บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างพืชที่ใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค จากแหล่งปลูกลำไยในเขตจังหวัดลำพูนและเชียงใหม่(ภาพที่ 11) พบว่ามีการระบาดของโรคพุ่มไม้กวาดประมาณ 70-80 เปอร์เซ็นต์ในแปลงปลูก อาการของโรคพุ่มไม้กวาดจากสภาพธรรมชาติ (ภาพที่ 12) ตัวอย่าง โรคพุ่มไม้กวาดที่เกิดจากไรลำไยดูดกินในห้องปฏิบัติการความคล้ายคลึงกันในพันธุ์เดียวกัน(ภาพที่ 13) ตัวอย่างลำไยปกติ ต้นแพงพวยที่ผ่านการเสียบกิ่งจากลำไยที่เป็นโรค แพงพวยที่ผ่านการเสียบกิ่งจากลำไยปกติ และ ฝอยทองที่ใช้ถ่ายทอดเชื้อสาเหตุจากลำไยที่เป็นโรคไปยังต้นแพงพวยปกติ (ภาพที่ 14) ตัวอย่างพืชที่เก็บไว้เพื่อตรวจเชื้อนั้น ได้แก่ ส่วนของยอดที่มีใบติดอยู่ และเส้นกลางใบ นำมาเก็บไว้ที่-80 องศาเซลเซียส เพื่อจะได้นำมาใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

2. การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืช

หลังจากเก็บตัวอย่างพืชมาสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการสกัดดีเอ็นเอมะม่วงเพื่อใช้สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในหลอดทดลอง เมื่อตรวจดูดีเอ็นเอบน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis ใน ½TBE buffer พบว่า ดีเอ็นเอของลำไยอยู่ในสภาพค่อนข้างสมบูรณ์ไม่แตกหักและดีเอ็นที่ได้มีสีขาวขุ่นมีลักษณะเหนียวเล็กน้อย จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้เพื่อทำการทดลองต่อไป

3. การตรวจวินิจฉัยโรคพุ่มไม้กวาดลำไย

3.1 การตรวจวินิจฉัยโรคพุ่มไม้กวาดโดยใช้ DNA probe

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างพืชในข้อ2. นำมาตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมา ตามวิธี Dot blot hybridization โดยใช้ DNA probe ที่ผลิตได้จากโรคพุ่มฝอยของงา(16rSE) พบว่า DNA probe ไม่ทำปฏิกิริยา hybridize กับดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชที่เป็นโรคและตัวอย่างพืชปกติ ยกเว้นแพงพวยที่เป็นโรค periwinkle viresence (CV) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอชุดควบคุม (positive control) (ภาพที่ 15)จากนั้นนำเอาดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้เพื่อทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นของเชื้อไฟโตพลาสมาในพืชที่เป็นโรคด้วยเทคนิค PCR

4.1. การตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาในตัวอย่างพืชโดยใช้เทคนิค PCR โดยการนำดีเอ็นเอต้นแบบจากตัวอย่างพืชซึ่งผ่านการตรวจด้วยวิธี dot-blot hybridization ผลแสดงเป็น negative ทั้งหมด และคัดเลือกนำมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมาโดยใช้ universal primer R16F2 และ R16R2 จากนั้นตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอ บน agarose gel electrophoresis 0.8 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืชที่แสดงอาการของโรค ยกเว้น positive control ซึ่งเป็นดีเอ็นเอของ SCWL(sugarcane white leaf)โดยจะให้แถบแบนหลักที่ 1.2 กิโลเบส(ภาพที่ 16)

4.1.2. ผลจากการนำดีเอ็นเอจากตัวอย่างพืชมาทดสอบมาเพิ่มปริมาณในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ universal primer ของกลุ่มไม้ผล คือ primer fU3 และ rU5 แล้วตรวจวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้บน 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืชที่แสดงอาการของโรคและพืชปกติที่นำมาตรวจสอบ ยกเว้นดีเอ็นเอชุดควบคุม(ภาพที่ 17)

4.1.3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและการตรวจหาเชื้อไฟโตพลาสมา โดยวิธี Nested PCR นำดีเอ็นเอจากพืชปกติและพืชที่เป็นโรคมาเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ จากนั้นใช้เทคนิค Nested PCR ในการตรวจสอบ โดยใช้ primer จำนวน 2 คู่ คือ คู่แรกจะใช้ universal primer R16F1 และ R16RO (ภาพที่ 18) จากนั้นนำเอา PCR product ที่ได้ ไปทำปฏิกิริยารอบที่ 2 โดยเจือจาง PCR product ที่ได้ในน้ำกลั้น แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้ primer คู่ที่ 2 คือ R16F2/R16R2 จากการวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis พบว่าไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในพืชที่เป็นโรคและพืชปกติได้ ยกเว้น positive control (ภาพที่ 19)

