การจำแนกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่ส่งผลกระทบต่อพริกที่ปลูกในพื้นที่ภาคใต้โดยใช้เทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Identification of *Cucumber mosaic virus* Affecting Chili in the South of Thailand by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

มณีรัตน์ คูหาพิทักษ์ธรรม[1*] และ รัชนี ฮงประยูร[2]
Maneerat Koohapitagtam[1*] and Ratchanee Hongprayoon[2]

Abstract

A total of 80 chili leaf samples showing typical mosaic on leaves as symptoms, leaf distortion and stunting of plant were collected from planting areas in 4 provinces in the South of Thailand. Screening of *Cucumber mosaic virus* (CMV) was performed by indirect PTA-ELISA using CMV-specific polyclonal antibody and 29 samples gave positive results. CMV-coat protein (CP) nucleotides of these 29 samples were further amplified by the RT-PCR method using specific primers in the region of the *CP* gene of CMV subgroup I and II, respectively. The results showed that all samples were classified in subgroup I and gave only a specific band of about 500 bp. The validity and reliability of the result of RT-PCR was confirmed by sequencing. Sequence analysis indicated that all positive samples showed 99.28% nucleotide identity in their *CP* genes. It means that they are from the same origin. The phylogenetic analysis placed CMV isolate TaN-10 in subgroup IB. Which is closely related to the CMV isolates in hot pepper and cucumber reported in Thailand.

Keywords : *Cucumber mosaic virus*, chili, identification, ELISA, RT-PCR

[1] ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา 90112
Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Sonkhla 90112. THAILAND

[2] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Sean, Kasetsart University, Kamphaeng Sean Campus, Nakhon Pathom 73140. THAILAND

รับเรื่อง : มีนาคม 2556

* Corresponding author : maneerat.k@psu.ac.th

บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างใบพริกขี้หนูและใบพริกชี้ฟ้าที่ต้นพริกแสดงอาการใบด่าง ลีบเรียวเล็กผิดรูปร่าง และลำต้นแคระแกร็น จากแปลงปลูกใน 4 จังหวัดของภาคใต้ จำนวน 80 ตัวอย่าง นำมาคัดเลือกใบพริกที่ติดเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยใช้ anti-CMV PAb พบตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก จำนวน 29 ตัวอย่าง การตรวจสอบ *CP* gene ของเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *CP* gene ของเชื้อ CMV subgroup I และ II พบว่าตัวอย่างทั้งหมดติดเชื้อ CMV subgroup I โดยให้ขนาดดีเอ็นเอ ประมาณ 500 คู่เบส จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และทำ multiple alignment ของ *CP* gene ของเชื้อ CMV ทุกตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณได้ มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99.28% แสดงว่าเป็นเชื้อไวรัสไอโซเลทเดียวกัน การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของเชื้อ CMV ไอโซเลท TaN-10 ของ *CP* gene พบว่าจัดอยู่ใน subgroup IB และมีความใกล้ชิดมากกับเชื้อ CMV ที่แยกได้จากพริกและแตงกวาในประเทศไทย

คำนำ

การปลูกพริกในพื้นที่ภาคใต้ มีทั้งที่ปลูกไว้เพื่อจำหน่ายภายในประเทศ และส่งออกไปยังต่างประเทศ ตลาดค้าพริกที่สำคัญของภาคใต้ ได้แก่ตลาดหาดใหญ่ ตลาดหัวอิฐ และภูเก็ต ตลาดส่งออกพริกในต่างประเทศที่สำคัญได้แก่ ประเทศมาเลเซียและสิงคโปร์ แหล่งผลิตพริกที่สำคัญในภาคใต้ได้แก่ จังหวัดพัทลุง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช กระบี่ และจังหวัดสงขลา (Yuangket, 2009) จากการรายงานของศูนย์บริหารศัตรูพืช จังหวัดสงขลา พบว่าปัญหาสำคัญสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตพริกในพื้นที่ภาคใต้คือ เรื่องของโรคและแมลง โดยเฉพาะโรคของพริกที่เกิดจากเชื้อไวรัส (Niamsrichand *et al*., 2007) ผลการสำรวจแปลงปลูกพริกในพื้นที่ภาคใต้ โดย Green (1993) พบว่ามีเชื้อไวรัสแพร่ระบาด ในทุกแหล่งปลูก ซึ่งเชื้อไวรัสใบด่างแตง (*Cucumber mosaic virus*, CMV) เป็นเชื้อไวรัสที่แพร่กระจายมากที่สุดถึง 50% โดยอัตราความเสียหายในด้านคุณภาพ และปริมาณผลผลิตของพริกที่ติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ มีมากถึง 10-100% (Patarapuwadol *et al*., 2008; Tan *et al*., 2012)

