที่ก่อให้เกิดปรากฏลักษณะอาการที่ผิดปกติบนมันฝรั่งโดยเทคนิควิธีการที่อาศัยหลักการของ reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) ต่อไป

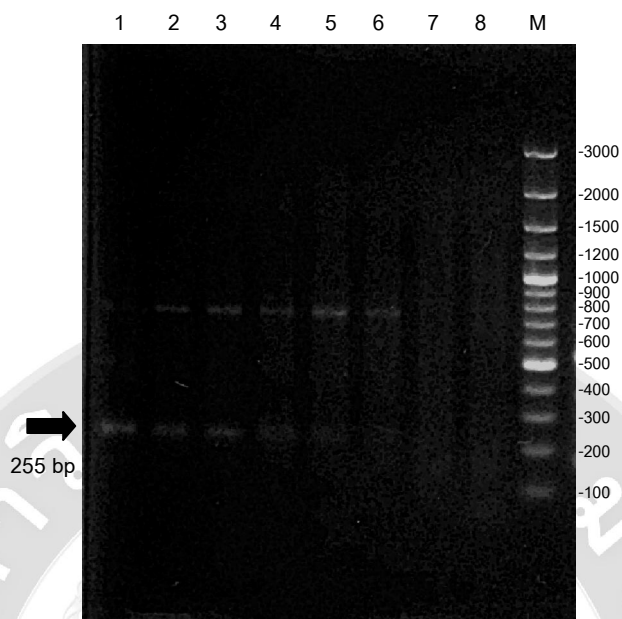
3. การตรวจสอบยืนยันไวรัสสาเหตุโรคที่มีการติดเชื้อบนมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการที่อาศัยหลักการของ polymerase chain reaction (PCR)

การตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคที่สำคัญบนมันฝรั่งจากตัวอย่างใบมันฝรั่งที่เก็บรวบรวมได้ โดยเทคนิควิธีการที่อาศัยหลักการของ polymerase chain reaction (PCR) จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) ด้วยคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ได้มีการตีพิมพ์เผยแพร่มาก่อนหน้า ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอไพรเมอร์ ดังแสดงรายละเอียดใน ตารางที่ 1 ภายหลังจากการสังเคราะห์ สายแรกของดีเอ็นเอ ด้วยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นดีเอ็นเอไพรเมอร์ในปฏิกิริยา RT

3.1) การตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง และการพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้มีความไวสูงสุดและเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้

ผลการตรวจสอบการติดเชื้อ PVA ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง โดยอาศัยหลักการวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV17 และ PV18 (ตารางที่ 1) โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) แสดงให้เห็นว่า มีการติดเชื้อ PVA ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง หมายเลข Acc No. 025 โดยให้ DNA fragment ขนาด 255 bp ดังแสดงในภาพที่ 6

การพัฒนาวิธีการเพื่อการประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส โดยการเปรียบเทียบปริมาณของ oligo (dT)₂₄ ที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ให้ผลการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน โดยให้ผลในแนวโน้มของความไวที่สูงขึ้น เมื่อใช้ oligo (dT)₂₄ ในปริมาณที่ลดต่ำลง และพบว่าแถบ DNA ขนาด 255 bp มีความเข้มสูงสุดที่ ระดับ oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 6.3 pmol (lane 1) ดังแสดงในภาพที่ 6 การใช้ oligo (dT)₂₄ ในปริมาณตั้งแต่ 150.0 pmol ขึ้นไป ใน 10- μ l RT mixture ไม่สามารถนำมาใช้ตรวจสอบไวรัส เนื่องจากไม่ปรากฏแถบ DNA ขนาด 255 bp (lane 7 and 8) ในขณะที่ การตรวจสอบการติดเชื้อ PVA จากเนื้อเยื่อใบโดยอาศัยหลักการวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV17 และ PV18 มีความไวต่ำ (low sensitivity) ในการตรวจสอบ (ระดับความเข้มของแถบ DNA ขนาด 255 bp ต่ำ) และปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 700-800 bp ซึ่งไม่จำเพาะเจาะจงต่อ PVA แสดงถึงความไม่จำเพาะเจาะจงต่อ PVA ในการตรวจสอบ



ภาพที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส หมายเลข Acc No. 025 โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV17 และ PV18 โดยใช้ oligo (dT)₂₄ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 6.3 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 2: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 12.5 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 3: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 18.8 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 4: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 25.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 5: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 50.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 6: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 100.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 7: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 150.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

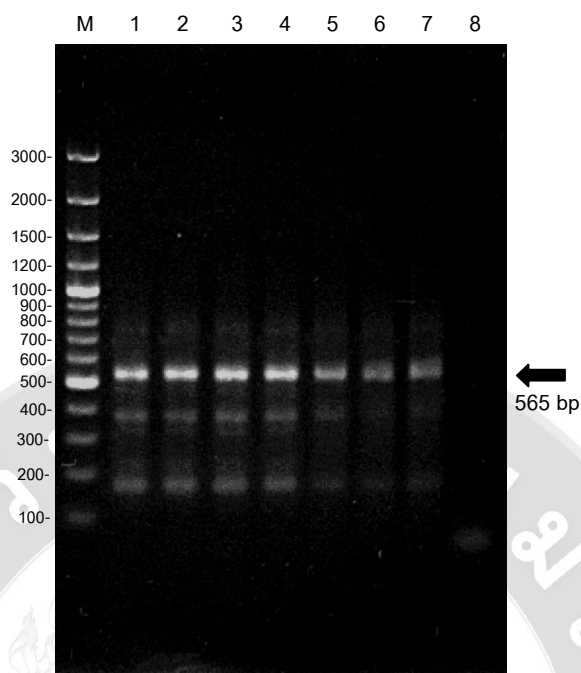
Lane 8: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 200.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

3.2) การตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อ *Potato virus X* (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง และการพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้มีความไวสูงสุดและเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้

ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า การตรวจสอบโดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV19 และ PV20 (ตารางที่ 1) โดยใช้ oligo (dT)₂₄ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) กับตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส หมายเลข Acc No. 025 ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ โดยให้ DNA fragment ขนาด 565 bp แต่ยังปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ (nonspecific DNA band) จำนวน 7-8 แถบ ในปริมาณที่เบาบาง (minor band) ซึ่งมีขนาดอยู่ในระหว่าง 200-800 bp (ภาพที่ 7) และการพัฒนาวิธีการ โดยการเปรียบเทียบปริมาณของ oligo (dT)₂₄ ที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ให้ผลในแนวโน้มของความไวที่สูงขึ้น โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 565 bp ซึ่งจำเพาะต่อ PVX เพิ่มขึ้น เมื่อใช้ oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 6.3-25.0 pmol ใน 10- μ l RT mixture และให้ความเข้มข้นของแถบสูงที่สุดที่ ปริมาณ 18.8 pmol ของ oligo (dT)₂₄ ใน 10- μ l RT mixture (ภาพที่ 7, lane 3) การปรากฏแถบ DNA ขนาดประมาณ 200-800 bp ที่นอกเหนือจากแถบดีเอ็นเอ ขนาด 565 bp แสดงถึงความไม่จำเพาะเจาะจงต่อ PVA ในการตรวจสอบ

3.3) การตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง และการพัฒนาวิธีการตรวจสอบให้มีความไวสูงสุดและเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้

ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า การตรวจสอบโดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV7 และ PV8 (ตารางที่ 1) โดยใช้ oligo (dT)₂₄ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) กับตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส หมายเลข Acc No. 025 ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ โดยให้ DNA fragment ขนาด 480 bp และการพัฒนาวิธีการ โดยการเปรียบเทียบปริมาณของ oligo (dT)₂₄ ที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ให้ผลในแนวโน้มของความไวที่สูงขึ้นเมื่อมีการใช้ oligo (dT)₂₄ ในปริมาณที่ต่ำลง ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) (ภาพที่ 8) การปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 480 bp เพียงแถบเดียว แสดงถึงความจำเพาะเจาะจงต่อ PVY ในการตรวจสอบ



ภาพที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส หมายเลข Acc No. 025 โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV19 และ PV20 โดยใช้ oligo (dT)₂₄ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 6.3 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 2: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 12.5 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 3: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 18.8 pmol ใน 10-ul RT mixture

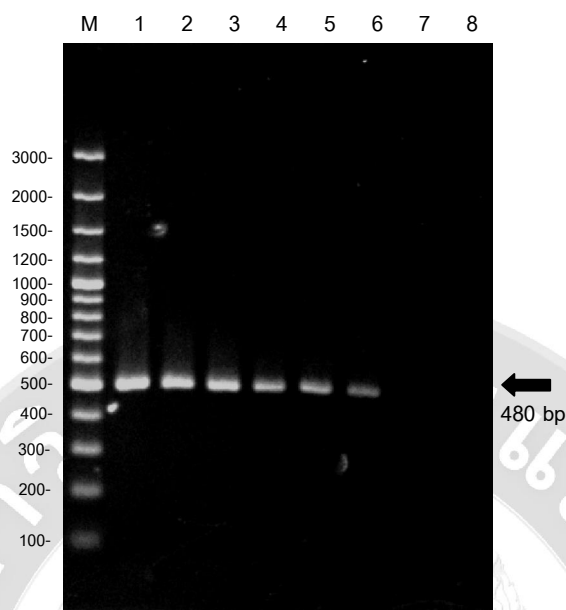
Lane 4: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 25.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 5: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 50.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 6: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 100.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 7: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 150.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 8: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 200.0 pmol ใน 10-ul RT mixture



ภาพที่ 8 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส หมายเลข Acc No. 025 โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV7 และ PV8 โดยใช้ oligo (dT)₂₄ ในปริมาณที่แตกต่างกันในช่วง 6.3 – 200.0 pmol (lane 1- 8) เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 6.3 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 2: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 12.5 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 3: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 18.8 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 4: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 25.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 5: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 50.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 6: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 100.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

Lane 7: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 150.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

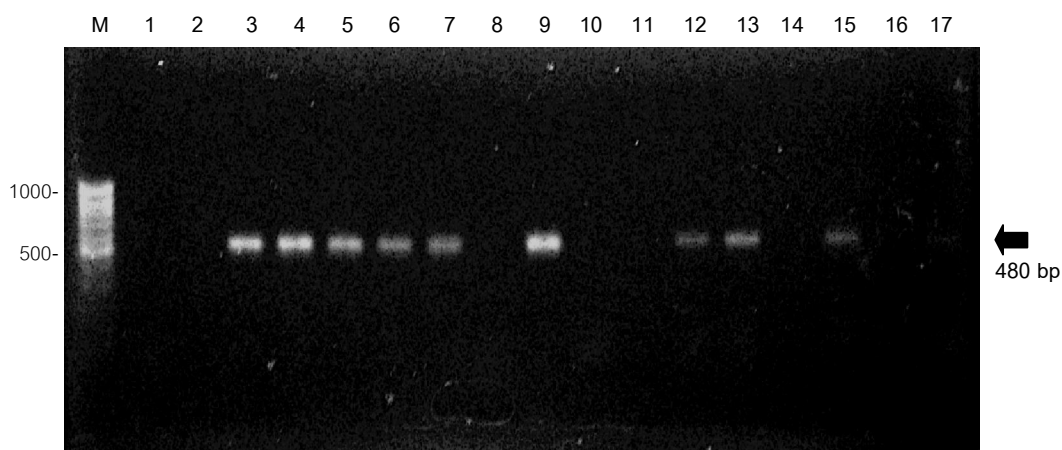
Lane 8: oligo (dT)₂₄ ปริมาณ 200.0 pmol ใน 10-ul RT mixture

3.4) การตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส

ผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 17 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV7 และ PV8 (ตารางที่ 1) โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription แสดงให้เห็นว่า การตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) โดยวิธีการระดับโมเลกุลมีประสิทธิภาพสูง ทั้งความไว (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อชนิดของไวรัส ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำสูง (ภาพที่ 9) จากตัวอย่างโรคทั้งหมด จำนวน 17 ตัวอย่าง (lane 1-17) พบว่า มีการติดเชื้อ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่งจำนวน 9 ตัวอย่าง (ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 480 bp) ได้แก่ ตัวอย่าง Acc No S286, S287, S288, S289, S290, S292, S295, S296 และ S299 ใน lane 3, 4, 5, 6, 7, 9, 12, 13 และ 15 ตามลำดับ และไม่พบการติดเชื้อ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่งจำนวน 8 ตัวอย่าง (ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 480 bp) ได้แก่ ตัวอย่าง Acc No S284, S285, S291, S293, S294, S297, S300 และ S301 ใน lane 1, 2, 8, 10, 11, 14, 16 และ 17 ตามลำดับ

3.5) การตรวจสอบ *Potato leaf roll virus* (PLRV) ในตัวอย่างใบมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส

ผลการตรวจสอบ *Potato leaf roll virus* (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการใบม้วน (leaf roll) จำนวน 7 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่าง Acc No S109, S234, S311, S316, S317, S335 และ S344 ดังแสดงในภาพที่ 10 โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV9 และ PV10 (ตารางที่ 1) โดยใช้ PV10 เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription แสดงให้เห็นว่า การตรวจสอบ *Potato leaf roll virus* (PLRV) โดยวิธีการระดับโมเลกุลมีประสิทธิภาพในความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อชนิดของไวรัส ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ แต่มีความไวต่ำในการตรวจสอบ จากภาพที่ 11 ตัวอย่างโรคทั้งหมด จำนวน 7 ตัวอย่าง (lane 1-7) พบว่า มีการติดเชื้อ *Potato leafroll virus* (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่งจำนวน 1 ตัวอย่าง (ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 335 bp) ได้แก่ ตัวอย่าง Acc No S109 ใน lane 1 ตามลำดับ และไม่พบการติดเชื้อ *Potato leaf roll virus Y* (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่งจำนวน 6 ตัวอย่าง (ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 336 bp) ได้แก่ ตัวอย่าง Acc No S234, S311, S316, S317, S335 และ S344 ใน lane, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ



ภาพที่ 9 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 17 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV7 และ PV8 โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: Acc No S284

Lane 2: Acc No S285

Lane 3: Acc No S286

Lane 4: Acc No S287

Lane 5: Acc No S288

Lane 6: Acc No S289

Lane 7: Acc No S290

Lane 8: Acc No S291

Lane 9: Acc No S292

Lane 10: Acc No S293

Lane 11: Acc No S294

Lane 12: Acc No S295

Lane 13: Acc No S296

Lane 14: Acc No S297

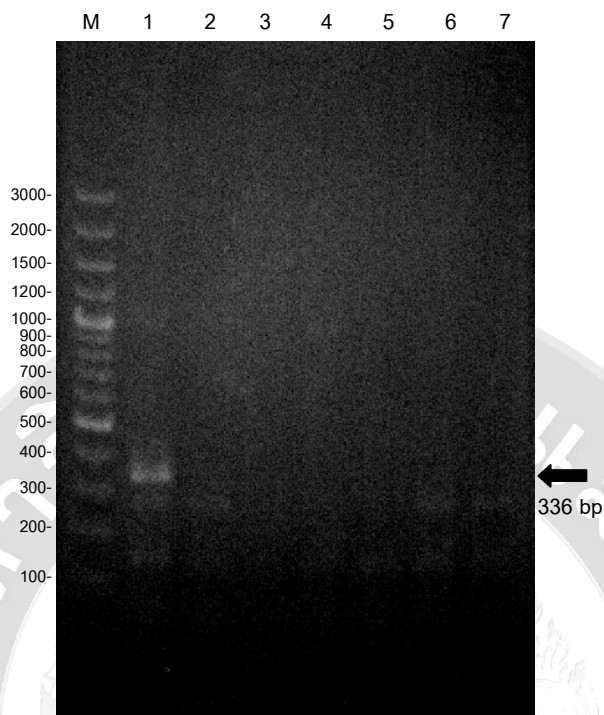
Lane 15: Acc No S299

Lane 16: Acc No S300

Lane 17: Acc No S301



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะอาการใบม้วน (leaf roll) ของมันฝรั่งที่การตรวจสอบลักษณะเบื้องต้น คาดว่ามีสาเหตุจากการติดเชื้อ *Potato leaf roll virus* (PLRV) ในตัวอย่างโรคมันฝรั่ง จำนวน 7 ตัวอย่าง ซึ่งนำมาทำการตรวจสอบไวรัส โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV9 และ PV10



ภาพที่ 11 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato leaf roll virus* (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 7 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV9 และ PV10 โดยใช้ PV10 เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: Acc No. S109

Lane 2: Acc No. S234

Lane 3: Acc No. S311

Lane 4: Acc No. S316

Lane 5: Acc No. S317

Lane 6: Acc No. S335

Lane 7: Acc No. S344

4. การพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง

4.1 วิธีการเตรียมกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) จากมันฝรั่ง

บดเนื้อเยื่อตัวอย่างมันฝรั่งน้ำหนัก 150 มก. ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับการสกัด ปริมาตร 1,500 ไมโครลิตร ซึ่งมีส่วนผสมของ Tris-Cl, ที่ pH 8.0 ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ NaCl ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ EDTA ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และ SDS ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จนละเอียด แล้วนำน้ำคั้นบดที่ได้หมุนเหวี่ยงที่ระดับ 10,000 xg เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสแล้วเติมด้วยคลอโรฟอร์มปริมาตร 1 เท่าของน้ำใส ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ระดับ 16,000 xg เป็นเวลา 10 นาที ตกตะกอนจากน้ำใสส่วนบนด้วยการเติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 1 เท่าของน้ำใส (ส่วนบน) โดยเก็บตะกอนที่ได้หลังจากการหมุนเหวี่ยงที่ระดับ 16,000 xg เป็นเวลา 20 นาที แล้วผึ่งให้แห้งในอากาศก่อนละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ซึ่งมีส่วนผสมของ Tris-Cl, ที่ pH 8.0 ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เพื่อใช้เป็นอาร์เอ็นเอแม่แบบ ในขั้นตอนต่อไปของการตรวจสอบไวรัส โดยเทคนิค-วิธีการของปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (reverse transcription: RT) และการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ในหลอดทดลอง โดยเทคนิค-วิธีการของปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) ตามลำดับ

