

อาการเส้นใบขยายใหญ่และใบต่างประของพริก เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Wild Tomato Mosaic Virus*

Vein-banding and leaf mottling of Chili caused by *Wild tomato mosaic virus*

แพรวรุจี ชูเชิด^{1,2}, วิชัย โฉมสัตรตน^{1,2,3} และ สุจินต์ ภัทรภูวดล^{1,2,3*}
Prawrujee Chuchad^{1,2}, Wichai Kositratana^{1,2,3} and Sujin Patarapuwadol^{1,2,3*}

Abstract

Several potyviruses have been associated with disease symptoms in Chili including, *Chili vein mottle virus* (ChiVMV), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Potato virus Y* (PVY) and *Tobacco etch virus* (TEV). This study aimed to collect and identify *Potyviruses* infecting Chili in Kanchanaburi province, Thailand. Total of 78 leaves of infected plants displayed symptoms of dark green banding along veins, mosaic, leaf mottling and leaf malformation had been collected from field infected chili. Ca1337, an isolate of the virus was obtained via a local lesion on *Nicotiana glutinosa* and reproduced the same symptoms on inoculated *Capsicum* species (*C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense* and *C. frutescens*), *Datura metel* and *Nicotiana tabacum* (cv. Whiteberley, var. Samsan NN and cv. Xanthi-nc). An electron microscopy revealed flexuous rod-shaped particles with approximate length 730 nm and one major protein of 30 kDa was detected on western blot analysis. The reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with universal primer set of potyvirus which is complimentary to the region of core CP gene (MV/IWCIENG regions) of several potyvirus which expected the 770 bp – PCR product was also detected from Ca1337 RNA template and the amplicon was cloned and sequenced. Comparison of amplicon with the nucleotide sequences available from the NCBI database using BLAST showed 93% identity with *Wild tomato mosaic virus* (WTMV) isolate Laichau from Vietnam (GenBank Accession No. DQ851495). The specific primer set base on WTMV-Laichau coat protein gene was designed to complimentary to the region near the end of *NIb* gene to 3'-untranslated region of WTMV. The expected 1,430 bp – PCR product was obtained from Ca1337 RNA templates and the amplicon was cloned, sequenced (GenBank Accession No. KF250353). The clone sequence of CP gene showed 86.6% nucleotide similarity and 93.2 % amino acid identity to the CP gene of WTMV-Laichau. The results of biological tests, virus particle size, western blot analysis, RT-PCR results, and CP gene sequence data revealed that these Chili plants were infected with WTMV. To our knowledge, this is the first evidence which found WTMV as a causal agent of vein-banding and leaf mottling in *Capsicum* spp.