เชื้อ CMV มีจีโนมเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว (single-stranded RNA) แบบ positive sense มี 3 โมเลกุล (tripartite genome) เชื้อไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ในสกุล *Cucumovirus* วงศ์ *Bromoviridea* ที่พบแพร่ระบาดและทำความเสียหายให้กับพืชประมาณ 855 ชนิด ทั่วทุกภูมิภาคของโลก ซึ่งครอบคลุมทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ พืชล้มลุกและพืชยืนต้น (Nemat *et al*., 2006) ในปัจจุบันพบว่าเชื้อ CMV มีมากกว่า 70 สายพันธุ์ และสามารถจำแนกออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ subgroup I และ subgroup II ตามความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยา (serological relationships) (Singh *et al*., 1995) การ mapping โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส nucleic acid hybridization และการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัส (Roossinck, 2002; Nemat *et al*., 2006) โดยที่เชื้อไวรัสสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีพืชอาศัย ความรุนแรงในการก่อโรคในพืชอาศัย ตลอดจนการถ่ายทอดโรคจากต้นพืชเป็นโรคไปยังต้นพืชปกติ โดยเพลี้ยอ่อนซึ่งเป็นแมลงพาหะใกล้เคียงกัน การจำแนกเชื้อ CMV มีประโยชน์ไม่เพียงแต่การศึกษาความหลากหลาย (diversity) และการแพร่ระบาดของสายพันธุ์เชื้อไวรัสในแหล่งปลูกพืชนั้นๆ แล้ว ยังสามารถนำสายพันธุ์ไวรัสที่พบในแหล่งปลูกพืชนั้นๆ มาใช้คัดเลือกเพื่อหาพันธุ์พืชต้านทานต่อเชื้อไวรัส ซึ่งจะนำไปสู่วิธีการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Yu *et al*., 2005; Patarapuwadol *et al*., 2008)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกเชื้อ CMV ที่พบแพร่ระบาดในแหล่งปลูกพริกในภาคใต้ด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ CMV ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้และเชื้อ CMV ที่พบในแหล่งต่างๆ

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CP* gene เพื่อที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ CMV ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการคัดเลือกพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อเชื้อ CMV ในพื้นที่ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเชื้อ CMV

เก็บตัวอย่างเชื้อ CMV จากแปลงปลูกพริกขี้หนู (*Capsicum frutescens* L.) และแปลงปลูกพริกชี้ฟ้า (*C. annuum* L.) คละกัน รวมจำนวนทั้งสิ้น 16 แห่ง จาก 8 อำเภอ 4 จังหวัด ในพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ อำเภอท่าชนะและอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอขนอมและอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอเขาชัยสนและอำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง อำเภอระโนดและอำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา โดยทำการเก็บตัวอย่างพริกจำนวน 5 ตัวอย่างต่อแปลงปลูกพริก 1 แห่ง และแปลงปลูกพริก 2 แห่งต่อ 1 อำเภอ รวมตัวอย่างพริกที่เก็บมาทั้งสิ้นจำนวน 80 ตัวอย่าง ลักษณะอาการของต้นพริกที่นำมาศึกษา คืออาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบลีบเรียวเล็กผิดรูปร่าง และลำต้นพริกแคระแกร็น ตัวอย่างใบพริกทั้งหมดเก็บแยกใส่ลงในถุงพลาสติก แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปตรวจสอบเชื้อ CMV ในขั้นตอนต่อไป

2. การตรวจสอบเชื้อ CMV ในเบื้องต้นด้วยเทคนิค indirect plate-trapped antigen ELISA (indirect PTA-ELISA)