4.2 การออกแบบดีเอ็นเอไพรเมอร์

คู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับ ในการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA โดย PCR ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสแต่ละชนิด ได้แก่ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 205-801 คู่เบส ได้มีการพัฒนาและออกแบบในการศึกษาวิจัยนี้ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide sequence) ของพันธุกรรมของไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่ง ได้แก่ PVA, PVX PVY และ PLRV ตามลำดับ ได้จากการสืบค้นและรวบรวมจากฐานข้อมูลออนไลน์ GenBank: National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) โดยโปรแกรม PrimerSelect และ MegAlign ใน DNASTar biocomputing software (DNASTar, Inc.) และวิเคราะห์เปรียบเทียบความจำเพาะต่อไวรัส ในลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ ด้วยโปรแกรม Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Blast.cgi) โดยผลการพัฒนาและออกแบบคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ สำหรับการตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิด ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ได้ออกแบบและใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อของไวรัสสาเหตุโรคบนมันฝรั่งที่สำคัญ 4 ชนิด

ดีเอ็นเอไพรเมอร์	ลำดับเบส (5' – 3')	ตำแหน่งบนจีโนม	จำเพาะกับชนิดไวรัส	ขนาดของผลผลิตPCR (bp)
A05F	CGA TTT AGG TAC TGC TGG GAC TCA	8639 -8662	PVA	448
A04R	CCT GGG CAT GTA TGG TTT CTC	9066 - 9086		
X01F	TGC CGA TCT CAA GCC ACT CTC C	5594 -5615	PVX	801
X02R	ACT GGG GTA GGC GTC GGT TAT GTA	6371 - 6394		
Y02F	TGA GAA TGC AAA ACC AAC (A/C)CT TAG	9014 - 9036	PVY	313
Y03R	ATC CTC GGT GGT GTG CCT C	9308 - 9326		
R38F	GCA CGG CAG TAT TCA AGA T	5441 - 5459	PLRV	205
R32R	ACC ACT GCC AAT AGA TGA GAC	5625 - 5645		

คู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ A 05F และ A 04R สำหรับการตรวจสอบ PVA มีตำแหน่งอยู่บนยีนซึ่งสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein (CP) gene) ในลักษณะเช่นเดียวกันกับคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ สำหรับการตรวจสอบ PVY ได้แก่ Y 02F และ Y 03R ที่มีตำแหน่งอยู่บนยีนซึ่งสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein (CP) gene) เช่นกัน แต่สำหรับคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ สำหรับการตรวจสอบ PVX ได้แก่ X 01F และ X 02R นั้นมีตำแหน่งอยู่บนยีนซึ่งสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein (CP) gene) และ บริเวณส่วนปลาย 3' ของ RNA ของสารพันธุกรรมไวรัสซึ่งไม่มีการแปลรหัสให้โปรตีนใดๆ (3'-untranslated region: 3'-UTR) ตามลำดับ ในขณะที่คู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ สำหรับการตรวจสอบ PLRV มีตำแหน่งของ R 38F อยู่ระหว่าง ยีน P6 กับ P7 โดย R 32R นั้นมีตำแหน่งอยู่บน ยีน P7 ของ RNA ของสารพันธุกรรมไวรัส

4.3 ปฏิกริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (reverse transcription: RT)

การถอดรหัสแบบย้อนกลับ (reverse transcription: RT) เป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ first-strand cDNA ที่จะใช้เป็นแม่แบบใน PCR ขั้นตอนต่อไป ซึ่งปฏิกิริยา RT มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสังเคราะห์ first-stand cDNA ที่ 42 °C ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ oligo

(dT)₂₄ หรือ specific DNA primer เป็น DNA primer (reverse) ซึ่งส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา มีดังต่อไปนี้

Template RNA (total RNA)	0.1-1.0 µg
Primer (oligo (dT) ₂₄ หรือ specific primer)	100 pmol
5X reaction buffer	4 µl
RNase Inhibitor	20 U
dNTP mix (10 mM each)	2 µl
M-MuLV reverse transcriptase	200 U
DEPC – treated water	to 20 µl

4.4 ปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR)

PCR เป็นปฏิกิริยาที่สามารถเพิ่มปริมาณ DNA บริเวณชิ้นส่วน (fragment) ที่ต้องการ ในหลอดทดลอง ซึ่งในการวิจัยนี้ได้ใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยา RT ซึ่งได้อธิบายไว้ข้างต้น (ในข้อ 4.3) เป็น แม่แบบดีเอ็นเอ DNA template ความจำเพาะเจาะจงในการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA ที่ต้องการใน PCR นั้น ได้จากการกำหนด-ออกแบบ คู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primer) (ในข้อ 4.2) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ DNA แม่แบบที่ได้จาก RT ของปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะกับไวรัสแต่ละชนิด โดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ และมีส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เป็นรอบ (Temperature cycle profile)

94°C	เป็นเวลา	2	นาที	} 35 รอบ
94°C	เป็นเวลา	60	วินาที	
50-60°C	เป็นเวลา	60	วินาที	
72°C	เป็นเวลา	60-120	วินาที	
72°C	เป็นเวลา	5	นาที	

ส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา ที่ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

Template DNA (cDNA)	2 µl
dNTP mix (2.5 mM each)	4 µl
10X reaction buffer	5 µl
Taq DNA polymerase	0.25 U

Forward primer (10 μ M)	2 μ l
Reverse primer (10 μ M)	2 μ l
Nuclease-free water	to 50 μ l

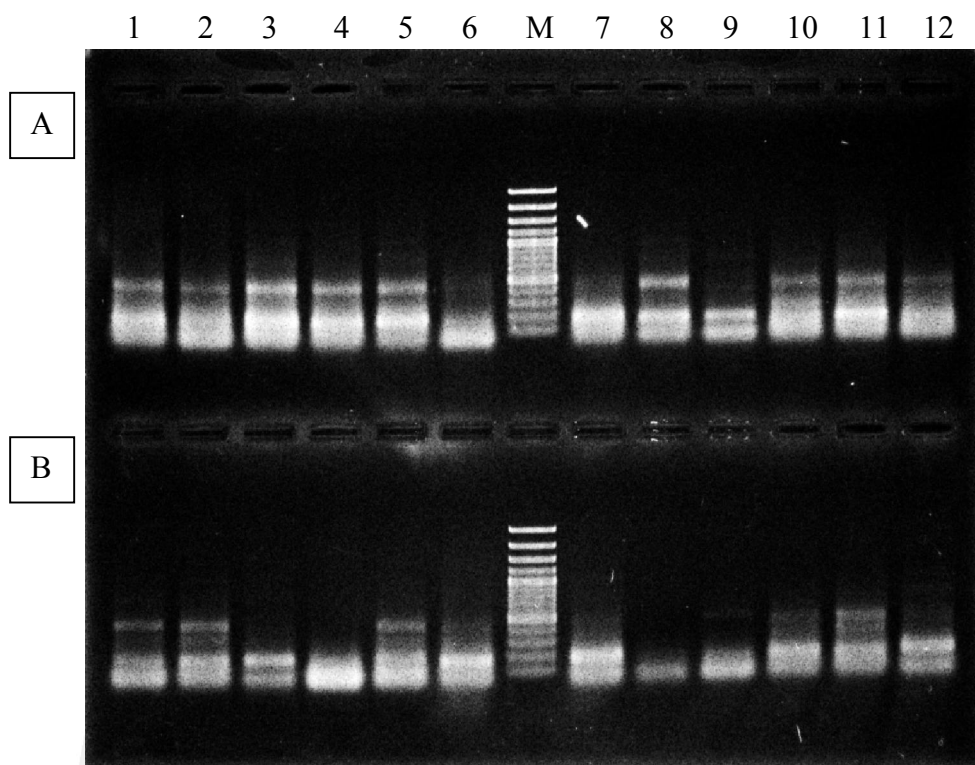
4.5 เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis)

การวิเคราะห์-ประเมินผลของปฏิกิริยา RT-PCR ปฏิบัติได้โดยอาศัยเทคนิควิธีการอิเล็กโตรโฟรีซิส ในแผ่นเจลอะกาโรส (2% ในสารละลายบัฟเฟอร์ TAE) ขนาดความยาว 6 ซม. อิเล็กโตรโฟรีซิสทำงานภายใต้การให้ไฟฟ้ากระแสตรงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 50 นาที โดยย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) ภายหลังกอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นล้างสีย้อมส่วนเกินบนแผ่นเจลออก (de-stain) ด้วยน้ำสะอาด และทำการวิเคราะห์-ประเมินผลการแสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยาซึ่งปรากฏในแผ่นเจลบน UV transilluminator (302 nm)

5. การทดสอบระบบการตรวจสอบไวรัสในมันฝรั่ง

5.1 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus A* ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) โดยการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'A05F': 5'-CGATTTAGGTACTGCTGGGACTCA-3' และ 'A04R': 5'-CCTGGGCATGTATGGTTTCTC-3' สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของ *Potato virus A* (PVA) ที่ตำแหน่ง 8639-8662 และ 9066-9086 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ขนาด 448 คู่เบส ภายใต้อุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 58 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากดีเอ็นเอแม่แบบ (first-strand cDNA) ที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ที่ 42 $^{\circ}$ C ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น DNA primer (reverse) ในตัวอย่างใบมันฝรั่งที่เก็บรวบรวมจากแปลงปลูกของเกษตรกร จำนวน 96 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ โดยให้ DNA fragment ขนาด 448 bp (ภาพที่ 12-15) และจากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ยังมี



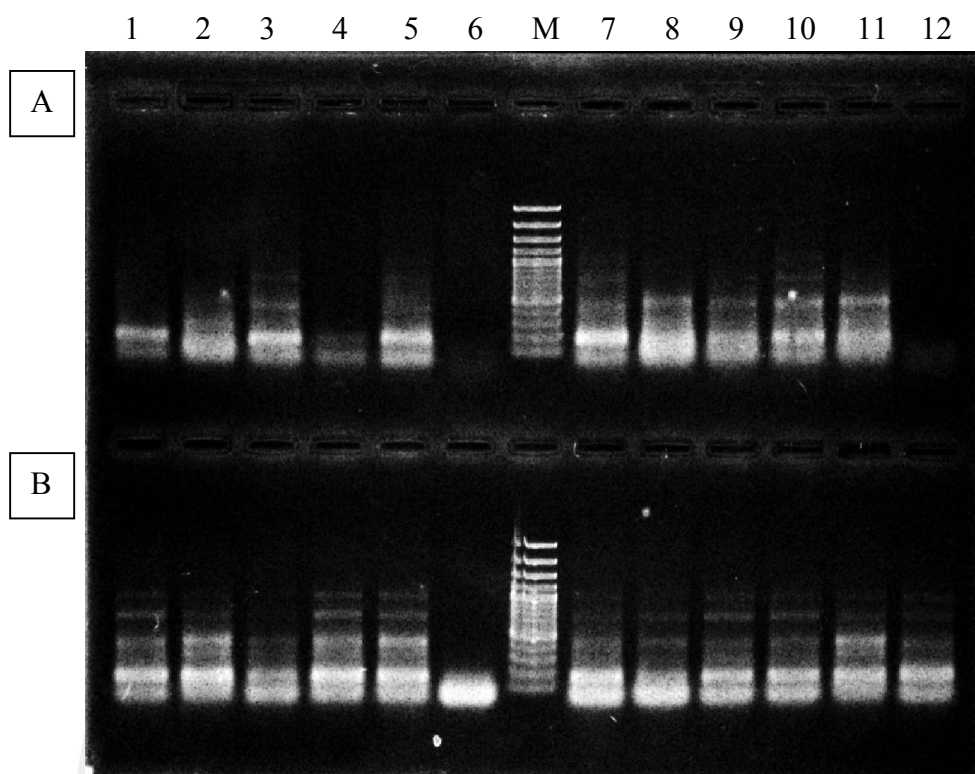
ภาพที่ 12 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S101-S124) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S101	Lane 2: Acc No S102	Lane 3: Acc No S103
Lane 4: Acc No S104	Lane 5: Acc No S105	Lane 6: Acc No S106
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S107	Lane 8: Acc No S108	Lane 9: Acc No S109
Lane10: Acc No S110	Lane 11: Acc No S111	Lane 12: Acc No S112

Panel B

Lane 1: Acc No S113	Lane 2: Acc No S114	Lane 3: Acc No S115
Lane 4: Acc No S116	Lane 5: Acc No S117	Lane 6: Acc No S118
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S119	Lane 8: Acc No S120	Lane 9: Acc No S121
Lane10: Acc No S122	Lane 11: Acc No S123	Lane 12: Acc No S124



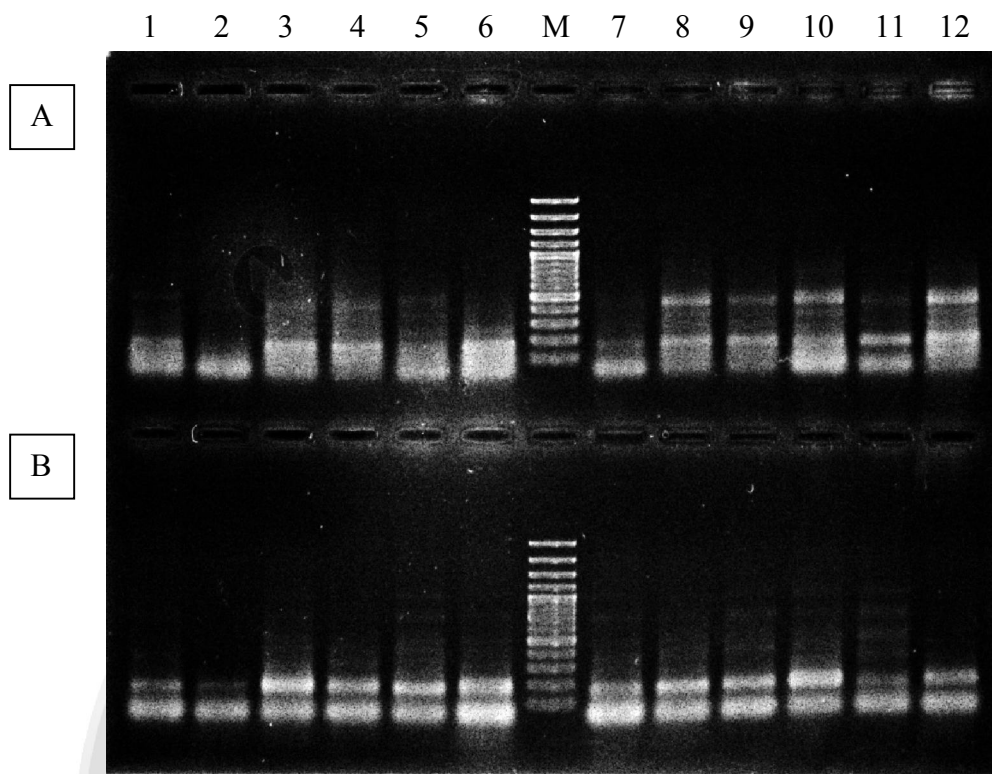
ภาพที่ 13 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S125-S148) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S125	Lane 2: Acc No S126	Lane 3: Acc No S127
Lane 4: Acc No S128	Lane 5: Acc No S129	Lane 6: Acc No S130
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S131	Lane 8: Acc No S132	Lane 9: Acc No S133
Lane10: Acc No S134	Lane 11: Acc No S135	Lane 12: Acc No S136

Panel B

Lane 1: Acc No S137	Lane 2: Acc No S138	Lane 3: Acc No S139
Lane 4: Acc No S140	Lane 5: Acc No S141	Lane 6: Acc No S142
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S143	Lane 8: Acc No S144	Lane 9: Acc No S145
Lane10: Acc No S146	Lane 11: Acc No S147	Lane 12: Acc No S148



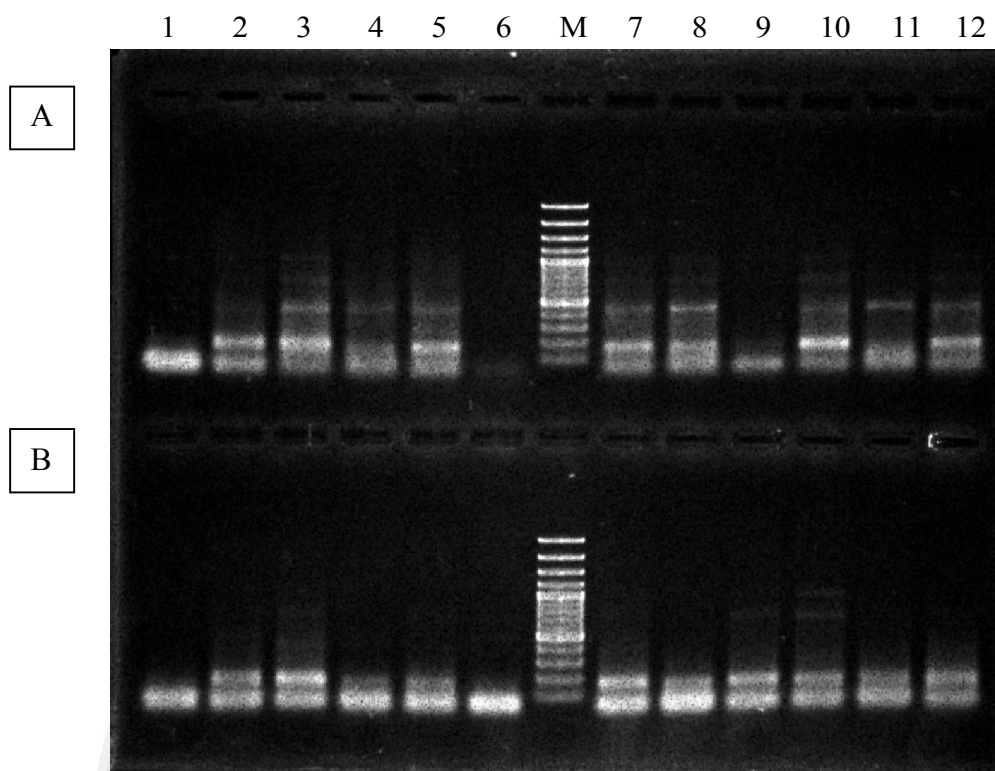
ภาพที่ 14 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S149-S172) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S149	Lane 2: Acc No S150	Lane 3: Acc No S151
Lane 4: Acc No S152	Lane 5: Acc No S153	Lane 6: Acc No S154
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S155	Lane 8: Acc No S156	Lane 9: Acc No S157
Lane10: Acc No S158	Lane 11: Acc No S159	Lane 12: Acc No S160