5. การตรวจสอบอนุภาคไวรอยด์โดย sPAGE

จากการนำตัวอย่างพืชทั้งหมดที่นำมาสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจหาแถบ RNAใน polyacrylamide gel 5 เปอร์เซ็นต์ (non-denatured PAGE) จะพบว่าตัวอย่างที่ 1,2,3,4,5 และพบ RNA –band ที่บริเวณ 4 S RNA, 5S RNA, 7S RNA และ ปรากฏ RNA-band บน 7S RNA บางๆ ซึ่งคาดว่าจะเป็นอนุภาคของไวรอยด์(ภาพที่20) และผลจากการตัดย้ายเจลแรกไปยังเจลที่สอง (denature gel) ย้อมด้วย sliver nitrate พบว่าไม่ปรากฏ RNA-band จากนั้นเก็บอาร์เอ็นเอที่ได้ไว้เพื่อทำปฏิกิริยา PCR ต่อไป

6. การตรวจสอบไวรอยด์โดยวิธี Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

จากการตรวจสอบหาดีเอ็นเอของไวรอยด์ในตัวอย่างพืช พบRNA-bandที่น่าสนใจขนาด 480 bp บนตัวอย่างลำไยที่แสดงอาการพุ่มไม้กวาด และตัวอย่างแพงพวยที่ผ่านการเสียบกิ่งจากลำไยที่แสดงอาการของโรค โดยพบ RNA-band ขนาดประมาณ 300 bp และ 400 bp (ภาพที่ 21) โดย DNA specific primer ที่จำเพาะกับเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม CEVd เพียง primer เดียว ส่วน primer ของไวรอยด์ในกลุ่มอื่นๆไม่สามารถเพิ่มดีเอ็นเอได้

ก

ข

ภาพที่ 11 อาการพุ่มไม้กวาดของลำไยสภาพธรรมชาติ
ก. ยอดลำไยที่เป็นโรคไม้กวาด
ข. ดอกลำไยที่เป็นโรคพุ่มไม้กวาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

ก ข

ภาพที่ 12 ลำไยแสดงอาการโรคพุ่มไม้กวาด
ก. ลำไยพันธุ์เบี้ยวเขียวแสดงอาการโรคพุ่มไม้กวาด
ข. ลำไยพันธุ์ดอแสดงอาการโรคพุ่มไม้กวาด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ก ข

ภาพที่ 13 ต้นกล้าลำไยแสดงอาการโรคพุ่มไม้กวาดหลังจากการปล่อยไรดูดกิน และแสดงอาการพุ่มไม้กวาด
ก. ต้นลำไยชุดควบคุม
ข. ลำไยที่แสดงอาการพุ่มไม้กวาด

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ก

ข

ภาพที่ 14 การทดลองถ่ายทอดเชื้อสาเหตุของโรคพุ่มไม้กวาดบนแพงพวย
ก. การเสียบลำไยเป็นโรคบนต้นแพงพวย
ข. การใช้ฝอยทองเป็นสะพานเชื่อมระหว่างลำไยเป็นโรคไปยังแพงพวยปกติ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพที่ 15 Dot Blot Hybridization บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส จากลำไยปกติ ลำไยที่เป็นโรคพุ่มไม้กวาด แพงพวยและฝอยทอง โดยใช้ดีเอ็นเอ ตัวตรวจที่ได้จากโรคพุ่มฝอยงาติดฉลากด้วย สาร digoxigenin สัญญาณที่ปรากฏบนแผ่นเมมเบรน คือ A1:ดีเอ็นเอจากแพงพวยเป็นโรค(positive control) ส่วนในตัวอย่าง, A2 : ดีเอ็นเอจากลำไยปกติ, A3 : ดีเอ็นเอจากแพงพวยเสียบยอด, A4 : ดีเอ็นเอจากแพงพวยปกติ, A5-E8 : ดีเอ็นเอ จากตัวอย่างลำไยที่เป็นโรค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาพที่ 16 แถบดีเอ็นเอขนาด 1.2 กิโลเบส ที่เพิ่มปริมาณได้โดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer R16F2/R16R2 วิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel แถบ M : ดีเอ็นเอ มาตรฐาน (λDNA digested with *Hind* III), แถบดีเอ็นเอ จาก SCWL และ CV : ดีเอ็นเอ ชุดควบคุม, และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นจาก H : ดีเอ็นเอ จากลำไยปกติ, P : ดีเอ็นเอ จากแพงพวย, D : ดีเอ็นเอจากฝอยทอง,4-6 : ดีเอ็นเอ จากตัวอย่างลำไย เป็นโรค, 8 : PCR product ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วน ดีเอ็นเอ (negative control)