คัดเลือกตัวอย่างใบพริกขี้หนูและใบพริกชี้ฟ้าที่ติดเชื้อ CMV ในเบื้องต้นด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีซึ่งผลิตได้จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ด้วยการฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองด้วยเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS (anti-CMV PAb) และทำการตรวจสอบคุณภาพของแอนติบอดีแล้วว่าสามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV ได้ทั้ง 2 subgroup (Koohapitagtam, 2011) นอกจากนี้ในการทดลองได้ทำการบดตัวอย่างใบพริกใน 1x phosphate buffer saline (1xPBS; 8 มิลลิโมลาร์ Na_2HPO_4, 1.8 มิลลิโมลาร์ KH_2PO_4, 2.7 มิลลิโมลาร์ KCl และ 136.8 มิลลิโมลาร์ NaCl), pH 7.4 แทนการบดใน carbonate coating buffer ซึ่งเป็นบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับให้โปรตีนยึดเกาะ ELISA plate ได้ดีนั้น (Crowther, 2001) เนื่องจากในการผลิต anti-CMV PAb ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด ในการตรวจสอบเชื้อ CMV จากใบพริก ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA แล้ว พบว่าบัฟเฟอร์ทั้ง 2 ชนิด ให้ผลในการตรวจสอบเชื้อ CMV ได้ชัดเจนทั้งคู่ เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control ที่ใช้คือ ตัวอย่างใบพริกปกติทำปฏิกิริยากับ anti-CMV PAb (Koohapitagtam, 2011) นอกจากนี้บัฟเฟอร์ PBS เป็นบัฟเฟอร์ที่มีใช้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการทั้งในงานทางด้านชีรัมวิทยา และชีวโมเลกุล (Scarpa *et al*., 2010) ทำให้สะดวกต่อการนำมาใช้

การตรวจสอบเชื้อ CMV จากตัวอย่างใบพริกด้วยวิธี indirect PTA-ELISA ดัดแปลงจาก Clark and Adam (1977) โดยบดตัวอย่างใบพริกในบัฟเฟอร์ PBS อัตราส่วน 1: 5 (กรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่น้ำคั้นพืชที่เตรียมได้ลงในหลุม ELISA plate (Costar Cat. No. 3590, Corning Inc., New York, USA) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในกล่องเก็บความชื้น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้าง ELISA plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBS ที่มี 0.5% Tween 20 ผสมอยู่ (PBST) ปริมาตรหลุมละ 300 ไมโครลิตร 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นเติมโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่เจือจางใน blocking buffer (PBS ที่ผสม 3% skim milk) อัตราส่วน 1: 500 ลงในหลุม ELISA plate ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่ม ELISA plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างหลุม ELISA plate ด้วยบัฟเฟอร์ PBST 3 ครั้ง ตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น เติม goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) ที่เจือจางใน blocking buffer อัตราส่วน 1:10,000 ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที ล้างหลุม ELISA plate ด้วย บัฟเฟอร์ PBST 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที

ตรวจดูปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายสับสเตรท (10 มิลลิโมลาร์ Diethanolamine, 0.5 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$; pH 9.8) ที่มี *p*-nitrophenyl phosphate (PNPP, 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3N NaOH ปริมาตรหลุมละ 100 ไมโครลิตร อ่านผลของปฏิกิริยาที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader กำหนด positive control ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS ที่แยกสกัดบริสุทธิ์ เชื้อ CMV subgroup I และ II (Agdia Inc., Elkhart, USA) ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่เป็นบวกคือค่าที่มากกว่าค่าที่อ่านได้จากใบพริกปกติ 2 เท่า ซึ่งใช้เป็น negative control

3. การตรวจสอบเชื้อ CMV subgroup I และ II โดยใช้เทคนิค RT-PCR

3.1 ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (*CP* gene)

ออกแบบคู่ไพรเมอร์ (forward และ reverse primer) ที่จำเพาะเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ *CP* gene ของเชื้อ CMV subgroup I และ II ตามการรายงานของ Yu *et al*. (2005) โดย forward primer ได้แก่ CMV I-F (5'-CGACTTAATAAGACGTTAGCAGC-3') ออกแบบให้ตรงกับนิวคลีโอไทด์ของ *CP* gene ตำแหน่งที่ 121-143 ของเชื้อ CMV subgroup I และ forward primer ได้แก่ CMVII-F (5'-TCCCAATGCTAGTAGAACCTCC-3') ออกแบบให้ตรงกับนิวคลีโอไทด์ของ *CP* gene ตำแหน่งที่ 18-39 ของเชื้อ CMV subgroup II ตามลำดับ ในขณะที่ reverse primer ได้แก่ CMV-R (5'-TGCTCRAYGTCRACA TGAAG-3') ออกแบบให้ตรงกับนิวคลีโอไทด์ที่เป็นเบสอนุรักษ์ (conserved sequence) ของ *CP* gene ของเชื้อ CMV ทั้ง 2 subgroup ตำแหน่งที่ 601-620

3.2 การสกัด total RNA และการเพิ่มปริมาณ *CP* gene

สกัด total RNA ของเชื้อ CMV จากใบพริกขี้หนูและใบพริกชี้ฟ้าที่ตรวจพบการติดเชื้อในเบื้องต้นด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยใช้ Total RNA Mini Kit (Plant) (Geneaid, Taipei, Taiwan) จากนั้นทำการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของ *CP* gene ของเชื้อ CMV subgroup I และ II โดยใช้ reverse primer ที่ออกแบบไว้ดังกล่าวข้างต้น และ Superscript™ III reverse transcriptase (Invitrogen, California, USA) ด้วยเทคนิค Reverse transcription (RT)