Panel B

Lane 1: Acc No S161	Lane 2: Acc No S162	Lane 3: Acc No S163
Lane 4: Acc No S164	Lane 5: Acc No S165	Lane 6: Acc No S166
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S167	Lane 8: Acc No S168	Lane 9: Acc No S169
Lane10: Acc No S170	Lane 11: Acc No S171	Lane 12: Acc No S172



ภาพที่ 15 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S173-S196) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S173	Lane 2: Acc No S174	Lane 3: Acc No S175
Lane 4: Acc No S176	Lane 5: Acc No S177	Lane 6: Acc No S178
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S179	Lane 8: Acc No S180	Lane 9: Acc No S181
Lane 10: Acc No S182	Lane 11: Acc No S183	Lane 12: Acc No S184

Panel B

Lane 1: Acc No S185	Lane 2: Acc No S186	Lane 3: Acc No S187
Lane 4: Acc No S188	Lane 5: Acc No S189	Lane 6: Acc No S190
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S191	Lane 8: Acc No S192	Lane 9: Acc No S193
Lane 10: Acc No S194	Lane 11: Acc No S195	Lane 12: Acc No S196

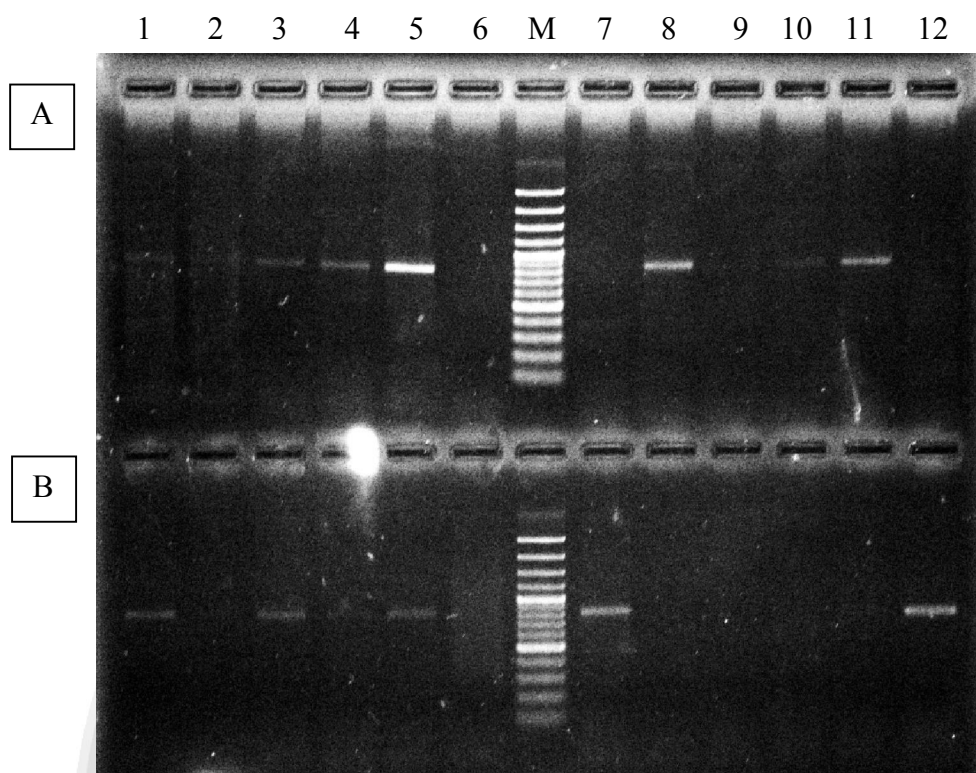
แถบดีเอ็นเออื่นที่มีขนาดต่างไปจาก 448 bp (non-specific band) ปรากฏ ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับปรุงและพัฒนา โดยเฉพาะรูปแบบของการปรากฏแถบดีเอ็นเอนอกระลอก

ผลการตรวจสอบไวรัส *Potato virus A* ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง จำนวน 96 ตัวอย่าง (S101–S196) โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ดังแสดงในตารางที่ 4-7

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus X* ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) โดยการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'X01F': 5'- TGCCGATCTCAAGCCACTCTCC-3' และ 'X02R': 5'- ACTGGGGTATGGCGTCGGTTATGTA -3' สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของ *Potato virus X* (PVX) ที่ตำแหน่ง 5594-5615 และ 6371-9394ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ขนาด 801 คู่เบส ภายใต้สภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 58^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากดีเอ็นเอแม่แบบ (first-strand cDNA) ที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ที่ 42^o ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น DNA primer (reverse) ในตัวอย่างใบมันฝรั่งที่เก็บรวบรวมจากแปลงปลูกของเกษตรกร จำนวน 96 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ โดยให้ DNA fragment ขนาด 801 bp (ภาพที่ 16-19) และจากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า แถบดีเอ็นเอ ขนาด 801 bp ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัส (PVX) เป็นเพียงแถบเดียวในรูปแบบที่ปรากฏบนอะกาโรสเจล

ผลการตรวจสอบไวรัส *Potato virus X* ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง จำนวน 96 ตัวอย่าง (S101–S196) โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ดังแสดงในตารางที่ 4-7



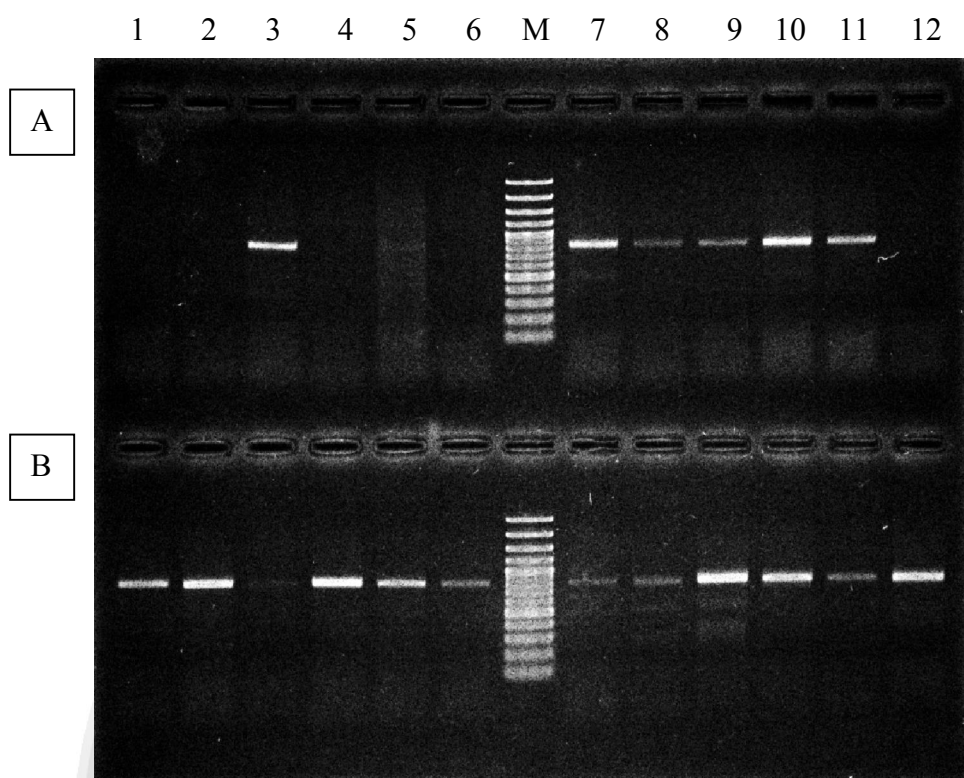
ภาพที่ 16 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S101-S124) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) X01F และ X02R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S101	Lane 2: Acc No S102	Lane 3: Acc No S103
Lane 4: Acc No S104	Lane 5: Acc No S105	Lane 6: Acc No S106
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S107	Lane 8: Acc No S108	Lane 9: Acc No S109
Lane 10: Acc No S110	Lane 11: Acc No S111	Lane 12: Acc No S112

Panel B

Lane 1: Acc No S113	Lane 2: Acc No S114	Lane 3: Acc No S115
Lane 4: Acc No S116	Lane 5: Acc No S117	Lane 6: Acc No S118
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S119	Lane 8: Acc No S120	Lane 9: Acc No S121
Lane 10: Acc No S122	Lane 11: Acc No S123	Lane 12: Acc No S124



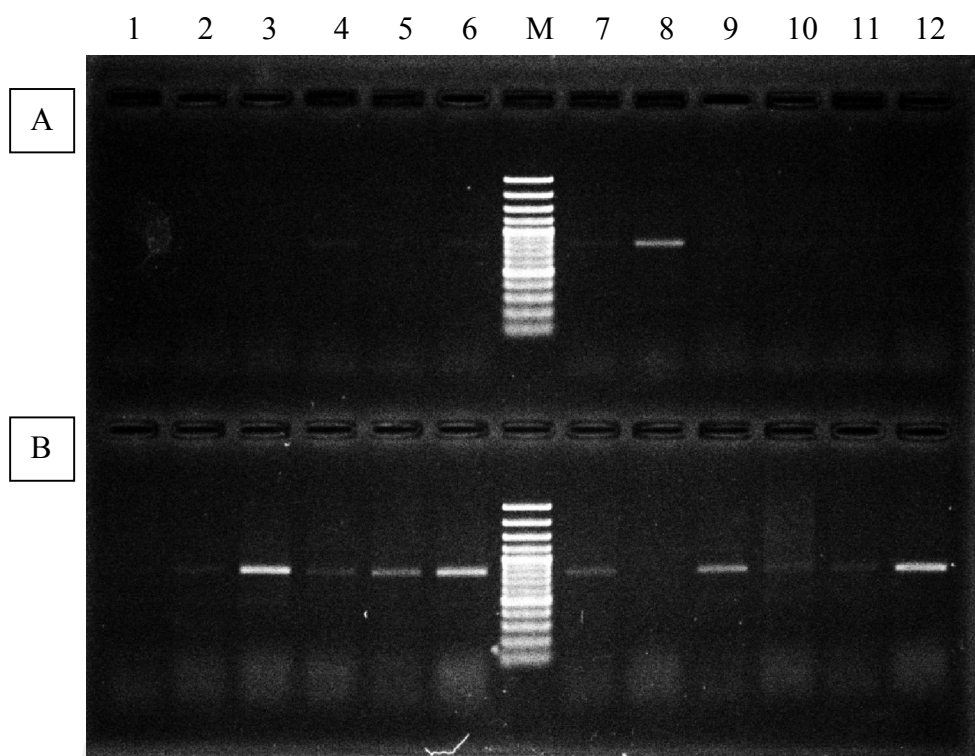
ภาพที่ 17 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S125-S148) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) X01F และ X02R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S125	Lane 2: Acc No S126	Lane 3: Acc No S127
Lane 4: Acc No S128	Lane 5: Acc No S129	Lane 6: Acc No S130
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S131	Lane 8: Acc No S132	Lane 9: Acc No S133
Lane10: Acc No S134	Lane 11: Acc No S135	Lane 12: Acc No S136

Panel B

Lane 1: Acc No S137	Lane 2: Acc No S138	Lane 3: Acc No S139
Lane 4: Acc No S140	Lane 5: Acc No S141	Lane 6: Acc No S142
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane7: Acc No S143	Lane 8: Acc No S144	Lane 9: Acc No S145
Lane10: Acc No S146	Lane 11: Acc No S147	Lane 12: Acc No S148



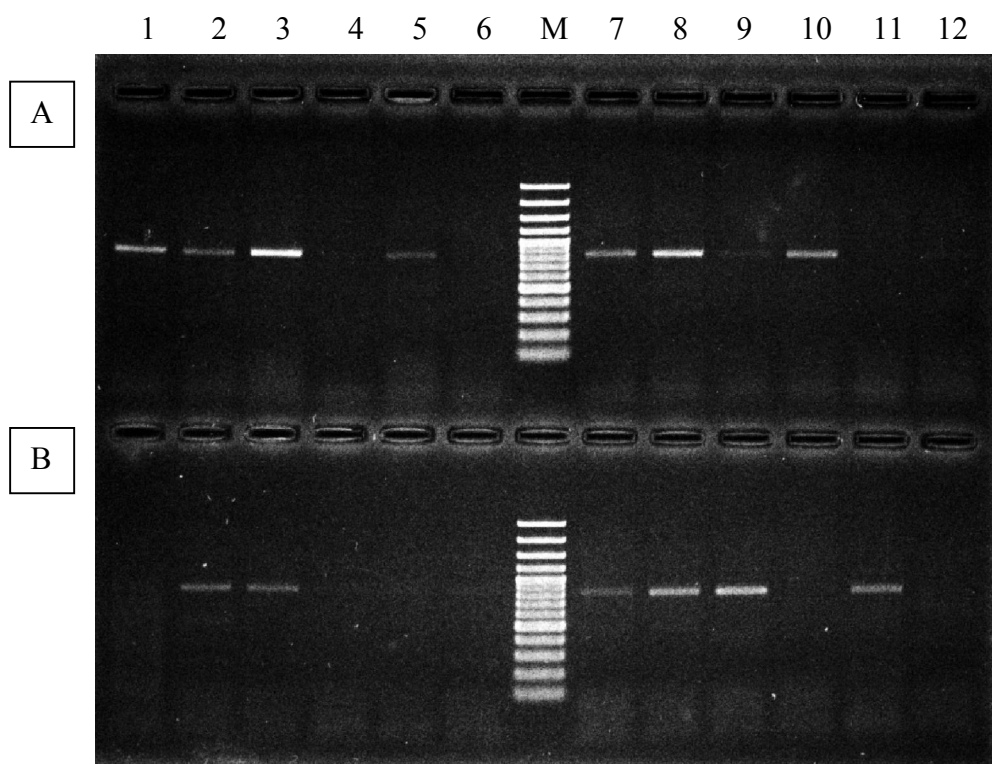
ภาพที่ 18 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S149-S172) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) X01F และ X02R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S149	Lane 2: Acc No S150	Lane 3: Acc No S151
Lane 4: Acc No S152	Lane 5: Acc No S153	Lane 6: Acc No S154
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S155	Lane 8: Acc No S156	Lane 9: Acc No S157
Lane 10: Acc No S158	Lane 11: Acc No S159	Lane 12: Acc No S160

Panel B

Lane 1: Acc No S161	Lane 2: Acc No S162	Lane 3: Acc No S163
Lane 4: Acc No S164	Lane 5: Acc No S165	Lane 6: Acc No S166
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S167	Lane 8: Acc No S168	Lane 9: Acc No S169
Lane 10: Acc No S170	Lane 11: Acc No S171	Lane 12: Acc No S172



ภาพที่ 19 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S173-S196) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) X01F และ X02R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S173	Lane 2: Acc No S174	Lane 3: Acc No S175
Lane 4: Acc No S176	Lane 5: Acc No S177	Lane 6: Acc No S178
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S179	Lane 8: Acc No S180	Lane 9: Acc No S181
Lane 10: Acc No S182	Lane 11: Acc No S183	Lane 12: Acc No S184

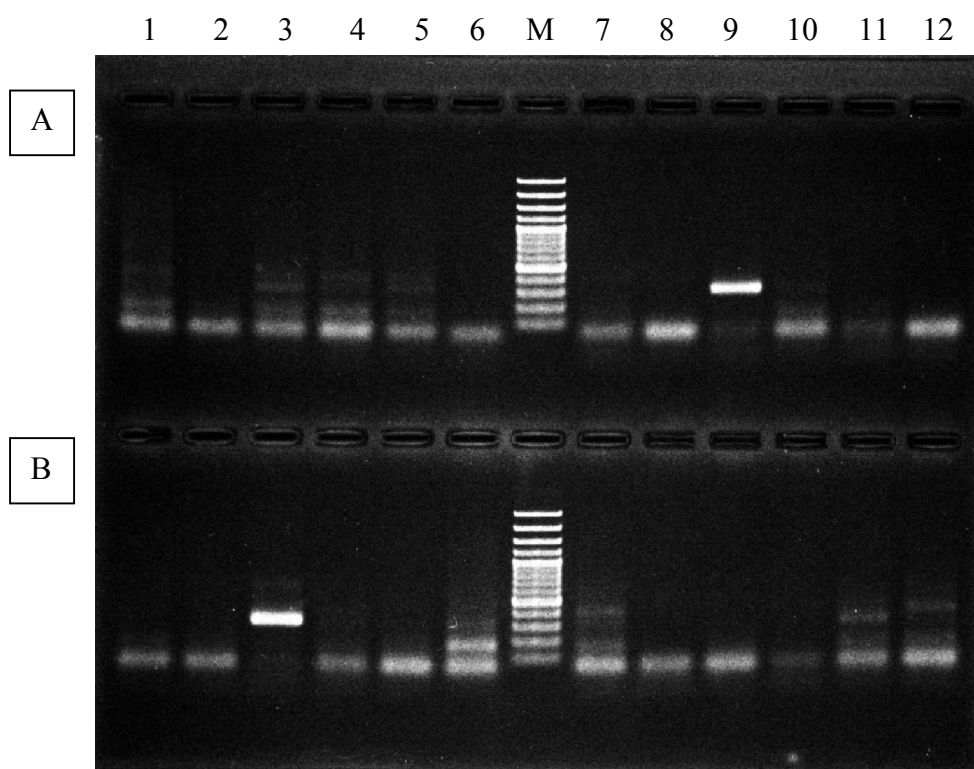
Panel B

Lane 1: Acc No S185	Lane 2: Acc No S186	Lane 3: Acc No S187
Lane 4: Acc No S188	Lane 5: Acc No S189	Lane 6: Acc No S190
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S191	Lane 8: Acc No S192	Lane 9: Acc No S193
Lane 10: Acc No S194	Lane 11: Acc No S195	Lane 12: Acc No S196