Keyword: *Wild tomato mosaic virus*, WTMV, *Potyvirus*, Pepper diseases

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

³ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

³ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

รับเรื่อง : ตุลาคม 2556

*Corresponding author: agrsujp@ku.ac.th

บทคัดย่อ

โพทิไวรัสที่พบเป็นสาเหตุของโรคในพริกมีหลายชนิด เช่น *Chili veinal mottle virus* (ChiVMV), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Potato virus Y* (PVY) และ *Tobacco etch virus* (TEV) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและวิเคราะห์สาเหตุของโรคจากตัวอย่างใบพริกที่มีอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ได้แก่ อาการด่างเขียวบริเวณเส้นใบ เส้นใบขยายใหญ่ ใบด่างลาย ใบด่างประ และใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ในจังหวัดกาญจนบุรี จาก 78 ตัวอย่าง เมื่อปลูกเชื้อไวรัสลงในพืชชนิดต่างๆ โดยวิธีกล สามารถแยกเชื้อไวรัสไอโซเลต Ca1337 จากอาการจุดแผลเฉพาะแห่งใน *Nicotiana glutinosa* ได้ และเมื่อนำไปปลูกเชื้อทำให้เกิดอาการใบด่างประ อาการด่างเขียวบริเวณเส้นใบและเส้นใบขยายใหญ่ ในพริกสายพันธุ์ต่างๆ *C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense* และ *C. frutescences*, ลำโพง และ *Nicotiana tabacum* (cv. Whiteberley, var. Samsan NN และ cv. Xanthi-nc) ตรวจสอบลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสไอโซเลต Ca1337 ด้วยกล้อง Transmission electron microscopy พบลักษณะอนุภาคไวรัสแบบท่อนยาวคดประมาณ 730 nm. และเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western blot พบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสเพียง 1 ชนิด ขนาดประมาณ 30 kDa จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสไอโซเลต Ca1337 โดยใช้เทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบให้จำเพาะกับโพทิไวรัสบริเวณ core CP gene (*MP/IIWCIENG* regions) ถึง 3'-untranslated region (3'UTR) พบ PCR product ขนาด 770 bp เมื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัสในฐานข้อมูล NCBI พบความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 93% กับไวรัส *Wild tomato mosaic virus* (WTMV) ไอโซเลต Laichau ในประเทศเวียดนาม (DQ851495) จากนั้นออกแบบไพรเมอร์จากบริเวณปลาย *Nib* gene ของไวรัส WTMV ไอโซเลต Laichau ถึงบริเวณ 3'UTR เพิ่มปริมาณยีนดังกล่าวด้วยเทคนิค RT-PCR พบ PCR product ขนาด 1,430 bp (GenBank Accession No. KF250353) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนบริเวณ CP gene เปรียบเทียบกับจีโนมของโพทิไวรัสในฐานข้อมูล NCBI พบว่ามีความเหมือนกันกับเชื้อโพทิไวรัส WTMV-Laichau ที่ 86.6% และ 93.2 % ตามลำดับ จากผลการศึกษาลักษณะอาการในพืชอาศัย ลักษณะและขนาดของอนุภาคไวรัส ขนาดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส และลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสไอโซเลต Ca1337 สามารถสรุปได้ว่าไวรัสไอโซเลต Ca1337 เป็นเชื้อไวรัส WTMV สายพันธุ์ที่เข้าทำลายพริก

คำนำ

เชื้อโพทิไวรัส (*Potyvirus* species) ที่พบการเป็นสาเหตุของโรคในพริก (*Capsicum* spp.) ได้แก่ *Chili ringspot virus* (ChiRSV) (Ha et al., 2008b), *Ecuadorian rocoto virus* (ERV) (Janzac et al., 2008), *Chili veinal mottle virus* (ChiVMV), *Pepper mild mosaic virus* (PMMV), *Pepper mottle virus* (PepMoV), *Pepper veinal mottle virus* (PVMV), *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV), *Pepper yellow mosaic virus* (PepYMV), *Peru tomato mosaic virus* (PTV), *Potato virus Y* (PVY) และ *Tobacco etch virus* (TEV) (Green and Kim, 1991, Spetz et al., 2003, Adams et al.,

2011) ในประเทศไทยพบเชื้อโพทิไวรัสเข้าทำลายพริก ได้แก่ ChiVMV, PVY, TEV และ PepMoV (Green and Kim, 1991; Kittipakorn et al., 1993; Chiemsobot et al., 1998 และ Tsai et al., 2008) นอกจากนี้ Ha et al. (2008a) ได้รายงานการพบเชื้อโพทิไวรัสชนิดใหม่คือ *Wild tomato mosaic virus* (WTMV) ที่เข้าทำลายมะเขือพวง (*Solanum torvum*) ในประเทศเวียดนาม และเชื้อ WTMV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อไวรัส ChiVMV และ PVMV ที่เข้าทำลายพริกมากที่สุด โดยจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเมื่อวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส

ลักษณะของเชื้อไวรัสใน Family *Potyviridae* มีลักษณะอนุภาคไวรัสแบบท่อนยาวคด ยาว 650-900 nm