ทำการสังเคราะห์ *CP* gene ของเชื้อ CMV subgroup I และ II แยกกัน ด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการของ Nemat *et al.* (2006) โดยปฏิกิริยาในหลอด PCR ปริมาตร 200 ไมโครลิตร มีส่วนผสมรวมปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย cDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10xPCR buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร 50 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร 100 พิโคโมลาร์ forward และ reverse primer ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร 10 มิลลิโมลาร์ dNTP ปริมาตร 1 ไมโครลิตร Platinum® *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen, California, USA) 0.2 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 13 ไมโครลิตร ภายหลังจากผสมส่วนผสมเข้ากันดีแล้วจึงนำไปเข้าเครื่อง thermal cycler (Biometra GmbH, Goettingen, Germany) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ ดังนี้ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 35 รอบ ตรวจสอบขนาด *CP* gene ของเชื้อ CMV subgroup I และ II ด้วย 2% agarose gel electrophoresis ก่อนแยกสกัด *CP* gene ออกจากเจลโดยใช้ Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit (Geneaid, Taipei, Taiwan)

4. การโคลน *CP* gene ของเชื้อ CMV

เชื่อมต่อ *CP* gene ของเชื้อ CMV ที่เพิ่มปริมาณได้กับพลาสมิดพาหะ pGEMT-Easy (Promega, Madison, USA) ในหลอด ไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยใช้เอนไซม์ T4 DNA ligase (Promega, Madison, USA) พลาสมิดลูกผสมที่ได้คือ pGEM-T/CMV-CP

จากนั้นเคลื่อนย้ายพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย (competent cell) *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α (QIAGEN, Hilden, Germany) ด้วยวิธี heat shock โดยแช่หลอดปฏิกิริยาในน้ำที่มีอุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที เมื่อครบเวลานำสารละลายเซลล์แบคทีเรียแช่ในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว 2xYT ที่เติมสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (2xYT+Amp) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเซลล์แบคทีเรีย นำไปเขย่าต่อด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมด้วยวิธี blue-white selection โดยดูดสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 300 ไมโครลิตร spread บนอาหารแข็ง 2xYT+Amp ที่เติม IPTG (Isopropyl-β-D Thiogalactopyranoside) (Fermentas, Hanover, USA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิโมลาร์ และ X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (Fermentas, Hanover, USA) 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตรวจสอบเซลล์แบคทีเรียที่มีพลาสมิดลูกผสมโดยใช้คู่ไพรเมอร์ T7 และ SP6 ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นสกัดพลาสมิดลูกผสมออกจากเซลล์แบคทีเรียด้วย QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) นำพลาสมิดที่สกัดได้ส่งตรวจเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา RT-PCR กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CP* gene ของเชื้อ CMV ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Blast) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CP* gene ของเชื้อ CMV ที่เพิ่มปริมาณได้ทุกตัวอย่างด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป DNAMAN Sequence Analysis Software (Lynnon Corporation, Vaudreuil, Quebec, Canada) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มเชื้อ CMV ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้กับไอโซเลทต่างๆ จากการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Molecular Evolution Genetics Analysis (MEGA5) (Tamura *et al*., 2011)

ผลและวิจารณ์

1. การตรวจสอบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA

การคัดเลือกตัวอย่างใบพริกขี้หนูและใบพริกชี้ฟ้าที่ติดเชื้อ CMV จากตัวอย่างใบพริกที่เก็บมาทั้งหมด 80 ตัวอย่าง จากแหล่งปลูกพริก ใน 8 อำเภอ (อำเภอละ 10 ตัวอย่าง คละกันทั้งใบพริกขี้หนูและใบพริกชี้ฟ้า) ของพื้นที่ภาคใต้ ได้แก่ อำเภอท่าชนะและอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี อำเภอขนอมและอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอเขาชัยสนและอำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง อำเภอระโนดและอำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยใช้ anti-CMV PAb ที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV ทั้ง 2 subgroup พบว่ามีตัวอย่างใบพริกทั้งหมด 29 ตัวอย่าง ที่ให้ผลเป็นบวกต่อ anti-CMV PAb โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร (A_{405nm}) อยู่ในช่วง 1.29-1.46 โดย positive control ที่ใช้ ได้แก่ เชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS, เชื้อ CMV subgroup I และ เชื้อ CMV subgroup II สามารถวัดค่า A_{405nm} ได้เท่ากับ 1.57, 1.51 และ 0.52 ตามลำดับ ในขณะที่ negative control (ตัวอย่างใบพริกปกติ) สามารถวัดค่า A_{405nm} ได้เท่ากับ 0.10