5.3 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus Y* ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) โดยการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'Y02F': 5'-TGAGAAATGCAAAACCAAC(A/C)CTTAG -3' และ 'Y03R': 5'-ATCCTCGGTGGTGTGCCTC-3' สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของ *Potato virus Y* (PVY) ที่ตำแหน่ง 9014-9036 และ 9308-9326 ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ขนาด 313 คู่เบส ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 58^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากดีเอ็นเอแม่แบบ (first-strand cDNA) ที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ที่ 42^o ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น DNA primer (reverse) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 96 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ โดยให้ DNA fragment ขนาด 313 bp (ภาพที่ 20-23) และจากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า นอกจากแถบดีเอ็นเอ ขนาด 313 bp ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัส (PVY) แล้ว ยังพบมีแถบดีเอ็นเออื่นที่มีขนาดต่างไปจาก 313 bp (non-specific band) ปรากฏ ซึ่งจำเป็นต้องมีการปรับปรุงและพัฒนา โดยเฉพาะรูปแบบของการปรากฏแถบดีเอ็นเอนอะกาโรสเจล

ผลการตรวจสอบไวรัส *Potato virus Y* ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง จำนวน 96 ตัวอย่าง (S101-S196) โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ดังแสดงในตารางที่ 4-7



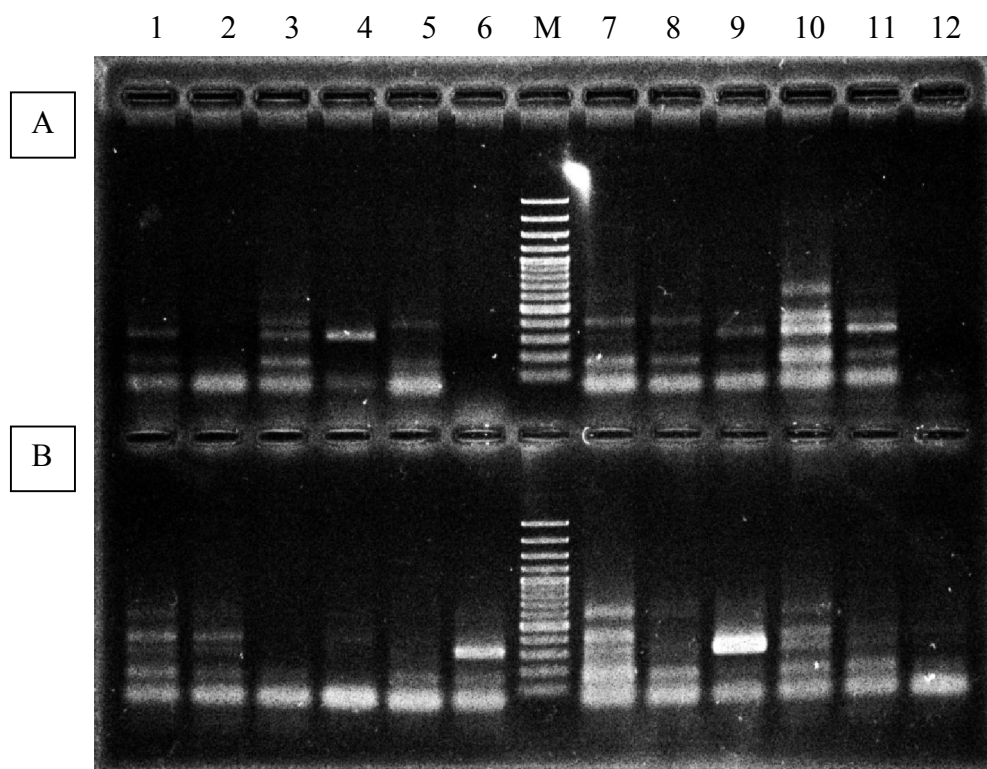
ภาพที่ 20 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S101-S124) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S101	Lane 2: Acc No S102	Lane 3: Acc No S103
Lane 4: Acc No S104	Lane 5: Acc No S105	Lane 6: Acc No S106
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S107	Lane 8: Acc No S108	Lane 9: Acc No S109
Lane10: Acc No S110	Lane 11: Acc No S111	Lane 12: Acc No S112

Panel B

Lane 1: Acc No S113	Lane 2: Acc No S114	Lane 3: Acc No S115
Lane 4: Acc No S116	Lane 5: Acc No S117	Lane 6: Acc No S118
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S119	Lane 8: Acc No S120	Lane 9: Acc No S121
Lane10: Acc No S122	Lane 11: Acc No S123	Lane 12: Acc No S124



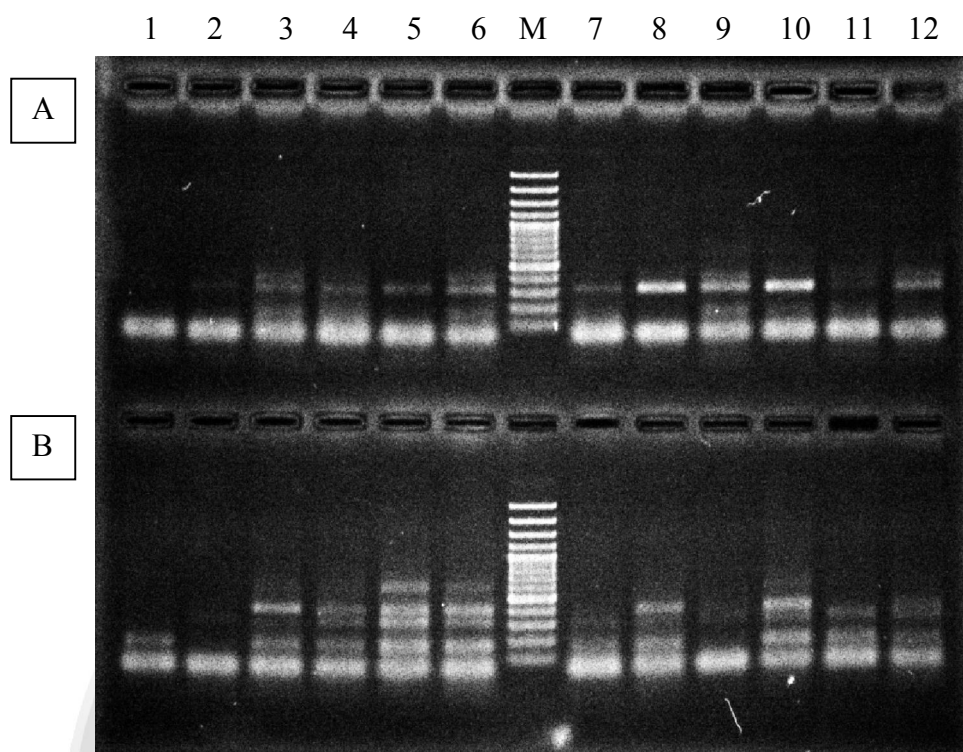
ภาพที่ 21 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S125-S148) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S125	Lane 2: Acc No S126	Lane 3: Acc No S127
Lane 4: Acc No S128	Lane 5: Acc No S129	Lane 6: Acc No S130
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S131	Lane 8: Acc No S132	Lane 9: Acc No S133
Lane 10: Acc No S134	Lane 11: Acc No S135	Lane 12: Acc No S136

Panel B

Lane 1: Acc No S137	Lane 2: Acc No S138	Lane 3: Acc No S139
Lane 4: Acc No S140	Lane 5: Acc No S141	Lane 6: Acc No S142
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S143	Lane 8: Acc No S144	Lane 9: Acc No S145
Lane 10: Acc No S146	Lane 11: Acc No S147	Lane 12: Acc No S148



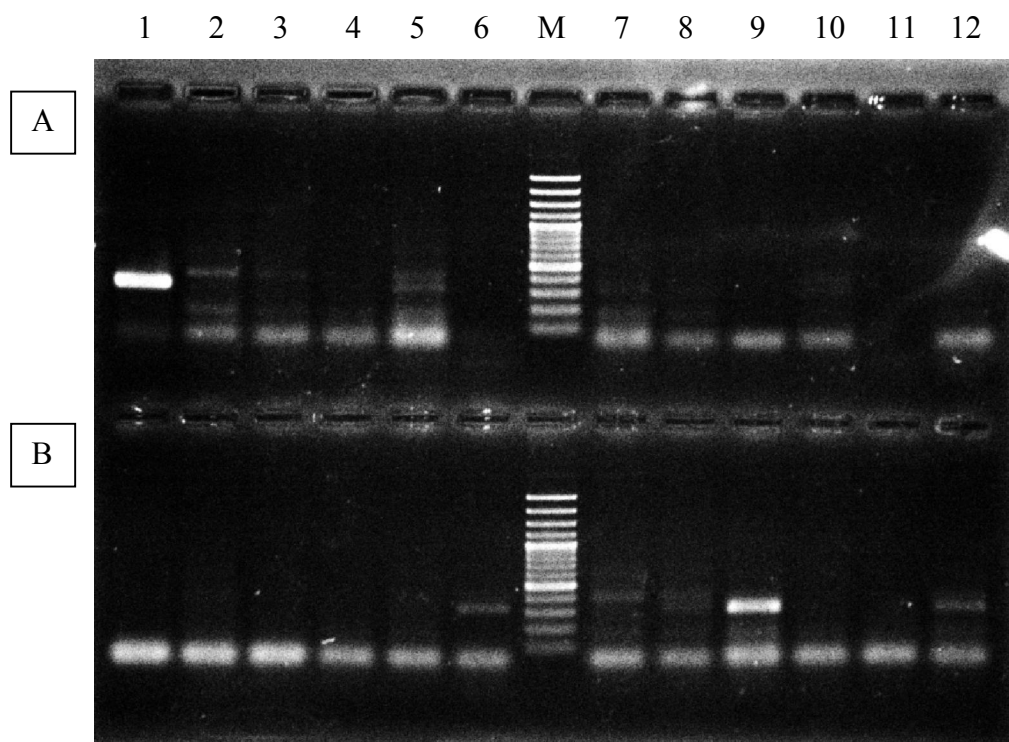
ภาพที่ 22 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S149-S172) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S149	Lane 2: Acc No S150	Lane 3: Acc No S151
Lane 4: Acc No S152	Lane 5: Acc No S153	Lane 6: Acc No S154
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S155	Lane 8: Acc No S156	Lane 9: Acc No S157
Lane10: Acc No S158	Lane 11: Acc No S159	Lane 12: Acc No S160

Panel B

Lane 1: Acc No S161	Lane 2: Acc No S162	Lane 3: Acc No S163
Lane 4: Acc No S164	Lane 5: Acc No S165	Lane 6: Acc No S166
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S167	Lane 8: Acc No S168	Lane 9: Acc No S169
Lane10: Acc No S170	Lane 11: Acc No S171	Lane 12: Acc No S172



ภาพที่ 23 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง (S173-S196) จำนวน 24 ตัวอย่าง โดยอาศัยหลักการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R ใน PCR และโดยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT)

Panel A

Lane 1: Acc No S173	Lane 2: Acc No S174	Lane 3: Acc No S175
Lane 4: Acc No S176	Lane 5: Acc No S177	Lane 6: Acc No S178
Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S179	Lane 8: Acc No S180	Lane 9: Acc No S181
Lane10: Acc No S182	Lane 11: Acc No S183	Lane 12: Acc No S184

Panel B

Lane 1: Acc No S185	Lane 2: Acc No S186	Lane 3: Acc No S187
Lane 4: Acc No S188	Lane 5: Acc No S189	Lane 6: Acc No S190
Lane M:100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)		
Lane 7: Acc No S191	Lane 8: Acc No S192	Lane 9: Acc No S193
Lane10:Acc No S194	Lane 11: Acc No S195	Lane 12: Acc No S196

ตารางที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบไวรัส *Potato virus A*, *Potato virus X* และ *Potato virus Y* ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 24 ตัวอย่าง (S101–S124) โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด

Accession number	Primer name			Infected with the virus(es)*		
	A05F / A04R	X01F / X02R	Y02F / Y03R			
	(PVA)	(PVX)	(PVY)			
S 101	1	1	0	A	X	-
S 102	1	1	0	A	X	-
S 103	2	1	1	A	X	Y
S 104	2	1	0	A	X	-
S 105	3	3	0	A	X	-
S 106	1	0	0	A	-	-
S 107	1	0	0	A	-	-
S 108	2	1	0	A	X	-
S 109	0	0	3	-	-	Y
S 110	1	1	1	A	X	Y
S 111	2	1	0	A	X	-
S 112	1	0	0	A	-	-
S 113	1	1	0	A	X	-
S 114	2	0	0	A	-	-
S 115	0	1	3	-	X	Y
S 116	0	0	0	-	-	-
S 117	1	1	0	A	X	-
S 118	1	0	0	A	-	-
S 119	1	1	0	A	X	-
S 120	0	0	0	-	-	-
S 121	1	0	0	A	-	-
S 122	1	0	0	A	-	-
S 123	2	0	1	A	-	Y
S 124	1	1	0	A	X	-

หมายเหตุ

0 คือ ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส

1 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส ต่ำกว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

2 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส เท่ากับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

3 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส สูงกว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

* การติดเชื้อไวรัส A: PVA, X: PVX และ/หรือ Y: PVY

ตารางที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบไวรัส *Potato virus A*, *Potato virus X* และ *Potato virus Y* ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่ามีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 24 ตัวอย่าง (S125–S148) โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด

Accession number	Primer name			Infected with the virus(es)*		
	A05F / A04R	X01F / X02R	Y02F / Y03R			
	(PVA)	(PVX)	(PVY)			
S 125	0	0	1	-	-	Y
S 126	1	0	0	A	-	-
S 127	1	3	1	A	X	Y
S 128	0	0	2	-	-	Y
S 129	1	1	0	A	X	-
S 130	0	0	0	-	-	-
S 131	1	3	0	A	X	-
S 132	1	1	0	A	X	-
S 133	1	1	1	A	X	Y
S 134	1	3	2	A	X	Y
S 135	2	2	1	A	X	Y
S 136	0	0	0	-	-	-
S 137	1	2	1	A	X	Y
S 138	2	3	1	A	X	Y
S 139	1	0	0	-	-	-
S 140	1	3	0	A	X	-
S 141	2	2	0	A	X	-
S 142	0	1	3	-	X	Y
S 143	1	1	1	A	X	Y
S 144	1	1	0	A	X	-
S 145	1	3	3	A	X	Y
S 146	1	2	1	A	X	Y
S 147	2	1	1	A	X	Y
S 148	1	3	0	A	X	-

หมายเหตุ

0 คือ ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส

1 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส ต่ำกว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

2 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส เท่ากับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

3 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส สูงกว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

* การติดเชื้อไวรัส A: PVA, X: PVX และ/หรือ Y: PVY

ตารางที่ 6 แสดงผลการตรวจสอบไวรัส *Potato virus A*, *Potato virus X* และ *Potato virus Y* ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 24 ตัวอย่าง (S149 – S172) โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด

Accession number	Primer name			Infected with the virus(es)*		
	A05F / A04R	X01F / X02R	Y02F / Y03R			
	(PVA)	(PVX)	(PVY)			
S 149	1	0	0	A	-	-
S 150	0	0	1	-	-	Y
S 151	1	0	1	A	-	Y
S 152	1	1	1	A	X	Y
S 153	1	0	1	A	-	Y
S 154	1	1	1	A	X	Y
S 155	1	1	1	A	X	Y
S 156	2	1	3	A	X	Y
S 157	1	0	2	A	-	Y
S 158	2	0	3	A	-	Y
S 159	1	0	1	A	-	Y
S 160	3	0	1	A	-	Y
S 161	1	0	0	A	-	-
S 162	0	1	0	-	X	-
S 163	0	2	0	-	X	-
S 164	0	1	1	-	X	Y
S 165	0	1	1	-	X	Y
S 166	0	2	1	-	X	Y
S 167	0	1	1	-	X	Y
S 168	0	0	0	-	-	-
S 169	0	1	1	-	X	Y
S 170	0	0	1	-	-	Y
S 171	1	1	1	A	X	Y
S 172	0	2	1	-	X	Y

หมายเหตุ

0 คือ ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส

1 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส ต่ำกว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

2 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส เท่ากับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

3 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส สูงกว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

* การติดเชื้อไวรัส A: PVA, X: PVX และ/หรือ Y: PVY

ตารางที่ 7 แสดงผลการตรวจสอบไวรัส *Potato virus A*, *Potato virus X* และ *Potato virus Y* ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อไวรัส จำนวน 24 ตัวอย่าง (S173 – S196) โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด

Accession number	Primer name			Infected with the virus(es)*		
	A05F / A04R	X01F / X02R	Y02F / Y03R			
	(PVA)	(PVX)	(PVY)			
S 173	0	1	3	-	X	Y
S 174	1	1	0	A	X	Y
S 175	1	2	0	A	X	Y
S 176	1	0	0	A	-	-
S 177	1	1	1	A	X	Y
S 178	0	0	0	-	-	-
S 179	1	1	1	A	X	Y
S 180	1	2	0	A	X	Y
S 181	0	1	0	-	X	-
S 182	1	1	0	A	X	Y
S 183	1	0	0	A	-	-
S 184	1	0	0	A	-	-
S 185	0	0	0	-	-	-
S 186	0	1	0	-	X	-
S 187	1	1	0	A	X	-
S 188	0	0	0	-	-	-
S 189	0	0	0	-	-	-
S 190	0	0	1	-	-	Y
S 191	0	1	0	-	X	-
S 192	0	1	1	-	X	Y
S 193	0	1	3	-	X	Y
S 194	0	0	0	-	-	-
S 195	0	1	0	-	X	-
S 196	0	0	1	-	-	Y

หมายเหตุ

0 คือ ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส

1 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส ต่ำกว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

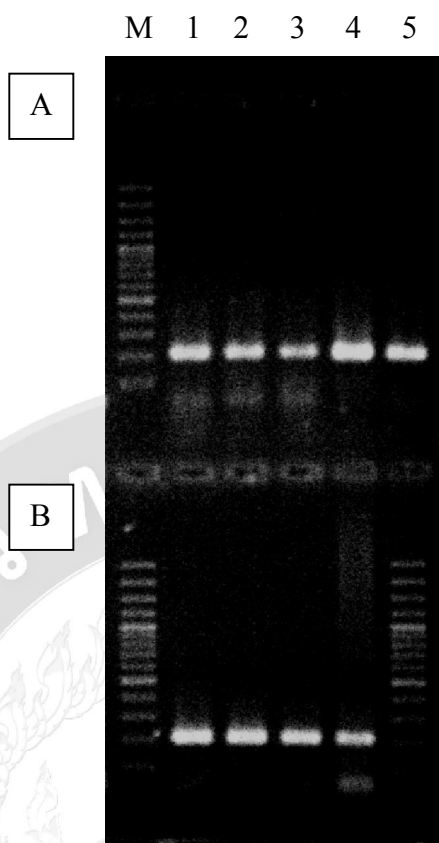
2 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส เท่ากับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