เส้นผ่าศูนย์กลาง 11-15 nm ความกว้างของท่อนคอดประมาณ 3.4 nm และมีการสร้าง cytoplasmic cylindrical inclusion (CI) bodies ในเซลล์พืชที่เข้าทำลาย การจำแนกเชื้อไวรัส *Potyvirus* อาศัยข้อมูลชนิดของแมลงพาหะ และลักษณะการถ่ายทอดไวรัสเข้าสู่พืช ความแตกต่างของลักษณะ inclusion bodies พืชอาศัยอาการ และคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อไวรัส โดยเชื้อไวรัสในจีนัสโพทิวไวรัส (genus *Potyvirus*) มีอาร์เอ็นเอเส้นเดียว สายบวก ขนาด 9.7 กิโลเบส ขนาดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (Coat protein) 30-47 kDa โดยส่วนใหญ่มีเพรียออันเป็นแมลงพาหะแบบไวรัสไม่คงอยู่ในตัวแมลง (non-persistent) และสามารถถ่ายทอดโดยวิธีกล (mechanical inoculation) (Adams *et al.*, 2011) นอกจากนี้ International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV (2011) ได้กำหนดเกณฑ์การจัดจำแนกเชื้อโพทิวไวรัส โดย อาศัยข้อมูลจีโนมของเชื้อไวรัสได้ดังนี้ เชื้อไวรัสในจีนัสเดียวกัน จะมีลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Open Reading Frame (ORF) เหมือนกันที่ระดับ 50-55% และเชื้อไวรัสระดับสปีชีส์เดียวกัน จะมีค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส Coat protein (CP) มากกว่า 76% และค่าความเหมือนของลำดับกรดอะมิโนที่ 79.6% ในขณะที่การจำแนกในระดับสายพันธุ์ (strains) จะพิจารณาจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3'UTR โดยมีค่าความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 83-99% (Frenkel *et al.*, 1989 และ Adams *et al.*, 2005) การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อการตรวจวินิจฉัยและจำแนกเชื้อโพทิวไวรัสที่เข้าทำลายพริก ที่มีลักษณะอาการเส้นใบขยายใหญ่ ใบด่างประ และใบบิดเบี้ยวผิดปกติรูปร่างในแหล่งปลูกพริกจากจังหวัดกาญจนบุรี

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง และตรวจสอบเชื้อไวรัสในตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการต่างด้วยเทคนิค PTA-ELISA

เก็บตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการใบด่าง ใบด่างประ เส้นใบขยายใหญ่ และใบบิดเบี้ยวผิดปกติรูปร่าง จากแหล่งปลูกพริกในจังหวัดกาญจนบุรี พ.ศ. 2555 นำตัวอย่างดังกล่าวมาตรวจหาเชื้อไวรัสเบื้องต้นด้วยเทคนิค

Trapped Antigen-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (PTA-ELISA) ตามวิธีการของ Clark and Adams (1977) โดยใช้แอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tobacco mosaic virus* (TMV) และ *ChiVMV* โดยใช้อัตราเจือจางของ แอนติซีรั่มที่จำเพาะต่อเชื้อ CMV และ TMV ที่ 1:1,000 และต่อเชื้อ *ChiVMV* ที่ 1:2,000 นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบเชื้อ *PepMoV* และ *PVY* โดยใช้โพลีคลอนอลแอนติซีรั่ม (Agdia Inc., Elkhart, IN, US)

การแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์และทดสอบการเกิดโรคในพืชอาศัยต่าง ๆ

คัดเลือกตัวอย่างพริกที่ให้ผลบวกต่อการตรวจเชื้อโพทิวไวรัส *ChiVMV*, *PepMoV* และ *PVY* ด้วยเทคนิค PTA-ELISA มาปลูกเชื้อไวรัสในพริกพันธุ์ CA500 (*C. annuum*) และลำโพงด้วยวิธีกล (Mechanical transmission) เพื่อเพิ่มปริมาณและเก็บรักษาเชื้อไวรัส จากนั้นนำพืชที่แสดงอาการต่างมาบดใน 0.1M Phosphate buffer, pH 7.0 อัตราส่วน 1:10 (w/v) เติมน้ำ sodium sulfite (Na_2SO_3) 2% และผงคาบอรัมดรัม 10% ปลูกเชื้อไวรัสบนพืชทดสอบ (indexing plants) ที่แสดงอาการจุดแผลเฉพาะแห่ง (local lesion host) โดยใช้ *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana glutinosa* และ *N. tabacum* (cv. White Burley, var. Samsan NN และ cv. Xanthi-nc) เป็นพืชทดสอบ นำจุดแผลเฉพาะแห่งมาปลูกเชื้อในพริกพันธุ์ CA500 และลำโพงเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสก่อนที่จะนำมาทดสอบการเกิดโรคในพืชอาศัยดังนี้ *C. annuum* (CA446, CA500, CA758, CA942, CA1131, CA1258, CA1414 และ Tawee60), *C. baccatum* (CA1316 และ CA1326), *C. chinense* (CA741, CA918 และ CA1736), *C. frutescense* (12 และ 38), *Chenopodium amaranticolor*, ลำโพง (*Datura metel* L.), *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* (cv. White Burley, var. Samsan NN และ cv. Xanthi-nc), *Lycopersicon esculentum* Mill. (Perfect Gold, CLN3125, PT4225, สีดาทิพย์ 3, สีดาทิพย์ 4 และ สีดาทิพย์ 92), *L. esculentum* var. *cerasiforme* (CHT603 และ CHT608), *Solanum*