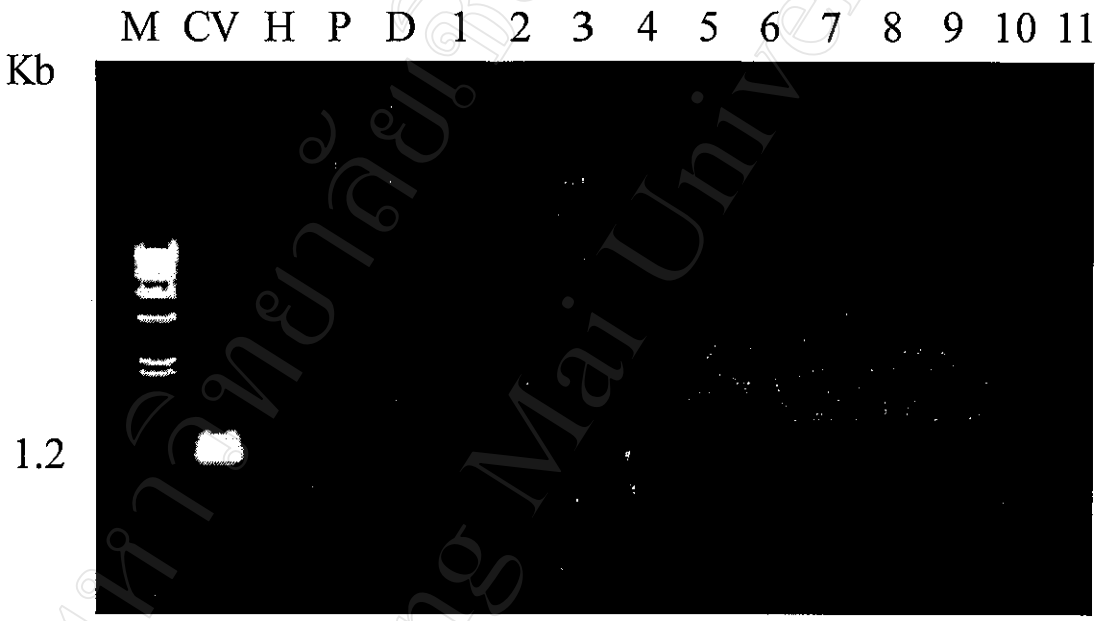
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ภาพที่17 แถบดีเอ็นเอขนาด 0. 874 กิโลเบส ที่เพิ่มปริมาณได้โดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer fU5 และ rU3 วิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis แถบ M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA digested with *Hind* III), แถบดีเอ็นเอจาก CV : ดีเอ็นเอชุดควบคุม, และ ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นจาก H : ดีเอ็นเอจากลำไยปกติ, P : ดีเอ็นเอจากแพงพวย, D : ดีเอ็นเอจากฝอยทอง, 1-11 : ดีเอ็นเอจากตัวอย่างลำไยเป็นโรค, 12 : PCR product ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