3 คือ ระดับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส สูงกว่าความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาด 3000 bp

* การติดเชื้อไวรัส A: PVA, X: PVX และ/หรือ Y: PVY

5.4 การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato leafroll virus* ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การทดสอบประสิทธิภาพการตรวจสอบ *Potato leafroll virus* (PLRV) โดยการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'R38F':5'-GCACGGCAGTATTCAAGAT-3' และ 'R32R': 5'-ACCACTGCCAATAGATGAGAC -3' สำหรับเริ่มต้นการจำลองชิ้นส่วนดีเอ็นเอในทิศทางไปข้างหน้าและย้อนกลับ ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงกับนิวคลีโอไทด์ของ *Potato leafroll virus* (PLRV) ที่ตำแหน่ง 5441-5459 และ 5625-5645 ตามลำดับ ให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ขนาด 205 คู่เบส ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 58^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ จากดีเอ็นเอแม่แบบ (first-strand cDNA) ที่สังเคราะห์ได้ในปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ที่ 42^o ใช้เวลา 60 นาที โดยใช้ 'R32R' เป็น DNA primer (reverse) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการใบม้วนและคาดว่าจะมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส จำนวน 9 ตัวอย่าง ให้ผลการตรวจสอบที่ถูกต้องแม่นยำ โดยให้ DNA fragment ขนาด 205 bp (ภาพที่ 24) โดยการปรากฏแถบดีเอ็นเอดังกล่าวมีขนาดซึ่งแสดงถึงความจำเพาะต่อ *Potato leafroll virus* (PLRV) และไม่ปรากฏแถบที่มีขนาดอื่น (ที่มีขนาดใหญ่กว่า) การตรวจสอบไวรัสด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'R38F' และ 'R32R' ใน PCR ให้ประสิทธิภาพสูงในความจำเพาะเจาะจง และมีความไวในการตรวจสอบที่สูง โดยพิจารณาจากความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อไวรัส (205 bp) ที่มีความเข้มสูงมาก เมื่อเทียบกับความเข้มของดีเอ็นเอขนาดมาตรฐาน 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)



ภาพที่ 24 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato leaf roll virus* (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่แสดงลักษณะอาการใบม้วนและคาดว่าจะมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) R38F และ R32R โดยใช้ R32R เป็นไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription

Panel A

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: Acc No S002_2

Lane 2: Acc No S003_2

Lane 3: Acc No S004_2

Lane 4: Acc No S005_2

Lane 5: Acc No S007_2

Panel B

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: Acc No S008_2

Lane 2: Acc No S009_2

Lane 3: Acc No S010_2

Lane 4: Acc No S013_2

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

6. การพัฒนาระบบการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง

ระบบของการตรวจสอบไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่งทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ PVA, PVX, PVY และ PLRV จากเนื้อเยื่อใบของมันฝรั่ง ได้รับการพัฒนาจากการศึกษา-ทดลอง เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด ภายใต้สภาพแวดล้อมของปฏิกิริยาและการปฏิบัติที่เหมาะสมในการที่จะนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดในเนื้อเยื่อของมันฝรั่ง ทั้งนี้การพัฒนา-ปรับปรุงระบบการตรวจสอบไวรัสนั้นมีการปฏิบัติในวิธีการอยู่หลายขั้นตอน ได้แก่ การเตรียมตัวอย่างโรคในส่วนใบของมันฝรั่ง การแยกสกัดกรดนิวคลีอิก (total nucleic acid; DNA and RNA) จากเนื้อเยื่อใบของมันฝรั่ง การทำปฏิกิริยาถอดรหัสแบบย้อนกลับ (reverse transcription) เพื่อการสังเคราะห์ cDNA ที่จะใช้เป็น DNA template ในขั้นตอนต่อไปของ PCR ตลอดจน การแสดงผลของรูปแบบแถบดีเอ็นเอบนแผ่นอะกาโรสเจลภายใต้การย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารเคมีที่สามารถเรืองแสงได้ ภายใต้สภาพช่วงคลื่นแสงอัลตราไวโอเลต (ultraviolet) ทุกขั้นตอนในการปฏิบัติแล้วแต่มีความสำคัญและมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของวิธีการดังกล่าวในการประยุกต์ใช้เพื่อการตรวจสอบไวรัส ดังนั้น ในการวิจัยนี้จึงได้ศึกษา ทดลอง และเปรียบเทียบผลที่ผันแปรจากปัจจัยที่แตกต่างกัน เพื่อแสวงหาสภาพที่เหมาะสม เพื่อพัฒนาระบบการตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น ทั้งในส่วนของความจำเพาะเจาะจง และความไวในการตรวจสอบ ตลอดจนการพัฒนาวิธีการเตรียมกรดนิวคลีอิก (total nucleic acid; DNA and RNA) จากเนื้อเยื่อใบของมันฝรั่งให้มีความสะดวกในการปฏิบัติ และหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม

6.1 การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การตรวจสอบ *Potato virus A* จากเนื้อเยื่อใบ โดยวิธี RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ A05F และ A04R และมีการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA พบว่าการเตรียมกรดนิวคลีอิกรวม (total nucleic acid) จากเนื้อเยื่อใบของพืช ตามวิธีการสกัดแยก ดังแสดงข้างต้น (ข้อ 4.1) ให้กรดนิวคลีอิกที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น template ในปฏิกิริยาใน RT

สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 58^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ พบว่ามีความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR product) เป็นดีเอ็นเอขนาด 448 bp

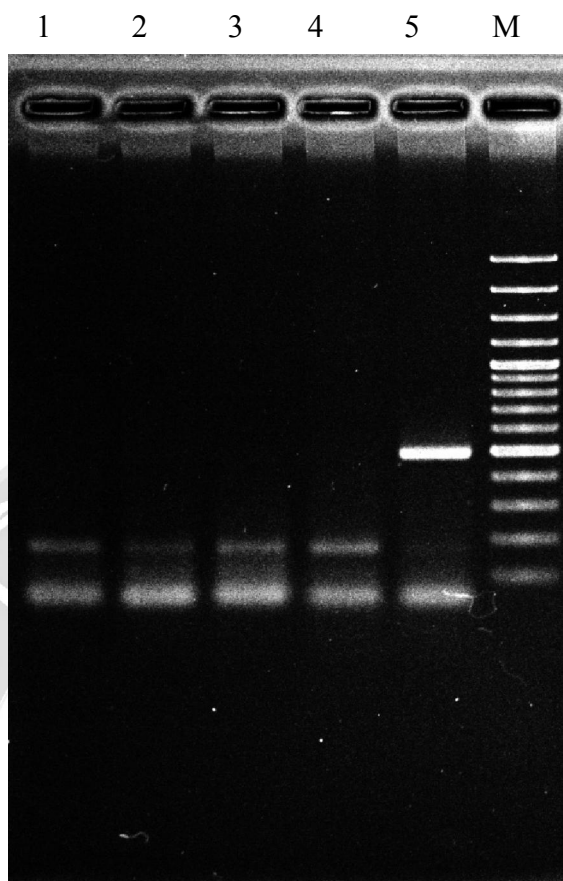
ประสิทธิภาพของการตรวจสอบ PVA โดยวิธี RT-PCR ด้วย คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ A05F และ A04R ที่ได้จากการออกแบบในการศึกษาวิจัยนี้ แสดงผลบนอะกาโรสเจล (ภาพที่ 25) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อ PVA และให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 448 bp เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้นในตัวอย่าง Acc No S108 ซึ่งมีการติดเชื้อ PVA และ PVX (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่า คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ A05F และ A04R มีความจำเพาะเจาะจงต่อ PVA เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 448 bp เพียงตำแหน่งเดียวและมีขนาดตรงกับผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้จากการคำนวณออกแบบ ความไวในการตรวจสอบไวรัสด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ข้างต้นให้ผลในความไว (sensitivity) ที่สูงมาก ดังแสดงในภาพที่ 25 โดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 448 bp กับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 500 bp และพบว่ามีความไวสูงกว่าการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV17 และ PV18 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 255 bp (ภาพที่ 6) ในวิธี PCR ที่มีการปฏิบัติและสภาพการเกิดปฏิกิริยาเดียวกัน

6.2 การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การตรวจสอบ *Potato virus X* จากเนื้อเยื่อใบ โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ X01F และ X02R และมีการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA พบว่าการเตรียมกรดนิวคลีอิกรวม (total nucleic acid) จากเนื้อเยื่อใบของพืช ตามวิธีการสกัดแยก ดังแสดงข้างต้น (ข้อ 4.1) ให้กรดนิวคลีอิกที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น template ในปฏิกิริยาใน RT

สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 30 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 55^o เป็นเวลา 30 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ พบว่ามีความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR product) เป็นดีเอ็นเอขนาด 801 bp

ประสิทธิภาพของการตรวจสอบ PVX โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ X01F และ X02R ที่ได้จากการออกแบบในการศึกษาวิจัยนี้ แสดงผลบนอะกาโรสเจล (ภาพที่ 26) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อ PVX และให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 801 bp เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 26, lane 3 และ 4) ในตัวอย่าง Acc No S127 ซึ่งมีการติดเชื้อ PVA, PVX และ PVY (ตาราง 5) แสดงให้เห็นว่า คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ A05F และ A04R มีความจำเพาะเจาะจง



ภาพที่ 25 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus A* (PVA) ในตัวอย่างมันฝรั่ง จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) A05F และ A04R โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription

Lane 1: ตัวอย่างมันฝรั่ง Acc No S173

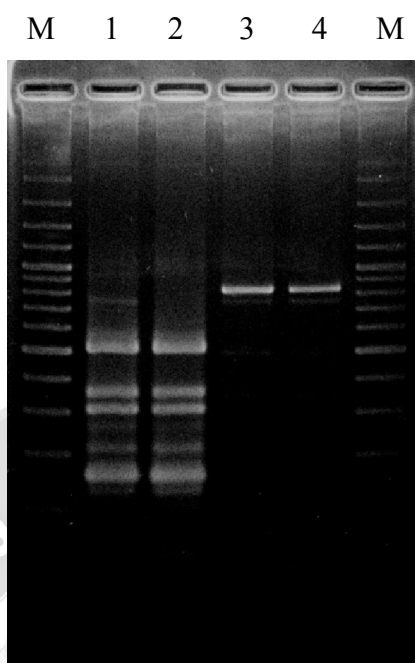
Lane 2: ตัวอย่างมันฝรั่ง Acc No S174

Lane 3: ตัวอย่างมันฝรั่ง Acc No S185

Lane 4: ตัวอย่างมันฝรั่ง Acc No S190

Lane 5: ตัวอย่างมันฝรั่ง Acc No S108

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)



ภาพที่ 26 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus X* (PVX) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อไวรัส หมายเลข Acc No. S127 โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV19 และ PV20 (Lane 1 – Lane 2) และคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ X01F และ X02R (Lane 3 – Lane 4) โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น ไพรเมอร์ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription และใช้ cDNA ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในปฏิกิริยา Polymerase chain reaction (PCR)

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: ผลผลิตของ PCR ปริมาตร 5 ul ที่ได้จากการใช้ cDNA 1 ul ในปฏิกิริยา PCR 10 ul ที่ใช้ PV19 และ PV20 เป็นคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์

Lane 2: ผลผลิตของ PCR ปริมาตร 5 ul ที่ได้จากการใช้ cDNA 2 ul ในปฏิกิริยา PCR 10 ul ที่ใช้ PV19 และ PV20 เป็นคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์

Lane 3: ผลผลิตของ PCR ปริมาตร 5 ul ที่ได้จากการใช้ cDNA 1 ul ในปฏิกิริยา PCR 10 ul ที่ใช้ X01F และ X02R เป็นคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์

Lane 4: ผลผลิตของ PCR ปริมาตร 5 ul ที่ได้จากการใช้ cDNA 2 ul ในปฏิกิริยา PCR 10 ul ที่ใช้ X01F และ X02R เป็นคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์

ต่อ PVX เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 801 bp เพียงตำแหน่งเดียวและมีขนาดตรงกับผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้จากการคำนวณ-ออกแบบ ในขณะที่การตรวจสอบโดยวิธี PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV19 และ PV20 ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอถึงจำนวน 9 แถบ (non-specific bands) ในช่วงขนาดต่ำกว่า 800 bp ภายใต้สภาพของปฏิกิริยาเดียวกัน (ภาพที่ 26, lane 1 และ 2) ผลของการเกิดปฏิกิริยาที่แสดงในรูปแบบของแถบดีเอ็นเอนั้นจะกาโรสเจลงั้น แสดงการเปรียบเทียบให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการตรวจสอบ PVX ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ X01F และ X02R ที่ได้จากการออกแบบในการศึกษาวิจัยนี้ว่ามีความจำเพาะเจาะจงต่อ PVX ให้ความชัดเจนในการแสดงผลเนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 801 bp เพียงตำแหน่งเดียวและมีขนาดตรงกับผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้จากการคำนวณ-ออกแบบ และไม่ปรากฏ แถบดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อไวรัส (non-specific bands) ตลอดจนการมีระดับความไว (sensitivity) สูงในการตรวจสอบ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 801 bp กับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ขนาด 800 bp ดังแสดงในภาพที่ 26

6.3 การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การตรวจสอบ *Potato virus Y* จากเนื้อเยื่อใบ โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ 'Y02F': 5'-TGAGAATGCAAAACCAAC(A/C)CTTAG-3' และ 'Y03R': 5'-ATCCTCGGTGGTGTG CCTC-3' และมีการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA พบว่าการเตรียมกรดนิวคลีอิกรวม (total nucleic acid) จากเนื้อเยื่อใบของพืช ตามวิธีการสกัดแยก ดังแสดงข้างต้น (ข้อ 4.1) ให้กรดนิวคลีอิกที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น template ในปฏิกิริยาใน RT

สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 30 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 50-68^o เป็นเวลา 30 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ พบว่ามีความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR product) เป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 313 bp

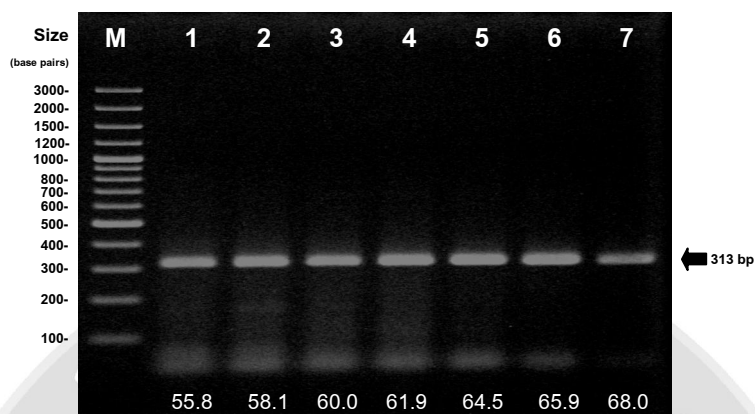
ผลการศึกษา-ทดลองเบื้องต้นเพื่อหาสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมของปฏิกิริยาถูกใช้ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส สภาพอุณหภูมิ (temperature profile) ของการเกิดปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วย การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิสามระดับเป็นรอบอย่างต่อเนื่อง ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ ได้แก่ denaturation, annealing และ extension ตามลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งในการ

ทดลองนี้ได้กำหนดระดับอุณหภูมิสำหรับการ denature และ extension ดีเอ็นเอในปฏิกิริยาที่ 94^o ซ เป็นเวลา 1 นาที และ 72^o ซ เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ ในแต่ละรอบ จำนวน 35 รอบ

ในการทดลองนี้ได้ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบประสิทธิภาพของปฏิกิริยาที่ใช้ระดับอุณหภูมิของการเกิด annealing ที่แตกต่างกันในช่วงอุณหภูมิ 55-68^o ซ จำนวน 7 ระดับ ได้แก่ 55.8, 58.1, 60.0, 61.9, 64.5, 65.9 และ 68.0^o ซ ที่ให้ระยะเวลา 1 นาทีเท่ากัน ในทุกระดับอุณหภูมิ โดยพิจารณาเปรียบเทียบ ความจำเพาะเจาะจงของการให้ผลผลิตดีเอ็นเอ ปริมาณความเข้มของแถบดีเอ็นเอ และคุณภาพการแสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลอะกาโรส ภายใต้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 302 นาโนเมตร

ผลของการทดลองซึ่งแสดงรูปแบบของแถบผลผลิตดีเอ็นเอบนแผ่นเจลดังแสดงใน ภาพที่ 27 ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ ที่ขนาดความยาว 313 คู่เบส ในทุกระดับอุณหภูมิของปฏิกิริยา เมื่อเทียบกับขนาดความยาวของโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 27, Lane M) โดยมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่สูงมากในทุกระดับอุณหภูมิของปฏิกิริยา (เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณความเข้มของโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาดความยาว 300 คู่เบสซึ่งมีปริมาณ 6 นาโนกรัม) โดยให้ผลในความเข้มของแถบดีเอ็นเอสูงสุดที่ระดับอุณหภูมิ 64.5^o ซ ของปฏิกิริยา และแสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่มีคุณภาพ ที่ระดับอุณหภูมิ 64.5, 65.9 และ 68.0^o ซ ของปฏิกิริยา ซึ่งให้พื้นหลังของแต่ละช่องเจลที่สะอาดชัดเจนและปราศจากปื้น (smear) จากการติดสีย้อมของดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ เมื่อเปรียบเทียบกับผลของระดับอุณหภูมิที่ 55.8, 58.1, 60.0 และ 61.9 และพบการปรากฏไดเมอร์ของไพรเมอร์ในทุกระดับอุณหภูมิของปฏิกิริยา แต่พบมีปริมาณที่ลดต่ำลงเมื่อระดับอุณหภูมิสูงขึ้น และปรากฏแถบไดเมอร์ของไพรเมอร์ที่จางที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 68.0^o ซ เมื่อเปรียบเทียบกับทุกระดับอุณหภูมิของปฏิกิริยา