melongena L. (Mini purple oblong Eggplant, สุพรรณ 1, Fullness 1505 และ Farmers long 704), *S. torvum* Swartz., *S. xanthocarpum* Schrad. & Wendl., *Cucumis melo* L. var. *cantaloupensis*, *C. sativus* L., *Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* และ *Euphorbia hirta* L. สังเกตอาการและตรวจสอบเชื้อไวรัส ChiVMV, PepMoV และ PVY ด้วยเทคนิค PTA-ELISA

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

นำเชื้อไวรัสโอโซเลท Ca1337 ที่ผ่านการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และเพิ่มปริมาณในพริกพันธุ์ CA500 และลำโพง มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธี Leaf-dip โดยบิดใบพืชใน 0.05M PBS buffer, pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 (w/v) ปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 rpm นาน 5 นาที นำส่วนใสเหดยดบนกริด (grid) ที่ผ่านการเคลือบด้วยสาร Formvar เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้อมสีอนุภาคไวรัสด้วย uranyl acetate เป็นเวลา 1 นาที ซับด้วยกระดาษกรอง รอให้แห้ง จากนั้นตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) (Model JEM-1230; Jeol, Tokyo, Japan)

ตรวจสอบเชื้อไวรัสในตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการใบต่างด้วยเทคนิค Western blot

โดยเตรียมตัวอย่างจากใบพืชบิดใน PBS buffer, pH 7.4 อัตราส่วน 1:10 และแยกขนาดโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีการของ Robertson *et al.* (1997) และตรวจสอบโปรตีนของเชื้อไวรัส WTMV ในพืช โดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อ ChiVMV ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Western blot ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)

การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยการเพิ่มปริมาณยีน CP

การสกัด total RNA จากใบพืชโดยดัดแปลงวิธีการสกัด RNA รวมตามวิธีการของ Monthatip *et al.* (2009)

และใช้ total RNA ที่สกัดได้เป็นต้นแบบสำหรับสังเคราะห์ cDNA โดยวิธี Reverse transcription (RT) ด้วยชุดสำเร็จรูป Revert AidTM First strand cDNA Synthesis Kit #K1622 (Fermentus, Burlington, Canada) เพิ่มปริมาณ cDNA โดยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ในตารางที่ 1 และตรวจสอบ PCR product โดยใช้ 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที ย้อมเจลด้วย EtBr และตรวจดูด้วยเครื่อง UV illuminator

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP และบริเวณ 3'UTR ของเชื้อ Ca1337 เพื่อใช้จำแนกชนิดไวรัส