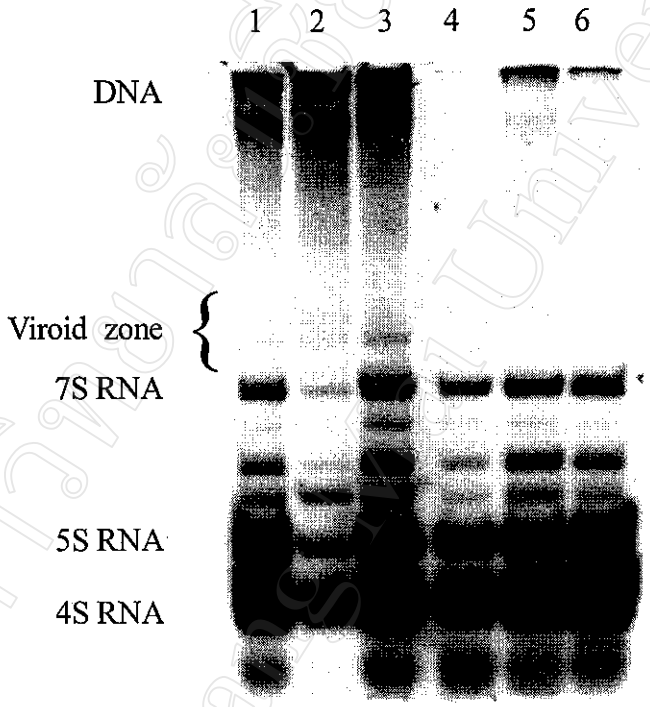
ภาพที่ 18 แถบดีเอ็นเอขนาด 1.4 กิโลเบส ที่เพิ่มปริมาณได้โดยเทคนิค PCR โดยใช้ชุด primer R16F1/R16 RO วิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis แถบ M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λ DNA digested with *Hind* III),แถบดีเอ็นเอจาก CV : ดีเอ็นเอชุดควบคุม, และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นจาก H : ดีเอ็นเอจากลำไยปกติ, P : ดีเอ็นเอจากแพงพวย, D : ดีเอ็นเอจากฝอยทอง, 1-10 : ดีเอ็นเอจากตัวอย่างลำไยเป็นโรค, 11 : PCR product ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University

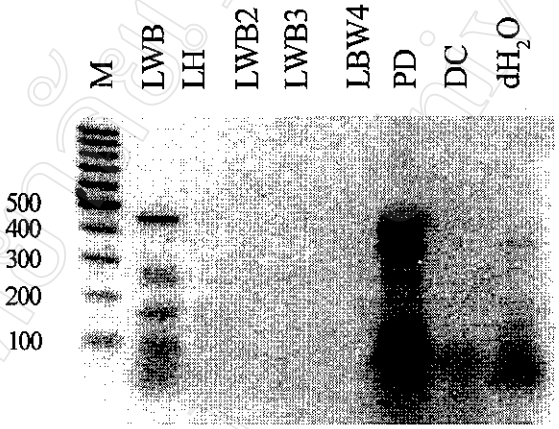


ภาพที่ 19 แถบดีเอ็นเอขนาด 1.2 กิโลเบส ที่เพิ่มปริมาณได้โดยเทคนิค Nested- PCR โดยใช้ primer R16F1/R16RO และ R16F2/R16R2 วิเคราะห์ด้วย 0.8 เปอร์เซ็นต์ agarose gel electrophoresis แถบ M : ดีเอ็นเอมาตรฐาน (λDNA digested with *Hind* III), แถบดีเอ็นเอจาก CV : ดีเอ็นเอชุดควบคุม, และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นจาก H : ดีเอ็นเอจากลำไยปกติ, P : ดีเอ็นเอจากแพงพวย, D : ดีเอ็นเอจากฝอยทอง, 1-10 : ดีเอ็นเอจากตัวอย่างลำไยเป็นโรค, 11 : PCR product ที่ในส่วนผสมของปฏิกิริยาไม่มีชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย (negative control)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University



ภาพที่ 20 ผลการตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ โดยใช้ sPAGE ของเจลที่หนึ่ง 5 เปอร์เซ็นต์ polyacrylamide (non-denature gel) แสดงให้เห็น แถบอาร์เอ็นเอที่ขนาด 4 S RNA , 5 S RNA และ 7 S RNA 1 : ลำไยปกติ, 2 : แพงพวยที่ผ่านการเสียบกิ่งจากลำไยที่เป็นโรค, 3: แพงพวยปกติ, 4-6 : ลำไยเป็นโรคพุ่มไม้กวาด



ภาพที่ 21 แถบดีเอ็นเอที่มีขาดอยู่ในช่วง 300-600 bp ที่เพิ่มปริมาณได้โดยเทคนิค PCR โดยใช้ DNA specific primer ที่จำเพาะกับเชื้อไวรอยด์ในกลุ่ม citrus exocortis viroid (CVEd), M: Molecular weight marker (100 bp DNA ladder) LWB : ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 480 bp, และไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ จากตัวอย่างลำไยที่เป็นโรคหงอย(DC)ตัวอย่างลำไยที่เป็นโรคพุ่มไม้กวาดต่างแหล่งปลูก คือ LWB2, LWB3, LWB4 และลำไยปกติ (LH), น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (dH_2O) และ PD : ปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 300 และ 400 bp