การประเมิน-วิเคราะห์ความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสเป้าหมายในการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ที่มีการติดเชื้อบนมันฝรั่งโดยธรรมชาติในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกร โดยการตรวจสอบไวรัสจากตัวอย่างเนื้อเยื่อใบของมันฝรั่ง ซึ่งทำการศึกษาตรวจสอบควบคู่ไปกับการตรวจสอบไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่งอีก 3 ชนิด ได้แก่ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus S* (PVS) และ *Potato virus X* (PVX) (ภาพที่ 28) โดยผลการตรวจสอบการติดเชื้อ PVY โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัส โดยการปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ ที่มีขนาด 313 คู่เบส ซึ่งจำเพาะต่อ PVY และไม่พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดอื่น ในตัวอย่าง S109 (ภาพที่ 28, Lane 3) ผลการตรวจสอบ PVY กับตัวอย่างมันฝรั่งที่ปราศจากการติดเชื้อ PVY ไม่พบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอใดๆ แม้ว่าตัวอย่างเหล่านั้นมีการติดเชื้อ PVA, PVS และ PVX ก็ตาม (ภาพที่ 28A) ตัวอย่าง S109 ที่มีการติดเชื้อ



ภาพที่ 27 แสดงผลของรูปแบบของแถบดีเอ็นเอขนาด 313 bp ที่มีค่าความจำเพาะต่อ PVY และได้จากการตรวจสอบด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ที่ได้จากการศึกษาเปรียบเทียบระดับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เพื่อหาระดับอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาและให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลที่เหมาะสมในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 55-68^oซ จำนวน 7 ระดับ ได้แก่ 55.8, 58.1, 60.0, 61.9, 64.5, 65.9 และ 68.0^oซ

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จาก PCR ที่มีระดับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 55.8^oซ

Lane 1: รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จาก PCR ที่มีระดับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 58.1^oซ

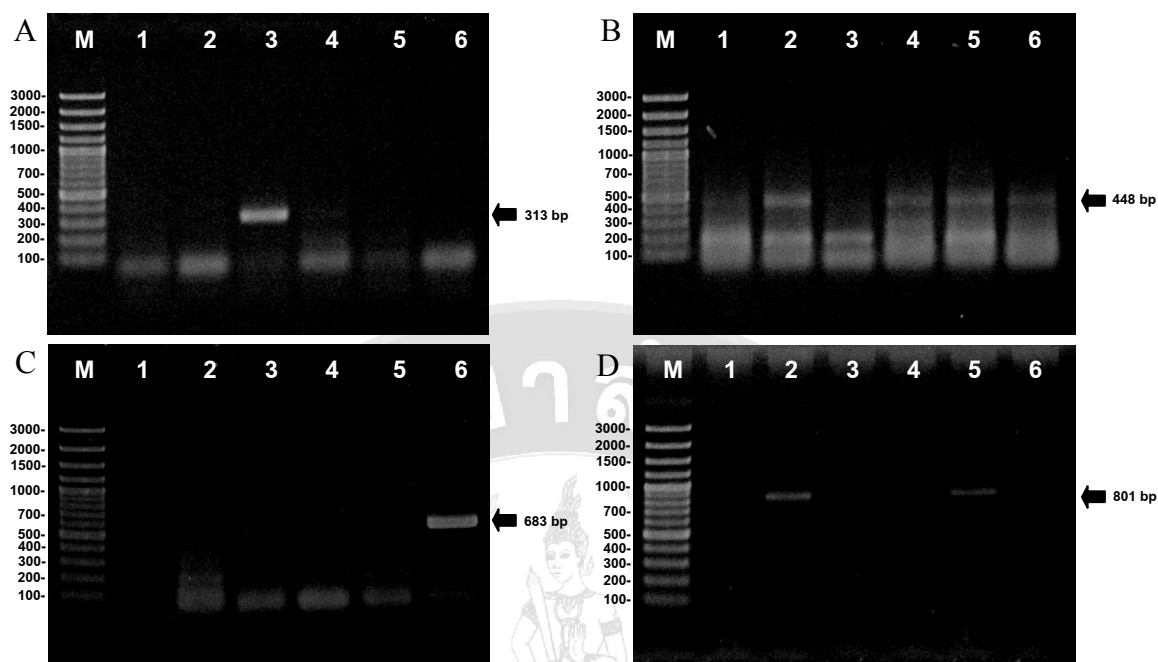
Lane 1: รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จาก PCR ที่มีระดับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 60.0^oซ

Lane 1: รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จาก PCR ที่มีระดับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 61.9^oซ

Lane 1: รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จาก PCR ที่มีระดับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 64.5^oซ

Lane 1: รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จาก PCR ที่มีระดับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 65.9^oซ

Lane 1: รูปแบบแถบดีเอ็นเอ ที่ได้จาก PCR ที่มีระดับอุณหภูมิในขั้นตอน annealing เท่ากับ 68.0^oซ

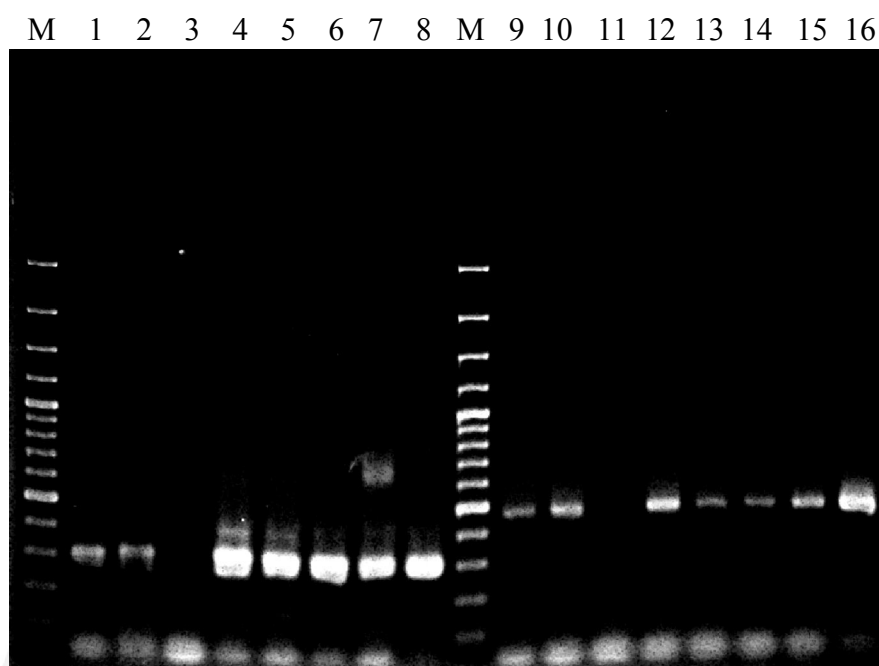


ภาพที่ 28 แสดงผลการตรวจสอบไวรัสของมันฝรั่ง 4 ชนิด ได้แก่ PVY ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ซึ่งให้ผลที่มีความจำเพาะต่อแถบดีเอ็นเอขนาด 313 bp (A) PVA ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ A05F และ A04R ซึ่งให้ผลที่มีความจำเพาะต่อแถบดีเอ็นเอขนาด 448 bp (B) PVS ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV05 และ PV06 ซึ่งให้ผลที่มีความจำเพาะต่อแถบดีเอ็นเอขนาด 683 bp (C) และ PVX ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ X01F และ X02R ซึ่งให้ผลที่มีความจำเพาะต่อแถบดีเอ็นเอขนาด 801 bp (D) จากตัวอย่างมันฝรั่งจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้แก่ Acc No S107, S108, S109, S110, S111 และ S112 ซึ่งแสดงผลการตรวจสอบไวรัสแต่ละชนิด ใน Lane ที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ ส่วน Lane M แสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)) โดยแสดงให้เห็นถึงการไม่เกิดปฏิกิริยาแบบข้าม (cross reaction) ของคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R กับไวรัสชนิดอื่น (PVA, PVS และ PVX) นอกจากการเกิดปฏิกิริยากับ PVY เพียงชนิดเดียวแบบจำเพาะเจาะจง

PVY (ภาพที่ 28A, Lane 3) แต่ปราศจากการติดเชื้อ PVA (ภาพที่ 28B, Lane 3) ในขณะที่ตัวอย่าง S107 S108 S110 S111 และ S112 ไม่พบการติดเชื้อ PVY (ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 313 คู่เบส) (ภาพที่ 28A) แต่พบการติดเชื้อ PVA จากการตรวจสอบด้วยคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ PVA โดยปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 448 คู่เบส (ภาพที่ 28B) นอกจากนี้ การตรวจสอบไวรัสอีก 2 ชนิด ได้แก่ PVS และ PVX ด้วยคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อไวรัสแต่ละชนิด โดยให้ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยการปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 683 คู่เบส และขนาด 801 คู่เบส ซึ่งจำเพาะต่อ PVS และ PVX ตามลำดับ (ภาพที่ 28C และ 28D) พบการติดเชื้อ PVS ในตัวอย่าง S112 (ภาพที่ 28C, Lane 6) และตรวจสอบพบการติดเชื้อ PVX ซึ่งปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 801 คู่เบส ในตัวอย่าง S108 และ S111 (ภาพที่ 28D, Lane 2 และ 5)

ประสิทธิภาพของการตรวจสอบ PVY โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ที่ได้จากการออกแบบในการศึกษาวิจัยนี้ แสดงผลบนอะกาโรสเจล (ภาพที่ 29) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อ PVY และให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 313 bp เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้น (ภาพที่ 29, lane 1-8) ในตัวอย่างมันฝรั่ง จำนวน 8 ตัวอย่าง ได้แก่ Acc No S344, S311, S316, S312, S127, S203, S203 และ S297 ตามลำดับ ซึ่งมีผลรายงานการติดหรือไม่ติดเชื้อ PVY แสดงให้เห็นว่า คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R มีความจำเพาะเจาะจงต่อ PVY เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 313 bp เพียงตำแหน่งเดียวและมีขนาดตรงกับผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้จากการคำนวณ-ออกแบบ ในขณะที่การตรวจสอบโดยวิธี PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV7 และ PV8 ซึ่งมีให้แถบดีเอ็นเอขนาด 480 bp ภายใต้สภาพของปฏิกิริยาที่เหมาะสมในแต่ละคู่ไพรเมอร์ (ภาพที่ 29, lane 9-16) ผลของการเกิดปฏิกิริยาที่แสดงในรูปแบบของแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจลนั้น แสดงการเปรียบเทียบให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการตรวจสอบ PVY ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ที่ได้จากการออกแบบในการศึกษาวิจัยนี้ มีระดับความไว (sensitivity) สูงกว่าการตรวจสอบ PVY ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV7 และ PV8 ในการตรวจสอบ และมีระดับความไว (sensitivity) สูงมากในการตรวจสอบเมื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 313 bp กับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่มีขนาด 300 bp ดังแสดงในภาพที่ 29

ผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่ง จำนวน 34 ตัวอย่างที่มีการเพาะปลูกในโรงเรือนเพาะปลูกพืช(โรงเรือนกระจก) โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R แสดงให้เห็นว่า การตรวจสอบ PVY โดยวิธีที่ได้มีการพัฒนาขึ้นในการวิจัยนี้มีทั้งความไว (sensitivity) และความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อชนิดของไวรัส ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจนและถูกต้องแม่นยำสูง จากภาพที่ 30 จากตัวอย่างโรค



ภาพที่ 29 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่ง จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R (Lane 1 – Lane 8) และคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) PV7 และ PV8 (Lane 9 – Lane 16) โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: Acc No S344

Lane 2: Acc No S311

Lane 3: Acc No S316

Lane 4: Acc No S312

Lane 5: Acc No S127

Lane 6: Acc No S203

Lane 7: Acc No S203

Lane 8: Acc No S297

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 9: Acc No S344

Lane 10: Acc No S311

Lane 11: Acc No S316

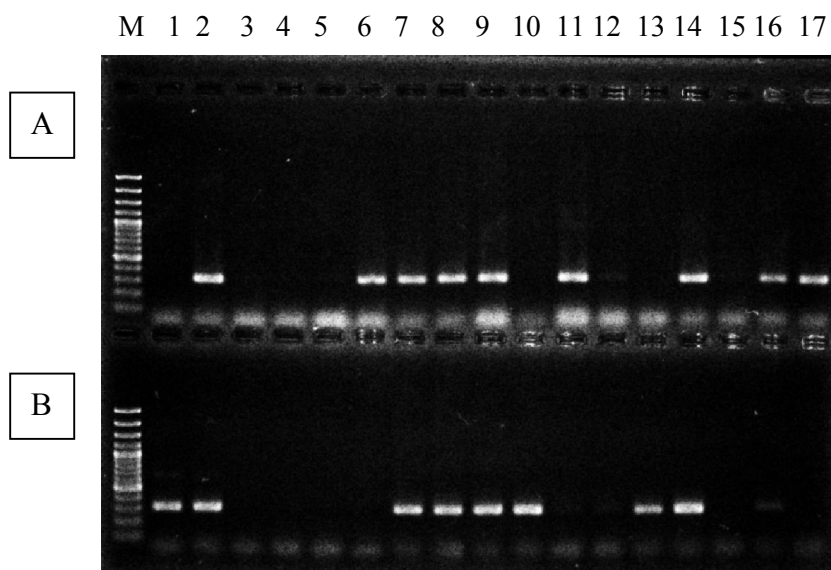
Lane12: Acc No S312

Lane 13: Acc No S127

Lane 14: Acc No S203

Lane15: Acc No S203

Lane 16: Acc No S297



ภาพที่ 30 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่ง จำนวน 34 ตัวอย่าง ที่มีการเพาะปลูกในโรงเรือนเพาะปลูกพืช (โรงเรือนกระจก) โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) Y02F และ Y03R โดยใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription

Panel A Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: Acc No 001	Lane 2: Acc No 002	Lane 3: Acc No 003
Lane 4: Acc No 004	Lane 5: Acc No 005	Lane 6: Acc No 006
Lane 7: Acc No 007	Lane 8: Acc No 008	Lane 9: Acc No 009
Lane 10: Acc No 010	Lane 11: Acc No 011	Lane 12: Acc No 012
Lane 13: Acc No 013	Lane 14: Acc No 014	Lane 15: Acc No 015
Lane 16: Acc No 016	Lane 17: Acc No 017	

Panel B Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: Acc No 018	Lane 2: Acc No 019	Lane 3: Acc No 020
Lane 4: Acc No 021	Lane 5: Acc No 022	Lane 6: Acc No 023
Lane 7: Acc No 024	Lane 8: Acc No 025	Lane 9: Acc No 026
Lane 10: Acc No 027	Lane 11: Acc No 032	Lane 12: Acc No 033
Lane 13: Acc No 034	Lane 14: Acc No 035	Lane 15: Acc No 044
Lane 16: Acc No 045	Lane 17: Acc No 046	

ทั้งหมด จำนวน 34 ตัวอย่าง (lane 1-17, panel A และ B) พบว่า มีการติดเชื้อ PVY ในตัวอย่างมันฝรั่งจำนวน 17 ตัวอย่าง (ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 313 bp และไม่พบการติดเชื้อ PVY ในตัวอย่างมันฝรั่งจำนวน 17 ตัวอย่าง (ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ขนาด 313 bp)

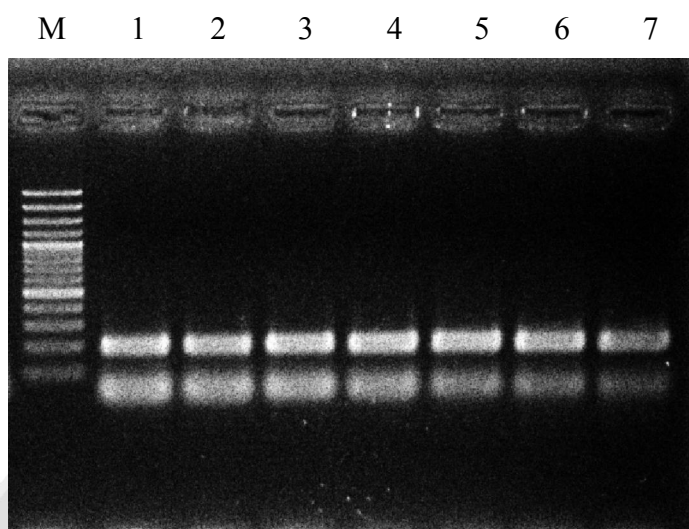
6.4 การพัฒนาระบบตรวจสอบ *Potato leafroll virus* (PLRV) ในตัวอย่างใบมันฝรั่ง

การตรวจสอบ *Potato leafroll virus* (PLRV) จากเนื้อเยื่อใบ โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ R38F และ R32R โดยใช้ R32R เป็นไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA พบว่าการเตรียมกรดนิวคลีอิกรวม (total nucleic acid) จากเนื้อเยื่อใบของพืช ตามวิธีการสกัดแยก ดังแสดงข้างต้น (ข้อ 4.1) ให้กรดนิวคลีอิกที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น template ในปฏิกิริยาใน RT

สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 52^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ พบว่ามีความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR product) เป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 205 bp

ประสิทธิภาพของการตรวจสอบ PLRV โดยวิธี RT-PCR ด้วย คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ R38F และ R32R โดยใช้ R32R ที่ได้จากการออกแบบในการศึกษาวิจัยนี้ แสดงผลบนอะกาโรสเจล (ภาพที่ 31) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจง (specificity) ต่อ PLRV และให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 205 bp เพียงตำแหน่งเดียวเท่านั้นในตัวอย่าง Acc No. S006_2 ซึ่งมีขนาดตรงกับผลผลิตของปฏิกิริยาที่ได้จากการคำนวณ-ออกแบบ ความไวในการตรวจสอบไวรัสด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ข้างต้นให้ผลในความไว (sensitivity) ที่สูงมาก ดังแสดงในภาพที่ 31 โดยการเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 205 bp กับความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 200 bp และพบว่ามีความไวสูงกว่าการใช้คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV9 และ PV10 โดยใช้ PV10 เป็นไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription ซึ่งให้แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 255 bp (ภาพที่ 11) ในวิธี PCR ที่มีการปฏิบัติและสภาพการเกิดปฏิกิริยาเดียวกัน