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของยีน CP และ 3'UTR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ WTMV ด้วยเทคนิค RT-PCR ตรวจสอบ PCR product ได้โดยใช้ 0.8% agarose gel electrophoresis ใน 0.5X TBE buffer ที่ความต่างศักย์คงที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที สกัด PCR product เป้าหมายโดยใช้ชุดสกัด QIAquick[®] Gel Extraction Kit #28704 (QIAGEN, Hilden, Germany) เชื่อมต่อชิ้นส่วน DNA เข้าสู่พลาสมิดพาหะ pGEM[®]-T Easy vector (Promega, Madison, USA) ย้ายพลาสมิดสายผสม (recombinant plasmids) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α โดยวิธี heat shock transformation คัดเลือกโคลนของพลาสมิดสายผสมตามวิธี Blue-white colony selection และสกัด DNA plasmids โดยใช้ QIAprep[®] Spin Mini Kit (250) (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) จากนั้นนำ DNA plasmids ที่สกัดได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้ไพรเมอร์ T7 promoter และ SP6 ซึ่งเป็น sequencing primer ของ pGEM[®]-T Easy vector นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้ จำแนกบริเวณของ vector ด้วยโปรแกรม VecScreen และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส ด้วยโปรแกรม Blast ผ่านเครือข่ายอินเทอร์เน็ต The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ศึกษาลำดับกรดอะมิโน โดยใช้โปรแกรม EMBOSS Sixpack ผ่านเครือข่าย

EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/services>) จากนั้นศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส ที่แยกได้เปรียบเทียบกับเชื้อโพทิวรัส มีรายงานบนฐานข้อมูลของ NCBI และศึกษา Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining method ที่ค่า bootstrap 1,000 โดยใช้โปรแกรม DNAMAN sequencer analysis v.8.0 Demo software (Lynnon BioSoft, Que., Canada)

ผลและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่าง และตรวจสอบเชื้อไวรัสในตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการต่างด้วยเทคนิค PTA-ELISA

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบพริก (*Capsicum* spp.) ที่มีลักษณะอาการต่าง ใบด่างประ เส้นใบขยายใหญ่ และใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง จังหวัดกาญจนบุรี พ.ศ. 2555 ทั้งสิ้น 78 ตัวอย่าง ตรวจสอบด้วยเทคนิค PTA-ELISA โดยใช้แอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส CMV, TMV, ChiVMV, PepMoV และ PVY พบตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำเพาะต่อ ChiVMV 11 ตัวอย่าง, CMV 10 ตัวอย่าง และพบตัวอย่างที่เกิดปฏิกิริยาทั้ง ChiVMV และ CMV 1 ตัวอย่าง ในการตรวจสอบครั้งนี้พบตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการของโรคไวรัสจำนวน 56 ตัวอย่าง ที่ไม่เกิดปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่นำมาใช้การทดสอบ ซึ่งอาการดังกล่าวอาจจะเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ได้ตรวจสอบ

การแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์และทดสอบการเกิดโรคในพืชอาศัยต่าง ๆ

คัดเลือกเฉพาะตัวอย่างที่เกิดปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่ใช้ในการตรวจสอบทั้งหมดปลูกเชื้อพริก และลำโพง เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ พบตัวอย่างไอโซเลต Ca1337 แสดงอาการใบด่างประ และเส้นใบขยายใหญ่ คล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสทั้งบนพริกและลำโพง เมื่อแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ในพืชทดสอบ (indexing plants) ได้แก่ *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana glutinosa* และ *N. tabacum* (cv. White burley, var. Samsan NN และ cv. Xanthi-nc) พบอาการใบด่างประและเส้นใบหย่นในยาสูบ *N. tabacum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ แต่ยาสูบ *N. glutinosa* พบอาการจุดแผลเฉพาะแห่ง (Chlorotic lesion) ที่ 14 วัน หลังการปลูกเชื้อ จึงนำเชื้อไวรัสที่ได้เพิ่มปริมาณในพริกและลำโพง จากนั้นนำไปทดสอบการเกิดโรคในพืชอาศัยต่าง ๆ พบอาการใบด่างประบริเวณเส้นใบ เส้นใบขยายใหญ่ และเส้นใบหย่น ต่อมาใบพริกจะหด บิดเบี้ยวเสียรูปในพริก *C. baccatum* (CA1316 และ CA1326), *C. chinense* (CA741, CA918 และ CA1736) และมีอาการใบด่างประ เส้นใบขยายใหญ่และบิดเบี้ยวเสียรูปรุนแรงในพริก *C. frutescens* (12 และ 38) ในขณะที่พริก *C. annum* ระดับความรุนแรงของอาการขึ้นอยู่กับสายพันธุ์พริก ได้แก่ พันธุ์ CA446, CA1131 และ CA1258 ไม่พบอาการผิดปกติในพันธุ์ CA758 และ Tawee 60 พบอาการใบด่างประเล็กน้อย และพบอาการใบด่างประและเส้นใบขยายใหญ่รุนแรงในพันธุ์ CA500, CA942 และ CA1414 พืชชนิดอื่นที่แสดงอาการใบด่างประ แต่ในยาสูบ *N. glutinosa* พบอาการจุดแผลเฉพาะแห่ง (ภาพที่ 1)