แหล่งปลูกพริกที่ตรวจพบเชื้อ CMV ในการศึกษานี้ ได้แก่ อำเภอท่าชนะ จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยมีจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ CMV ทั้งหมด 2 ตัวอย่าง จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บมา 10 ตัวอย่าง (2/10) อำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช 3 ตัวอย่าง (3/10) อำเภอเขาชัยสน และอำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง 9 ตัวอย่าง (9/10) และ1 ตัวอย่าง (1/10) ตามลำดับ อำเภอระโนด และอำเภอรัตภูมิ จังหวัดสงขลา อำเภอละ 7 ตัวอย่าง (7/10) และไม่พบตัวอย่างพริกที่เก็บมาจากอำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี และอำเภอขนอม จังหวัดนครศรีธรรมราช ติดเชื้อ CMV (ภาพที่ 1)

2. การตรวจสอบเชื้อ CMV subgroup I และ II โดยใช้เทคนิค RT-PCR

การตรวจสอบเชื้อ CMV subgroup I และ II จากตัวอย่างพริกที่ตรวจพบเชื้อด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA จำนวนทั้งสิ้น 29 ตัวอย่าง ภายหลังจากการเพิ่มปริมาณ *CP* gene โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ subgroup I และ II ด้วยเทคนิค RT-PCR และทำการตรวจสอบขนาด *CP* gene ด้วย 2% gel electrophoresis แล้ว พบว่าทั้งหมด 29 ตัวอย่าง จะปรากฏแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส เช่นเดียวกันกับตัวอย่างเชื้อ CMV ไอโซเลท 30RS (AY560555) ซึ่งใช้เป็น positive control และจัดอยู่ใน subgroup I (Koohapitagtam, 2003) (ภาพที่ 2) และเมื่อทำการตรวจตัวอย่างพริกทั้งหมด 29 ตัวอย่าง โดยการผสมไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสทั้ง 2 subgroup ลงในปฏิกิริยาเดียวกันแล้ว พบว่าทุกตัวอย่างยังคงให้แถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส ดังเช่นการใส่คู่ไพรเมอร์แยกหลอดกัน แสดงว่าตัวอย่างพริกที่เก็บมาและให้ผลเป็นบวกกับ anti-CMV PAb ตรวจพบเชื้อ CMV เฉพาะ subgroup I เท่านั้น

3. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CP* gene ของเชื้อ CMV

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 500 คู่เบส ที่เพิ่มปริมาณได้จากตัวอย่างใบพริกติดเชื้อทั้งหมด 29 ตัวอย่าง กับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เพิ่มปริมาณได้ทั้งหมด คือ *CP* gene ของเชื้อ CMV ทั้งนี้ได้รายงาน *CP* gene ที่เพิ่มปริมาณได้ในการศึกษาครั้งนี้เข้าสู่ฐานข้อมูลของ GenBank และได้รับ Accession number รวม 29 รายการ ดังแสดงในตารางที่ 1

จากการทำ multiple alignment โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป DNAMAN sequence analysis software พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 29 ตัวอย่าง มีความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์ 99.28% แสดงว่าเป็นเชื้อ CMV ไอโซเลทเดียวกัน ดังนั้นในการทดลองจึงเลือก *CP* gene ของเชื้อ CMV ไอโซเลท TaN-10 (FR820448) มาใช้เป็นตัวแทนในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับเชื้อ CMV ที่พบในประเทศไทยและมีรายงานในฐานข้อมูล GenBank ด้วยโปรแกรม MEGA5 จาก phylogenetic tree พบว่าเชื้อ CMV ไอโซเลท TaN-10 จัดอยู่ใน subgroup IB ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยจัดกลุ่มใกล้ชิดกับไอโซเลท SG, 30RS และ KS44 ซึ่งทั้งหมดเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากพริกในประเทศไทยและมีรายงานก่อนหน้านี้แล้ว

การศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อ CMV ไอโซเลทที่พบแพร่ระบาดในพื้นที่ภาคใต้ จัดอยู่ใน subgroup IB เช่นเดียวกับเชื้อ CMV ไอโซเลทอื่นที่พบในประเทศไทย ซึ่งแยกได้จากพริก แตงกวาและแตงร้าน (Maneechoat, 2010) ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (ภาพที่ 3) แม้ว่าปัจจุบันในทวีปเอเชียจะมีรายงานการพบเชื้อ CMV ใน subgroup อื่นเพิ่มมากขึ้น เช่น subgroup IA ได้แก่ CMV-D8 จากผักกาดหัว ประเทศญี่ปุ่น (Takeshita and Takanami, 1997), CMV-Pf จากพริก ประเทศเกาหลี (Kim *et al*., 2005), CMV จากแกลดิโอลัส ประเทศอินเดีย (Dubey and Singh, 2010) ส่วน subgroup II เช่น CMV-PaFM1 จากพริก ประเทศเกาหลี (Kim *et al*., 2002), CMV-Tsh จากมะเขือเทศ ประเทศจีน (Chen *et al*., 2007), CMV-G93, CMV-G81 และ CMV-Ac21 จาก *Aconitum* spp. ประเทศญี่ปุ่น (Fukumoto *et al*., 2008) และ CMV จากแครอท ประเทศอินเดีย (Afreen *et al*., 2009) อย่างไรก็ตามยังไม่พบ subgroup เหล่านี้ในประเทศไทย

สรุป

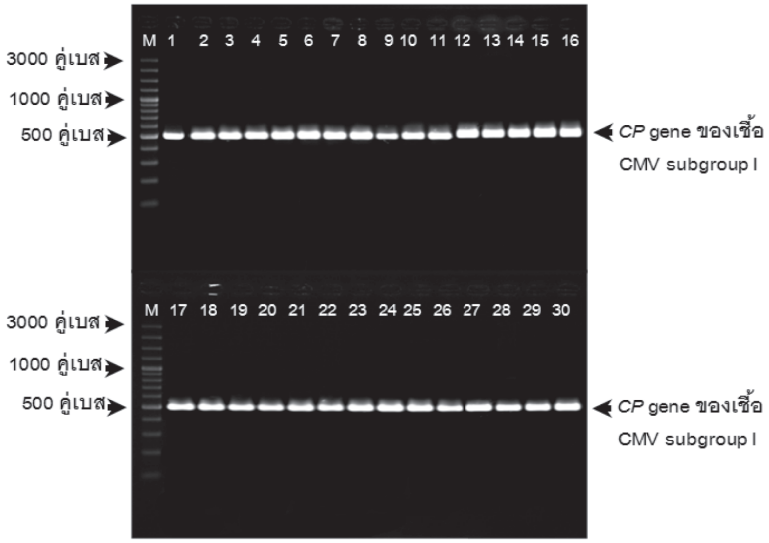
เก็บตัวอย่างเชื้อ CMV จากต้นพริกขี้หนูและต้นพริกชี้ฟ้าที่ใบแสดงอาการด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ลีบเรียวเล็กผิดรูปร่าง และลำต้นพริกแคระแกร็น จากแหล่งปลูกพริกจำนวน 16 แห่ง ในพื้นที่ภาคใต้ รวมตัวอย่างใบพริกที่เก็บมาจำนวนทั้งสิ้น 80 ตัวอย่าง ภายหลังทำการตรวจสอบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยใช้ anti-CMV PAb ที่สามารถทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV ได้ ทั้ง 2 subgroup พบว่ามีตัวอย่างใบพริกทั้งหมด 29 ตัวอย่าง ที่ให้ผลเป็นบวกกับ anti-CMV PAb และเมื่อนำทั้ง 29 ตัวอย่างมาทำการตรวจสอบ โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *CP* gene ของเชื้อ CMV ใน

subgroup I และ II ด้วยเทคนิค RT-PCR แล้วพบว่าตัวอย่างทั้งหมดติดเชื้อ CMV subgroup I โดยจะพบแถบดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส ผลจาก multiple alignment แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CMV ทุกตัวอย่างมีความคล้ายคลึงกัน 99.28% แสดงว่าเชื้อ CMV ที่เก็บได้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไอโซเลทเดียวกัน การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของเชื้อ CMV ไอโซเลท TaN-10 (FR820448) ด้วย phylogenetic tree ของ *CP* gene จัดเชื้อ CMV ไอโซเลท TaN-10 อยู่ใน subgroup IB และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากกับเชื้อ CMV ที่พบในประเทศไทยซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ และแยกกลุ่มออกจากเชื้อ CMV ที่พบในต่างประเทศ

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ภาพที่ 1 แผนที่แสดงอำเภอ (จุดสีเหลือง) และจังหวัด (จุดสีแดง) ในพื้นที่ภาคใต้ที่ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อ CMV ในการศึกษาครั้งนี้ ส่วนสีดำที่ปรากฏอยู่ในจุดสีเหลืองแสดงพื้นที่และจำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ CMV ตามลำดับ