การเปรียบเทียบผลของปฏิกิริยา (PCR product) ที่มีการใช้ RNA template ที่เตรียมได้ตามวิธีการที่ได้มีการอธิบายข้างต้นในข้อ 4.1) ให้กรดนิวคลีอิกที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น template ในปฏิกิริยาใน RT ซึ่งมีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ดังนี้ 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 2.00, 3.00 และ 4.00 ไมโครลิตร ของ RNA template ที่เตรียมได้ ในปฏิกิริยา RT



ภาพที่ 31 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato leaf roll virus* (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่คาดว่าจะมีการติดเชื้อ PLRV หมายเลข Acc No. S006_2 โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) R38F และ R32R โดยใช้ R32R เป็นไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA และใช้ RNA template ในปริมาณที่แตกต่างกันในปฏิกิริยา reverse transcription

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: 0.25 ไมโครลิตร RNA template ในปฏิกิริยา RT ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร

Lane 2: 0.50 ไมโครลิตร RNA template ในปฏิกิริยา RT ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร

Lane 3: 0.75 ไมโครลิตร RNA template ในปฏิกิริยา RT ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร

Lane 4: 1.00 ไมโครลิตร RNA template ในปฏิกิริยา RT ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร

Lane 5: 2.00 ไมโครลิตร RNA template ในปฏิกิริยา RT ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร

Lane 6: 3.00 ไมโครลิตร RNA template ในปฏิกิริยา RT ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร

Lane 7: 4.00 ไมโครลิตร RNA template ในปฏิกิริยา RT ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร

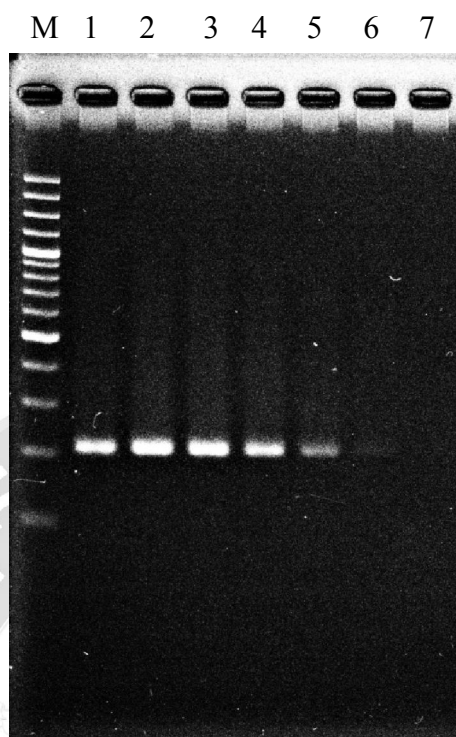
ปริมาตรสุทธิ 10 ไมโครลิตร ผลการทดลองที่ปรากฏบนอะกาโรสเจล ดังแสดงในภาพที่ 31 แสดงให้เห็นว่าที่ทุกระดับปริมาณของ RNA template (0.25-4.00 ไมโครลิตร) นั้น สามารถให้ผลของปฏิกิริยา (PCR product) เมื่อนำ RT reaction mixture มาใช้เป็น DNA template ใน PCR แต่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 205 bp ที่มีความเข้มสูงสุดในช่วงปริมาณ 0.75-1.00 ไมโครลิตร

ผลของการทดลองที่ได้จากการเปรียบเทียบระดับอุณหภูมิในขั้นตอนของ primer annealing ใน PCR ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 55.8-68.0 °C ซึ่งแสดงรูปแบบของแถบผลผลิตดีเอ็นเอบนแผ่นเจลดังแสดงใน ภาพที่ 32 ปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวน 1 แถบ ที่ขนาดความยาว 205 คู่เบส ในทุกระดับอุณหภูมิของปฏิกิริยา ยกเว้นที่ระดับอุณหภูมิ 68.0 °C (ภาพที่ 32, Lane 7) เมื่อเทียบกับขนาดความยาวของโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐาน (ภาพที่ 32, Lane M) โดยมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันในทุกระดับอุณหภูมิของปฏิกิริยา และมีความเข้มของแถบดีเอ็นเอใน lane ที่ 1-5 ซึ่งมีระดับอุณหภูมิอยู่ในช่วงระหว่าง 55.8-64.5 °C ที่สูงกว่าความเข้มของโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาดความยาว 200 คู่เบส (เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณความเข้มของโมเลกุลดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ขนาดความยาว 200 คู่เบสซึ่งมีปริมาณ 6 นาโนกรัม) โดยให้ผลในความเข้มของแถบดีเอ็นเอสูงสุดที่ระดับอุณหภูมิ 58.1 °C ของปฏิกิริยา และแสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอมีคุณภาพในทุกระดับที่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 205 bp ซึ่งให้พื้นหลังของแต่ละช่องเจลที่สะอาด ชัดเจนและปราศจากปื้น (smear) จากการติดสีย้อมของดีเอ็นเอที่ไม่จำเพาะ และไม่พบการปรากฏโดเมอรัของไพรเมอร์ในทุกระดับอุณหภูมิของปฏิกิริยา

สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR product) เป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 205 bp ประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94 °C เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 55-68 °C เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94 °C เป็นเวลา 2.30 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ

7. การพัฒนาระบบการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง

การตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) จากเนื้อเยื่อใบในหลอดทดลองเดียวในครั้งเดียว โดยวิธี RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ร่วมกับ R38F และ R32R โดยใช้ oligo (dT)₂₄ และ R32R เป็น ไพรเมอร์ ในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (RT) เพื่อการสังเคราะห์ first-strand cDNA พบว่าการเตรียมกรดนิวคลีอิกรวม (total nucleic



ภาพที่ 32 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato leaf roll virus* (PLRV) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อ PLRV หมายเลข Acc No. S006_2 โดยอาศัยหลักวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) R38F และ R32R โดยใช้ R32R เป็นไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA และใช้ระดับอุณหภูมิ annealing ที่แตกต่างกันในปฏิกิริยา polymerase chain reaction

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: ระดับอุณหภูมิ annealing 55.8 องศาเซลเซียส

Lane 2: ระดับอุณหภูมิ annealing 58.1 องศาเซลเซียส

Lane 3: ระดับอุณหภูมิ annealing 60.0 องศาเซลเซียส

Lane 4: ระดับอุณหภูมิ annealing 61.9 องศาเซลเซียส

Lane 5: ระดับอุณหภูมิ annealing 64.5 องศาเซลเซียส

Lane 6: ระดับอุณหภูมิ annealing 65.9 องศาเซลเซียส

Lane 7: ระดับอุณหภูมิ annealing 68.0 องศาเซลเซียส

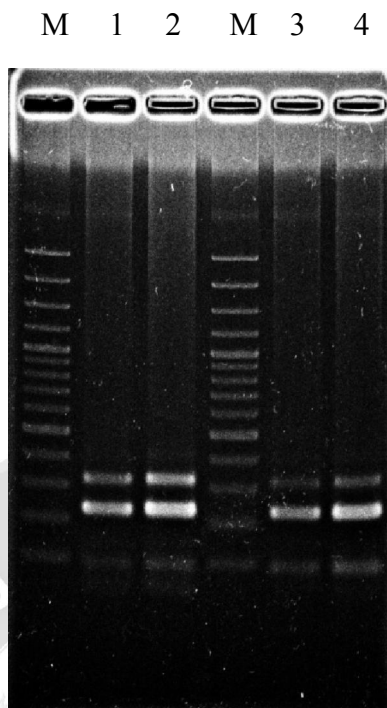
acid) จากเนื้อเยื่อใบของพืช ตามวิธีการสกัดแยก ดังแสดงข้างต้น (ข้อ 4.1) ให้กรดนิวคลีอิกที่มีคุณภาพดีและเหมาะสมในการนำไปใช้เป็น template ในปฏิกิริยาใน RT

สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบ ซึ่งหมุนเวียนตามระดับอุณหภูมิเป็นลำดับในแต่ละรอบ ซึ่งประกอบด้วย ระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 60 วินาที ระดับอุณหภูมิที่ 52^o เป็นเวลา 60 วินาที และ ระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 60 วินาที ตามลำดับ เป็นจำนวน 35 รอบ โดยที่ก่อนและหลังสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นรอบจำนวน 35 รอบนี้ มีการปรับระดับอุณหภูมิที่ 94^o เป็นเวลา 2.30 นาที จำนวน 1 รอบ และระดับอุณหภูมิที่ 72^o เป็นเวลา 5 นาที ตามลำดับ พบว่ามีความเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา โดยให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR product) เป็นแถบดีเอ็นเอขนาด 313 bp และ 205 bp ที่มีความจำเพาะต่อการตรวจสอบ PVY และ PLRV ตามลำดับ

นำตัวอย่าง Acc No. S109 ซึ่งให้ผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ PVY และ PLRV (ตารางที่ 4 และภาพที่ 11) มาเป็นตัวอย่างในการตรวจสอบเพื่อการพัฒนากระบวนการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยศึกษาการตรวจสอบไวรัสทั้งสองชนิดในตัวอย่างเดียวกันที่ทำปฏิกิริยาพร้อมกันในหลอดเดียวกัน นับตั้งแต่ขั้นตอนเริ่มต้นการเตรียมกรดนิวคลีอิกรวม จนถึงขั้นตอนสุดท้ายที่การแสดงผลการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัส

การทดลองเปรียบเทียบปริมาณ cDNA ที่ใช้เป็น template ใน PCR ที่แตกต่างกันสองระดับ ได้แก่ การใช้ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา RT ซึ่งมีการใช้ไพรเมอร์ 2 ตัวร่วมกัน (oligo (dT)₂₄ และ R32R) ที่ 40% (8 ul ใน 20 ul PCR) โดยปริมาตร ของปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยา PCR (ภาพที่ 33, lane 1 และ 2) และ 60% (12 ul ใน 20 ul PCR) โดยปริมาตร ของปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยา PCR (ภาพที่ 33, lane 3 และ 4) ในปฏิกิริยาของ PCR ที่ปริมาตรสุดท้าย 20 ul มีการใช้ปริมาณไพรเมอร์รวม (Y02F และ Y03R ร่วมกับ R38F และ R32R) ที่แตกต่างกันสองระดับ โดยใช้ไพรเมอร์แต่ละตัวปริมาตร 1.0 และ 0.5 ul ของไพรเมอร์ที่ความเข้มข้น 10 uM ในปฏิกิริยาที่ใช้ปริมาณ cDNA ที่ 40% และ 60% โดยปริมาตร ของปริมาตรสุดท้ายของปฏิกิริยา PCR (20 ul) ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถตรวจสอบไวรัสทั้งสองชนิดได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 33 การพัฒนากระบวนการตรวจสอบไวรัสเพื่อการวินิจฉัยโรค โดยการตรวจสอบไวรัสในลักษณะ duplex RT-PCR การทดลองเปรียบเทียบปริมาณของ cDNA ที่ใช้ในปฏิกิริยาให้ผลที่แตกต่างกันในการเกิดปฏิกิริยาซึ่งแสดงรูปแบบของแถบดีเอ็นเอบนอะกาโรสเจล (ภาพที่ 33) การแสดงผลของรูปแบบแถบดีเอ็นเอใน Lane 1 และ 2 ซึ่งใช้



ภาพที่ 33 แสดงผลการตรวจสอบ *Potato leaf roll virus* (PLRV) และ *Potato virus Y* (PVY) ในตัวอย่างมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด หมายเลข Acc No. S109 โดยอาศัยวิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ (DNA primers) R38F และ R32R และ คู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ Y02F และ Y03R โดยใช้ R32R และ oligo (dT)₂₄ เป็น ไพรเมอร์ ในการสังเคราะห์ first-strand cDNA ในปฏิกิริยา reverse transcription

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 1: ผลผลิตของ PCR ปริมาตร 5 ul ที่ได้จากการใช้ cDNA 8 ul ในปฏิกิริยา PCR 20 ul (primer mix 1.0 ul each)

Lane 2: ผลผลิตของ PCR ปริมาตร 10 ul ที่ได้จากการใช้ cDNA 8 ul ในปฏิกิริยา PCR 20 ul (primer mix 1.0 ul each)

Lane M: 100 bp plus DNA Ladder (Fermentas)

Lane 3: ผลผลิตของ PCR ปริมาตร 5 ul ที่ได้จากการใช้ cDNA 12 ul ในปฏิกิริยา PCR 20 ul (primer mix 0.5 ul each)

Lane 4: ผลผลิตของ PCR ปริมาตร 10 ul ที่ได้จากการใช้ cDNA 12 ul ในปฏิกิริยา PCR 20 ul (primer mix 0.5 ul each)

cDNA ที่ใช้เป็น template ใน PCR ที่ 40% (8 ul ใน 20 ul PCR) ให้ผลการตรวจสอบที่ดีกว่า การแสดงผลของรูปแบบแถบดีเอ็นเอใน Lane 3 และ 4 ซึ่งใช้ cDNA ที่ใช้เป็น template ใน PCR ที่ 60% (12 ul ใน 20 ul PCR) ตามลำดับ โดยที่แถบดีเอ็นเอที่ขนาด 205 bp (จำเพาะต่อ PLRV) ในแต่ละ lane มีความเข้มสูงกว่าแถบดีเอ็นเอที่ขนาด 313 bp (จำเพาะต่อ PVY) ใน lane เดียวกัน อย่างไรก็ตามความเข้มของแถบดีเอ็นเอทั้งสองขนาดที่ 205 bp และ 313 bp ก็ยังคงมีความเข้มสูงเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มของแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ขนาด 200 bp และ 300 bp



วิจารณ์ผล

การเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคมันฝรั่งซึ่งแสดงลักษณะอาการที่คาดว่ามิสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสในโครงการวิจัยนี้ ได้มีการดำเนินการในฤดูการเพาะปลูกของปีเพาะปลูก พ.ศ. 2550-2551 และ พ.ศ. 2551-2552 ทั้งสองปีของการดำเนินโครงการ ในพื้นที่เพาะปลูกของเกษตรกร จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และ ตาก ซึ่งนับเป็นตัวแทนของพื้นที่เพาะปลูกมันฝรั่งมากกว่าร้อยละ 90 ของพื้นที่เพาะปลูกทั้งหมดของประเทศ ในสภาพแปลงเพาะปลูกมันฝรั่งของเกษตรกร พบการเกิดโรคและการระบาดของโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสได้ในพื้นที่ทั่วไป ในระดับการเกิดโรค (disease incidence) และ ความรุนแรง (disease severity) ที่แตกต่างกันไป ทั้งนี้ ขึ้นกับปัจจัยเกี่ยวข้องหลายประการ ได้แก่ การเลือกใช้หัวพันธุ์มันฝรั่งที่มีคุณภาพและปราศจากเชื้อไวรัส สาเหตุโรคในการเพาะปลูกมักมีระดับการเกิดโรคที่ต่ำและไม่รุนแรง ในขณะที่การใช้หัวพันธุ์มันฝรั่งที่ไม่มีคุณภาพและมีการติดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคซึ่งได้จากการเก็บหัวมันฝรั่งที่เพาะปลูกได้ในฤดูปลูกที่ผ่านมา มักมีการเกิดโรคและแพร่ระบาดในระดับที่รุนแรง แหล่งหรือพื้นที่เพาะปลูก นับเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ โดยเฉพาะพื้นที่ที่มีประวัติการระบาดของโรคอย่างต่อเนื่องมักมีการเกิดโรคและระบาดอย่างรุนแรง ซึ่งเกี่ยวข้องกับการมีพืชอาศัยอื่นของไวรัสและแมลงพาหะ การหมุนเวียนชนิดของพืชเพาะปลูกในพื้นที่นั้น การปลูกเป็นพื้นที่ใหญ่ต่อเนื่องกันเป็นพื้นที่กว้างหรือการเป็นพื้นที่ที่มีการแยกตัวออกจากแหล่งเพาะปลูก ตลอดจน ระบบเพาะปลูกและการจัดการโรคของเกษตรกรและ/หรือผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ ความแตกต่างของลักษณะพื้นที่เพาะปลูกแบบพื้นที่ราบกับพื้นที่ไหล่เขาที่มีลักษณะการเพาะปลูกที่แตกต่างกัน และความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคของมันฝรั่งที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสในระดับที่แตกต่างกันซึ่งมักมีผลให้เกษตรกรหรือผู้ประกอบการที่เกี่ยวข้องให้ความสำคัญที่ต่ำเกินไปในการบริหารและจัดการโรคพืชที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส โดยส่วนใหญ่ของเกษตรกรยังขาดความรู้ความเข้าใจที่ถูกต้องเกี่ยวกับโรค และการเกิดโรค-แพร่ระบาดของโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัส การแสดงลักษณะอาการของการติดเชื้อไวรัสในระดับแปลงเพาะปลูกนั้นมักปรากฏอาการร่วมกันในหลายลักษณะ ทำให้ยากแก่การจำแนกโรคและการวินิจฉัยในเบื้องต้นที่ระดับแปลงเพาะปลูก โดยลักษณะอาการส่วนใหญ่ที่พบ ได้แก่ ใบด่าง ผิดรูปร่าง ย่น หัก เป็นคลื่น ม้วน เส้นใบไหม้ ขอบใบหยัก เป็นต้น โดยทั่วไปมันฝรั่งที่มีการติดเชื้อ และแสดงลักษณะอาการที่ผิดปกติเหล่านี้มักมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ ในลักษณะแคระแกรน และมักพบการระบาดของแมลงพาหะไวรัสสาเหตุโรค เช่น เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว เป็นต้น ในพื้นที่บริเวณเพาะปลูกเสมอ