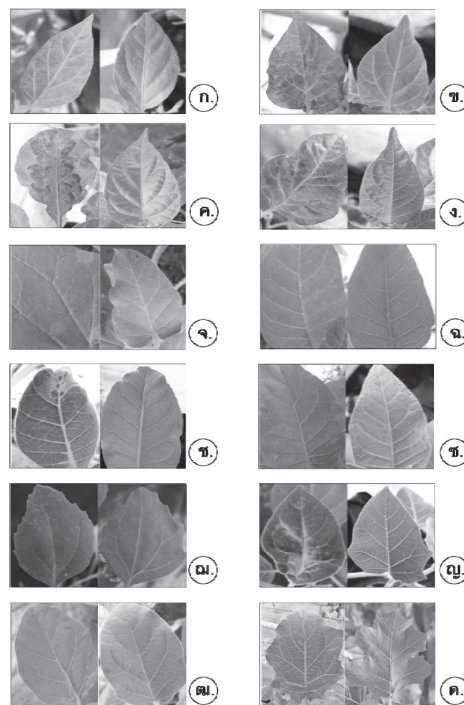
ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ชนิดไวรัส	ไพรเมอร์	ลำดับเบสของไพรเมอร์ 5'-3'	Tm (°C)	ขนาด ยีน (bp)	แหล่งที่มาของไพรเมอร์
Poty CP1F	Poty CP1F	ATGGTNTGGTGCATNGANAATGG	53	650-800	จากงานวิจัยนี้
	Oligo(d)T1R	CTTCCGGG(T) ₁₈ VGC			
WTMV-CP	WTMV-CP	GGAATGGGATCGTGCTGA	55	~1400	จากงานวิจัยนี้
	Oligo(d)T1R	CTTCCGGG(T) ₁₈ VGC			
CVMV1037Poi	CVMV1037Poi	AGCATGGAGAGAGCGACATTAGTC	50	~1200	Tsai <i>et al.</i> , 2008
	Oligo(d)T	GCGGGATCC(T) ₁₈			

ขณะที่ไม่พบอาการในพืชดังต่อไปนี้ *S. torvum* Swartz., *S. melongena* L., *S. xanthocarpum* Schrad.& Wendl., *L. esculentum* Mill., *L. esculentum* var. *cerasiforme*, *C. amaranticolor*, *C. melo* L.var. *cantaloupensis*, *C. sativus* L., *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* และ *E. hirta* L.) ซึ่งผลการทดสอบสอดคล้องกับผลการตรวจสอบด้วยแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส ChiVMV, PepMoV, PVY, CMV และ TMV ด้วยเทคนิค PTA-ELISA พบตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคให้ผลบวกกับแอนติซีรัมที่จำเพาะกับ ChiVMV และ PVY (ตารางที่ 2)

โดยลักษณะอาการใบด่างประที่ปรากฏในยาสูบ *N. tabacum* และอาการจุดแผลเฉพาะแห่งในยาสูบ *N. glutinosa* จากการปลูกเชื้อไวรัสไอโซเลท Ca1337

แตกต่างกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส ChiVMV ซึ่งจะแสดงอาการจุดแผลเฉพาะแห่งในยาสูบ *N. tabacum* และแสดงอาการใบด่างประในยาสูบ *N. glutinosa* (Hussain *et al.*, 2008) และลักษณะอาการที่แสดงในใบพริกพันธุ์ CA500 และลำโพง แตกต่างกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส ChiVMV ซึ่งจะแสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้มระหว่างเส้นใบในพริกพันธุ์ CA500 และใบด่างระหว่างเส้นใบ ใบลีบเล็กเสียรูปในลำโพง (Patarapuwadol *et al.*, 2011) จากการที่เชื้อไวรัสไอโซเลท Ca1337 ให้ผลบวกกับแอนติซีรัมที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ ChiVMV และ PVY จึงนำมาศึกษาจำแนกชนิดโดยวิธีการอื่นๆ ต่อไป