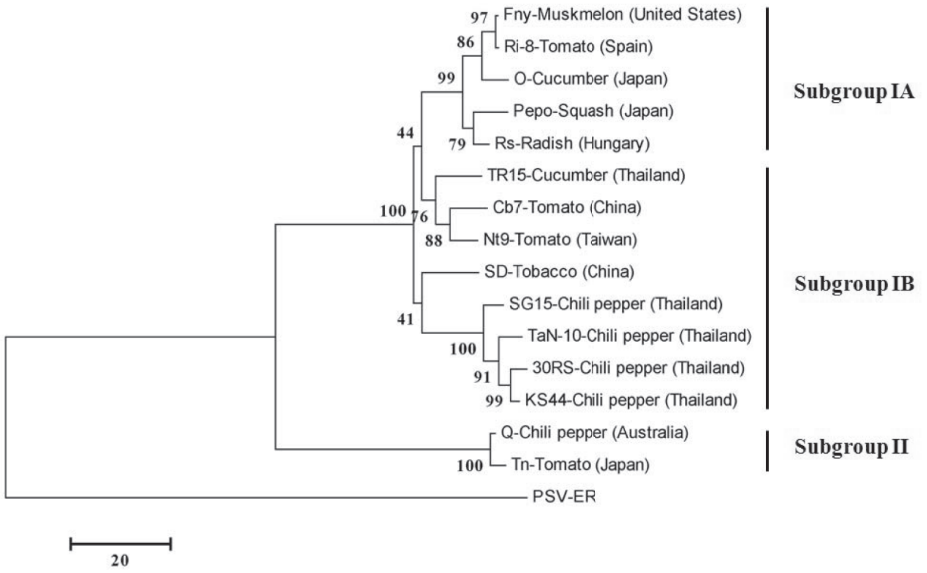


ภาพที่ 2 ผลผลิต *CP* gene ของเชื้อ CMV subgroup I ขนาด 500 คู่เบส จากปฏิกิริยา RT- PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ CMV I-F และ CMV-R, M คือ DNA marker (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, Fermentas), ช่องที่ 1 คือ CMV ไอโซเลท 30RS ซึ่งใช้เป็น positive control ช่องที่ 2-30 คือ ตัวอย่างใบพริก จำนวน 29 ตัวอย่าง ที่ตรวจพบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยใช้ anti-CMV PAb

ตารางที่ 1 Accession number ในฐานข้อมูล GenBank ของยีนเปลือกโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัส CMV ไอโซเลทที่แยกได้จากพริกในการศึกษานี้และแหล่งที่เก็บตัวอย่าง

ไอโซเลท[1/]	Accession no.	แหล่งที่เก็บ(จังหวัด)	ไอโซเลท[1/]	Accession no.	แหล่งที่เก็บ(จังหวัด)
TaN-6	FR820451	สุราษฎร์ธานี	RaS-1	FR820447	สงขลา
TaN-10	FR820448	สุราษฎร์ธานี	RaS-2	FR820464	สงขลา
PaN-3	FR820457	นครศรีธรรมราช	RaS-3	FR820465	สงขลา
PaN-4	FR820458	นครศรีธรรมราช	RaS-4	FR820466	สงขลา
PaN-5	FR820449	นครศรีธรรมราช	RaS-6	FR820467	สงขลา
KhaP-1	FR820450	พัทลุง	RaS-7	FR820468	สงขลา
KhaP-2	FR820459	พัทลุง	RaS-8	FR820469	สงขลา
KhaP-3	FR820446	พัทลุง	RatS-2	FR820453	สงขลา
KhaP-4	FR820460	พัทลุง	RatS-3	FR820470	สงขลา
KhaP-5	FR820455	พัทลุง	RatS-4	FR820471	สงขลา
KhaP-6	FR820461	พัทลุง	RatS-7	FR820472	สงขลา
KhaP-7	FR820456	พัทลุง	RatS-8	FR820473	สงขลา
KhaP-9	FR820462	พัทลุง	RatS-9	FR820474	สงขลา
KhaP-10	FR820463	พัทลุง	RatS-10	FR820454	สงขลา
KhP-2	FR820452	พัทลุง			

หมายเหตุ [1/] ชื่อไอโซเลทมาจากชื่อของอำเภอและหมายเลขของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ CMV ด้วยวิธี indirect PTA-ELISA



ภาพที่ 3 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคแสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกได้พริกในการศึกษานี้ กับไอโซเลทที่พบในประเทศไทย และในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA5 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อ *Peanut stunt virus* เป็น outgroup

เอกสารอ้างอิง

Afreen, B., A.A. Khan, Q.A. Naqvi, S. Kumar, D. Pratap, S.K. Snehi and S.K. Raj. 2009. Molecular identification of a *Cucumber mosaic virus* subgroup II isolate from carrot (*Daucus carota*) based on RNA3 genome sequence analyses. J. Plant Dis. Protect. 116: 193-199.