การเก็บรักษาใบมันฝรั่งตัวอย่างโรคที่ได้จากการเก็บรวบรวมที่อุณหภูมิ -80°C (Deep freezer) ภายหลังจากที่ได้ทำการขึ้นทะเบียนตัวอย่างโรค โดยระบุหมายเลขตัวอย่าง (accession number) บันทึกรายงานลักษณะอาการที่สังเกตได้และบันทึกภาพทุกตัวอย่าง เพื่อนำไปใช้เป็นตัวอย่างเพื่อตรวจสอบหาไวรัสและ/หรือใช้เป็นแหล่งของไวรัส (source of inoculum) นั้น พบว่ามีระยะเวลาในการเก็บรักษาได้ประมาณ 3 เดือนเท่านั้น ในการที่จะนำมาใช้เป็นตัวอย่างเพื่อตรวจสอบหาไวรัสและ/หรือ ใช้เป็นแหล่งของไวรัส (source of inoculum) ในการปลูกเชื้อไวรัสไปยังมันฝรั่งปกติ เนื่องจากไวรัสทั้งสี่ชนิด ได้แก่ PVA, PVX, PVY และ PLRV ซึ่งมีสารพันธุกรรมเป็นโมเลกุลของอาร์เอ็นเอ (RNA molecule) นั้น มีการถูกย่อยสลายและเสียสภาพธรรมชาติไปในเซลล์ของพืช (จากเนื้อเยื่อใบของมันฝรั่ง) แม้ว่าจะมีการเก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิ -80°C (Deep freezer) ก็ตาม

การเพาะปลูกมันฝรั่งภายใต้สภาพโรงเรือนเพาะปลูกพืช (มุ้งตาข่าย) และ ภายนอกโรงเรือนเพาะปลูกพืชภายใต้สภาพธรรมชาติ ในปีที่ 1 (2550-2551) โดยใช้หัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าที่ผ่านการตรวจสอบ-รับรองการปลอดไวรัสสาเหตุโรค และหัวพันธุ์มันฝรั่งที่ได้จากการปลูกของเกษตรกรในฤดูปลูกก่อนหน้านี้ และเก็บรักษาในห้องเย็นที่ระดับอุณหภูมิ $2-4^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลา 8-9 เดือนก่อนนำมาใช้เป็นหัวพันธุ์เพื่อการเพาะปลูกสามารถเก็บรวบรวมตัวอย่างโรคที่คาดว่าจะเกิดจากการติดเชื้อไวรัสและพบการเกิดโรคในระดับสูงในมันฝรั่งที่ใช้หัวพันธุ์มันฝรั่งที่ได้จากการปลูกของเกษตรกรในฤดูปลูกก่อนหน้านี้ซึ่งน่าจะเกิดจากไวรัสที่อาจถ่ายทอดมาทางหัวมันฝรั่งที่ใช้ทำพันธุ์ ในขณะที่ไม่พบการเกิดโรคในมันฝรั่งที่เพาะปลูกจากหัวพันธุ์มันฝรั่งนำเข้าที่ผ่านการตรวจสอบ-รับรองการปลอดไวรัสสาเหตุโรค ทั้งนี้ผลการเกิดโรคกับมันฝรั่งที่ทำการเพาะปลูกภายใต้สภาพการควบคุมบนแปลงเพาะปลูกทดลอง ภายใต้สภาพโรงเรือนกระจกปลูกพืชทดลอง ในปีที่ 2 ก็ให้ผลในลักษณะเดียวกันดังที่กล่าวข้างต้น

การตรวจสอบและวินิจฉัยโรคเบื้องต้น โดยอาศัยการแสดงลักษณะอาการนั้น พบว่า ยากต่อการนำมาใช้ในการจำแนกโรคและระบุยืนยันไวรัสสาเหตุโรคของมันฝรั่ง การแสดงลักษณะอาการของโรคมักปรากฏลักษณะอาการร่วมกัน เช่น ใบด่าง หจิก เส้น-ใบผิดปกติ ใบรูปร่างผิดปกติ ต้นแคระแกรน เป็นต้น ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการติดเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิด หรือเป็นผลจากความผันแปรเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เอื้อในการพัฒนาลักษณะอาการของโรคที่แตกต่างกัน โดยลักษณะอาการของไวรัสอาจไม่แสดงลักษณะอาการที่แตกต่างเด่นชัดเพียงพอแก่การระบุชนิดของไวรัสที่มีการติดเชื้อในการวินิจฉัยเบื้องต้นโดยอาศัยการแสดงออกของลักษณะอาการบนมันฝรั่ง แต่เพียงอย่างเดียว

การตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคที่สำคัญบนมันฝรั่งจากตัวอย่างใบมันฝรั่งที่เก็บรวบรวมได้ โดยเทคนิควิธีการที่อาศัยหลักการของ PCR ในปีแรกของการวิจัย (ตค. 2550 – กย. 2551) นั้น โครงการฯ ได้มีการวิจัยและพัฒนา วิธีการและระบบตรวจสอบไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่ง จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) ด้วยคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ได้มีการตีพิมพ์เผยแพร่มาก่อนหน้า ซึ่งประกอบด้วยดีเอ็นเอไพรเมอร์ ดังแสดงรายละเอียดใน ตารางที่ 1 ภายหลังจากการสังเคราะห์ สายแรกของดีเอ็นเอ ด้วยการใช้ oligo (dT)₂₄ เป็นดีเอ็นเอไพรเมอร์ในปฏิกิริยา RT พบว่า มีเพียงบางคู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์ที่ได้มีการตีพิมพ์เผยแพร่มาก่อนหน้าเท่านั้นที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสจากเนื้อเยื่อใบมันฝรั่งได้ แต่มีประสิทธิภาพต่ำในการตรวจสอบไวรัส ได้แก่ การมีความไว (sensitivity) ต่ำในการตรวจสอบ PVA ด้วยคู่ ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV17 และ PV18 (ภาพที่ 6) และ PLRV ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV9 และ PV10 (ภาพที่ 11) หรือ ความไม่ชัดเจนและความไม่จำเพาะในการแสดงแถบดีเอ็นเอต่อไวรัสที่ตรวจสอบ PVX ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ PV19 และ PV20 (ภาพที่ 7)

โครงการวิจัยฯ ได้ดำเนินการพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสที่มีการติดเชื้อในมันฝรั่ง เพื่อให้ได้วิธีการที่มีประสิทธิภาพและเหมาะสม เริ่มตั้งแต่การเตรียมกรดนิวคลีอิก (nucleic acid) จากใบมันฝรั่งซึ่งใช้เนื้อเยื่อใบของมันฝรั่งในปริมาณที่ต่ำ (100-150 มก.) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่สามารถเตรียมได้ง่าย ไม่ยุ่งยากในห้องปฏิบัติการ ค่าใช้จ่ายในการเตรียมตัวอย่างต่ำ และปราศจากขั้นตอนการใช้สาร phenol ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม โดยปริมาณและคุณภาพของ กรดนิวคลีอิก (nucleic acid; DNA and RNA) สามารถนำมาใช้เป็นแม่แบบเพื่อตรวจสอบไวรัสได้เป็นอย่างดี **คู่ของดีเอ็นเอไพรเมอร์เพื่อตรวจสอบไวรัส 4 ชนิด** ได้แก่ *Potato virus A* (PVA), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) ได้มีการออกแบบในโครงการวิจัยฯ นี้ซึ่งให้ผลผลิตของปฏิกิริยา (PCR products) ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 205-801 คู่เบส (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นถึง**ความจำเพาะเจาะจงต่อลำดับนิว คลีโอไทด์ของไวรัสแต่ละชนิด** มีการพัฒนาสภาพที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบไวรัสในปฏิกิริยาการถอดรหัสแบบย้อนกลับ (reverse transcription: RT) และ ปฏิกิริยาลูกโซ่ของเอ็นไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (polymerase chain reaction: PCR) เพื่อให้ได้สภาพที่เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการตรวจสอบไวรัส ที่แสดงผลบนอะกาโรสเจล (agarose gel) ในระบบของเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (gel electrophoresis)

โครงการวิจัยฯ ได้พัฒนาระบบของการตรวจสอบไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่งทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ PVA, PVX, PVY และ PLRV และได้ประสิทธิภาพสูงสุด ภายใต้อสภาพแวดล้อมของปฏิกิริยา

และการปฏิบัติที่เหมาะสมในการที่จะนำมาใช้เป็นวิธีการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดในเนื้อเยื่อของมันฝรั่ง ดังที่ได้แสดงผลการตรวจสอบ PVA, PVX, PVY และ PLRV ในภาพที่ 25, 26, 28 และ 31 ตามลำดับ นอกจากนี้โครงการวิจัยยังได้มีการพัฒนาระบบการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่งที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ PVY และ PLRV จากเนื้อเยื่อใบ ในหลอดทดลองเดี่ยวในครั้งเดียวในลักษณะ duplex RT-PCR ซึ่งสามารถตรวจสอบไวรัสทั้งสองชนิดได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 33

การวิจัยและพัฒนาในการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคของมันฝรั่ง ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาต่อยอดให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบไวรัสที่มีการถ่ายทอดผ่านทางหัวพันธุ์มันฝรั่ง ซึ่งจัดเป็นแหล่งของไวรัสที่สำคัญในการเป็นสาเหตุก่อโรคและแพร่ระบาดในระดับแปลงเพาะปลูกหากมีการติดเชื้อในหัวพันธุ์ และจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการตรวจสอบยืนยันการปราศจากไวรัส (virus-free) ในหัวพันธุ์ เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตหัวพันธุ์มันฝรั่งในประเทศ ตลอดจนการกักกัน-คัดกรอง หัวพันธุ์มันฝรั่งที่ใช้ในการเพาะปลูก ส่วนของระบบการวินิจฉัยโรคไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่ง ควรมีการศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาต่อยอดในลักษณะ multiplex (RT)-PCR หรือ การใช้เทคนิค-วิธีการ real time (RT)-PCR ตลอดจนการประยุกต์ใช้ข้อดีของเทคนิค-วิธีการอิมมูโน (immunological technique) ในวิธีการตรวจสอบไวรัสสาเหตุโรคของมันฝรั่ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบไวรัสสาเหตุและพัฒนาระบบการวินิจฉัยโรคไวรัสที่สำคัญของมันฝรั่งต่อไป

สรุปผล

โครงการวิจัยและพัฒนาการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง โดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุลที่ได้มีการดำเนินการในปีงบประมาณ 2551-2552 และบรรลุวัตถุประสงค์ที่ได้เสนอไว้ทุกประการ ในการพัฒนาและผลิต ชุดตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง ด้วยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุลโดยการศึกษาวเคราะห์พันธุกรรมระดับโมเลกุลของเชื้อไวรัสชนิดต่างๆ ที่เป็นสาเหตุโรคของมันฝรั่งในประเทศไทย และการตรวจสอบ-จำแนกไวรัส เพื่อแก้ปัญหาอุปสรรคในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่งให้มีประสิทธิภาพและสะดวกในการปฏิบัติ

การวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่งโดยเทคนิควิธีการระดับโมเลกุล ซึ่งอาศัยเทคนิค-วิธีการของ RT-PCR ด้วยคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'A05F' 5'-CGA TTT AGG TAC TGC TGG GAC TCA-3' และ 'A04R' 5'-CCT GGG CAT GTA TGG TTT CTC-3', ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของ PVA ในการตรวจสอบ คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'X01F' 5'-TGC CGA TCT CAA GCC ACT CTC C-3' และ 'X02R' 5'-ACT GGG GTA GGC GTC GGT TAT GTA-3', ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของ PVX ในการตรวจสอบ คู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'Y02F' 5'-TGA GAA TGC AAA ACC AAC (A/C)CT TAG-3' และ 'Y03R' 5'-ATC CTC GGT GGT GTG CCT C-3', ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของ PVY ในการตรวจสอบ และคู่ดีเอ็นเอไพรเมอร์ 'R38F' 5'-GCA CGG CAG TAT TCA AGA T-3' และ 'R32R' 5'-ACC ACT GCC AAT AGA TGA GAC-3', ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของ PLRV ในการตรวจสอบ โดยให้ผลการตรวจสอบของการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิดเป็นแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏบนอะกาโรสเจลซึ่งมีขนาดที่แตกต่างกัน ได้แก่ 448, 801, 313 และ 205 bp ตามลำดับ และได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบไวรัสและการวินิจฉัยโรคของมันฝรั่งให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ทั้งความถูกต้องแม่นยำความจำเพาะเจาะจง ความไวในการตรวจสอบ และความเร็วในการให้ผลยืนยันในระดับที่มั่นใจ ตลอดจนการพัฒนาวิธีการปฏิบัติให้สะดวกขึ้น และมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำลง

ผลการทดลองในการพัฒนาระบบการวินิจฉัยโรคไวรัสของมันฝรั่ง ด้วยการตรวจสอบ *Potato virus Y* (PVY) และ *Potato leafroll virus* (PLRV) จากเนื้อเยื่อใบ ในหลอดทดลองเดี่ยวในครั้งเดียว ลักษณะ duplex RT-PCR ด้วยคู่ไพรเมอร์ Y02F และ Y03R ร่วมกับ R38F และ R32R แสดงให้เห็นว่า สามารถตรวจสอบไวรัสทั้งสองชนิดได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ให้ผลการตรวจสอบที่ชัดเจน

เอกสารอ้างอิง

- ธีระ สุตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี้พับบลิชชิง, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2550. มันฝรั่ง: เนื้อที่ ผลิต และผลผลิตต่อไร่ เป็นรายจังหวัด ปี 2548-2551. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา <http://www.oae.go.th/statistic/yearbook49/section4/sec4table68> (25 มีนาคม 2552).
- Ashoub, A., W. Rohde and D. Prufer. 1998. In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. **Nucleic Acids Res.** 26: 420 – 426.
- Candresse, T., R.W. Hammond and A. Hadidi. 1998. Detection and identification of plant viruses and viroids using polymerase chain reaction, pp. 399-416. In A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa, eds. **Plant Virus Disease Control**. APS Press, Minnesota, USA.
- De Bokx, J.A. and H. Huttinga. 1981. Potato virus Y. C.M.I./A.A.B. Descr. Pl. Viruses 242, 6 pp.
- Du, Z., J. Chen and C. Hiruki. 2006. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. **Plant Dis.** 90: 185-189.
- Henson, J.M. and R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. **Annu. Rev. Phytopathol.** 31: 81-109.
- Hull, R. 2002. **Matthew's Plant Virology**. 4th ed. Academic Press, Bath, Great Britain.
- Kekarainen, T., A. Metits, I. Oruetebarrial, M.-L. Rajamaki and J.P.T. Valkonen. 1999. Comparison of the complete sequences of five different isolate of potato virus A (PVA). **Arch. Virol.** 144: 1-12.
- Lough, T. J., K. Shash, B. Xoconostle-Cazares, K.R. Hofstra, D.L. Beck, E. Balmori, R.L.S. Forster, and W.J. Lucas. 1998. Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. **Mol. Plant Microbe In.** 11: 801-814.

- Lough, T.J., N.E. Netzler, S.J. Emerson, P. Sutherland, F.Carr, D.L.Beck, W.J. Lucas and R.L.S. Forster. 2000. Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. **Mol. Plant Microbe In.** 13: 962-974.
- Martin, R.R. 1998. Advanced diagnostic tools as an aid to controlling plant virus diseases, pp. 381-391. In A. Hadidi, R.K. Khetarpal and H. Koganezawa, eds. **Plant Virus Disease Control**. APS Press, Minnesota, USA.
- Martin, R.R., D. James and C. A. Levesque. 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. **Annu. Rev. Phytopathol.** 38: 207-239.
- Matthews, R.E.F. 1993. **Diagnosis of Plant Virus Diseases**. CRC Press Inc, Florida, USA.
- McCartney, H. A., S.J. Foster, B. A. Fraaije and E. Ward. 2003. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. **Manag. Sci.** 59: 129-142.
- Morozov, S.Y., K.V. Kanyuka, K.E. Levay and S.K. Zavriev. 1990. The putative RNA replicase of potato virus M : obvious sequence similarities with potex- and tymoviruses. **Virology** 179: 911-914.
- Mullis, K.B., F. Faloona, S.J. Scharf, R.K. Saiki, G.T. Horn and H.A. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*; the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.** 51: 263-273.
- Nie, X. and R.P. Singh. 2000. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. **J. Virol. Methods** 86: 179-185.
- Peiman, M. and C. Xie. 2006. Sensitive detection of potato viruses, PVX, PLRV and PVS, by RT-PCR in potato leaf and tuber. **Australas Plant Dis. Notes** 1: 41-46.
- Riesmeier, J.W., U.I. Flugge, B. Schulz, D. Heineke, H.W. Heldt, L. Willmitzer and W.B. Frommer. 1993. Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 6160 – 6164.
- Ryazantsev D.Yu. and S.K. Zavriev. 2009. An efficient diagnostic method for the identification of potato viral pathogens. **Mol. Biol.** 43: 558 – 567.

- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higushi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** 239: 487-491.
- Santa, Cruz S., A.G. Roberts, A.D. Prior, S. Chapman and K.J Oparka. 1998. Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X. The role of virions. **Plant Cell** 10: 495-510.
- Schaad, N.W., R.D. Frederick, J. Shaw, W.L. Schneider, R. Hickson, M. Petrillo and D. G. Luster. 2003. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. **Annu. Rev. Phytopathol.** 41: 305-324.
- Singh, R.P. and M. Singh. 1998. Specific detection of potato virus A in dormant tubers by reverse-transcription polymerase chain reaction. **Plant Dis.** 82: 230-234.
- Singh, R.P., J. Kurz and G. Boiteau. 1996. Detection of stylet-borne and circulative potato viruses in aphids by duplex reverse transcription polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods** 59: 189-196.
- Singh, R.P., J. Kurz, G. Boiteau and G. Bernard. 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. **J. Virol. Methods** 55: 133-143.
- Ward, E., S.J. Foster, B.A. Fraaije and H.A. McCartney. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. **Annu. Appl. Biol.** 145: 1-16.
- Waterhouse, P.M. and P.W.G. Chu. 1995. Nucleic acid based approaches to plant virus and viroid diagnostic, pp 195-214. In J.H. Skerritt and R. Appels, eds. **New Diagnostics in Crop Science, Biotechnology in Agriculture**. CAB International, Wallingford, UK.