ภาพที่ 1 อาการพืชหลังปลูกเชื้อไวรัสไอโซเลท Ca1337 ที่ 30 วัน เปรียบเทียบกับพืชปกติ; (ก) *C. annuum* (CA1414), (ข) *C. baccatum* (CA1326), (ค) *C. chinense* (CA918), (ง) *C. frutescens* (12), (จ) *N. glutinosa*, (ฉ) *N. tabacum* var. Samsan NN, (ช) *N. tabacum* cv. White burley, (ฌ) *N. tabacum* cv. Xanthi-nc, (ฉ) *Chenopodium amaranticolor* และ (ญ) *D. metel* L. (ฉ) *S. melongena* L (Fullness 1505) และ (ด) *S. torvum* Swartz. (ภาพด้านซ้าย = พืชปลูกเชื้อ, ภาพด้านขวา = พืชปกติ)

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบเชื้อไวรัสโอไซเลท Ca1337 ในการก่อโรคในพืชทดสอบ การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA, Western Blot และ RT-PCR

ชื่อ วิทยาศาสตร์	พันธุ์	ลักษณะอาการ	% Infection ^{1/}	PTA-ELISA (60 min, absorbent 405 nm) ^{2/}				Western		RT-PCR ^{4/}	
				ChiVMV	PepMoV	PVY	CMV	TMV	blot ^{3/}	WTMV-	CVMV1037Pol
<i>Capsicum</i>	CA446	ไม่พบอาการ	0	0.237 (-	0.103 (-)	0.122	0.110	0.112	- ^{5/}	-	-
	CA500	เส้นใบขยายใหญ่ ใบต่าง	100	1.405	0.138 (-)	0.747	0.083	0.094	+ ^{6/}	+	-
	CA758	ใบต่างประเล็กน้อย เส้น	75	0.851	0.100 (-)	0.561	0.081	0.091	+	n	n
	CA942	ใบเหลือง เขียวบริเวณ	0	1.572	0.137 (-)	0.762	0.083	0.099	n ^{7/}	n	n
	CA1131	ไม่พบอาการ	0	0.231 (-	0.093 (-)	0.120	0.097	0.103	-	-	-
<i>Capsicum</i>	CA1258	ไม่พบอาการ	0	0.183 (-	0.080 (-)	0.080	0.079	0.081	-	n	n
	CA1414	ใบต่างประเล็กน้อย	100	1.927	0.173 (-)	0.785	0.088	0.091	+	+	-
	Tawee60	ใบต่างประเล็กน้อย	40	0.787	0.093 (-)	0.473	0.082	0.103	+	n	n
	CA1316	ใบต่างประบริเวณเส้นใบ	100	1.872	0.257 (-)	0.863	0.092	0.103	+	n	n
	CA1326	ใบทรงก้น ต่างประ	100	1.596	0.145 (-)	0.816	0.088	0.109	+	+	-
<i>Capsicum</i>	CA741	ใบต่างประ เส้นใบขยาย	100	1.723	0.177 (-)	0.719	0.098	0.099	+	n	n
	CA918	เส้นใบเปลี่ยนสี ใบหด	100	1.833	0.245 (-)	0.776	0.104	0.114	+	+	-
	CA1736	ใบต่างประ เส้นใบขยาย	80	1.862	0.187 (-)	0.791	0.097	0.098	+	+	-
<i>Capsicum</i>	12	เส้นใบขยายใหญ่ ใบหด	100	1.600	0.139 (-)	0.747	0.104	0.108	+	+	-
	38	เส้นใบขยายใหญ่ ใบต่าง	100	1.924	0.299 (-)	0.867	0.118	0.122	+	+	-
<i>Chenopodium</i>		ไม่พบอาการ	0	0.105 (-	0.087 (-)	0.072	0.084	0.096	n	n	n
<i>Datura metel</i>	ลำโพง	เส้นใบขยายใหญ่ ใบต่าง	100	0.689	0.133 (-)	0.320	0.083	0.087	+	+	-
<i>Nicotiana</i>		จุดแผลเฉพาะแห้งสี	0	0.234 (-	0.093 (-)	0.114	0.095	0.096	-	n	n
<i>Nicotiana</i>	cv.	ต่างประบริเวณเส้นใบ	100	0.921	0.108 (-)	0.426	0.087	0.093	+	+	-
	var.	ต่างประบริเวณเส้นใบ	80	1.804	0.150 (-)	0.637	0.089	0.098	+	+	-
	cv. Xanthi-	ต่างประบริเวณเส้นใบ	20	0.416	0.101 (-)	0.235	0.098	0.091	+	+	-
<i>Solanum</i>	มะเขือพวง	ไม่พบอาการ	0	0.220 (-	0.138 (-)	0.075	0.089	0.096	n	n	n
<i>Blank</i>				0.096 (-	0.112 (-)	0.063	0.079	0.075	n	n	n
<i>Positive control</i>				1.329	0.918	1.424	1.471	1.408	n	n	n