Chen, Y. K., J. Chen, H. Zhang, H., X. Tang and Z. Du.2007. Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between *Cucumber mosaic virus* subgroup IA and II strains. Virus Genes 35: 405-413.

Clark, M. F. and A. N. Adam. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.

Crowther, J.M. 2001. The ELISA Guidebook. Humana Press Inc. Totowa. 149 page.

Dubey, V. K. and V. P. Singh. 2010. Molecular characterization of *Cucumber mosaic virus* infecting gladiolus, revealing its phylogeny distinct from the Indian isolate and alike the Fny strain of CMV. Virus genes 41:126-134.

Fukumoto, F., S. Fuji, K. Shinoda and M. Iizuka. 2008. *Cucumber mosaic virus* isolated from *Aconitum* spp. in Japan. J. Gen. Plant Pathol. 74: 88-90.

Green, S.K. 1993. Pepper virus research in Taiwan and other Asian countries. Council of agriculture plant protection series No. 1. Proceedings of the symposium on plants virus and virus-like diseases. 213-243.

Kim, J. H., G. S. Choi and J. K. Choi. 2002. Characterization of *Cucumber mosaic virus* subgroup II isolated from paprika (*Capsicum annuum* var. grossum) in Korea. Plant Pathol. J. 18: 6-11.

Kim, M., S. K. Choi, J. Y. Yoon, J. K. Choi and K. H. Ryu. 2005. Biological characterization and sequence analysis of *Cucumber mosaic virus* isolated from *Capsicum annuum*. Plant Pathol. J. 21: 142-148.

Koohapitagtam, M. 2003. Production of monoclonal antibody for diagnosis of *Cucumber mosaic virus*. Thesis Master degree. Kasetsart University. 64 page. (in Thai)

Koohapitagtam, M. 2011. Production of antiserum for diagnosis of *Cucumber mosaic virus* in chili plants. 52 page. (in Thai)

Maneechoat, P. 2010: Biodiversity of *Cucumber mosaic virus* isolated from cucumber in Thailand. Thesis Master degree. Kasetsart University. 103 page. (in Thai)

Nemat, S. B., R. K. Mohammad and N. Z. Shaheen. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. Virus Genes 32:277-288.

Niamsrichand, P., N. Senkeaw, A. Sarawut, S. Kangkamanee, A. Joodkong, L. Supattra, S. Chutamtat., U. Chaleansang, N. Charikprakron and P. Suwanjinda. 2007. Testing of integrated chili production for development chili quality in lower Southern of Thailand. 13 page. (in Thai)

Patarapuwadol, S., W. Sompratoom, R. Keawhwan, K. Sitatanee and S. Wasee. 2008. Screening of *Cucumber mosaic virus* and *Chili veinal mottle virus* resistance sources in *Capsicum* spp. Agricul. Sci. J. 39: 376-379. (in Thai)

Roossinck, M.J. 2002. Evolution history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. J. Virol. 76: 3382-3387.

Scarpa, G., A.L. Idzko, E. Martin and S. Thalhammer. 2010. Toward cheap disposable sensing devices for biological assays. IEEE Transactions on Nanotechnology 9: 527-532.

Singh, Z., R .A .C. Jones and M. G. K. Jones. 1995. Identification of *Cucumber mosaic virus* subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. Plant Dis. 79: 713-716.

Takeshita, M. and Y. Takanami. 1997. Complete nucleotide sequences of RNA3s of *Cucumber mosaic virus* KM and D8 strains. Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University 42: 27-32.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony
methods. Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.

Tan, X., D. Zhang, C. Wintgens, P. Willingmann, G. Adam and C. Heinze. 2012. A comparative testing of *Cucumber mosaic virus* (CMV)-based constructs to generate virus resistant plants. Am. J. Plant Sci. 3: 461-472.

Yu, C., J. Wu and X. Zhou. 2005. Detection and subgrouping of *Cucumber mosaic virus* isolates by TAS-ELISA and immunocapture RT-PCR. J. Virol. Methods 123: 155-161.

Yuangket, P. 2009. Peppers grown in the South. AvailableSource: http://pmc06.doae.go.th/chilly.htm., November 24, 2009