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบเชื้อไวรัสเอชไอโกล Ca1337 ในการก่อโรคในพืชทดสอบ การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA, Western Blot และ RT-PCR (ต่อ)											
ชื่อ วิทยาศาสตร์	พันธุ์	ลักษณะอาการ	% Infection ^{1/}	PTA-ELISA (60 min, absorbent 405 nm) ^{2/}				Western blot ^{3/}		RT-PCR ^{4/}	
				ChiVMV	PepMoV	PVY	CMV	TMV		WTMV- CVMV1037Pol	
WTMV-Ca1337 (<i>Datura</i>)		เส้นใบขยายใหญ่ ใบต่าง		0.723	0.110 (-)	0.372	0.082	0.096	+	+	-
ChiVMV-KPS9 (<i>Datura</i>)		ต่างประบริเวณเส้นใบ		0.652	0.124 (-)	0.130	0.094	0.103	+	-	+
Healthy-Pepper				0.208 (-	0.099 (-)	0.108	0.104	0.106	-	-	-
Healthy-Tomato				0.245 (-	0.110 (-)	0.095	0.080	0.082	-	n	n
Healthy-Nicotiana				0.444 (-	0.090 (-)	0.102	0.084	0.095	-	n	n
Healthy-Datura metel				0.174 (-	0.106 (-)	0.071	0.080	0.092	-	n	n

^{1/} : คำนวณจากจำนวนต้นพืชที่แสดงอาการผิดปกติหลังการปลูกเชื้อด้วยไวรัสเอชไอโกล Ca1337

^{2/} : ค่าเฉลี่ยในการทดสอบที่ 4 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อไวรัส โดยใช้โพลีคลอนอลที่จำเพาะกับชนิดของไวรัสในการทดสอบ

^{3/} : ตรวจด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะกับไวรัส ChiVMV

^{4/} : ผลการตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ WTMV-CP และ CVMV1037Pol (Tsai et al., 2008)

^{5/} : ตรวจไม่พบ หรือ ให้ผลปฏิกิริยาเป็นลบ

^{6/} : ๘ ๑ ๖ ๑๔๔ ๘๑

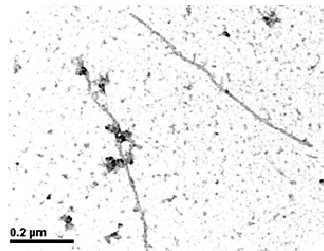
ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

จากการตรวจสอบอนุภาคไวรัสจากใบพริกที่แสดงอาการของโรคภายใต้กล้อง TEM (ภาพที่ 2) พบอนุภาคไวรัสรูปท่อนยาวคด ขนาดประมาณ 730 nm ซึ่งตรงกับลักษณะของเชื้อโพที่ไวรัสที่มีขนาดอนุภาคไวรัสแบบท่อนยาวคด ยาวประมาณ 680-900 nm (Adams *et al.*, 2011)

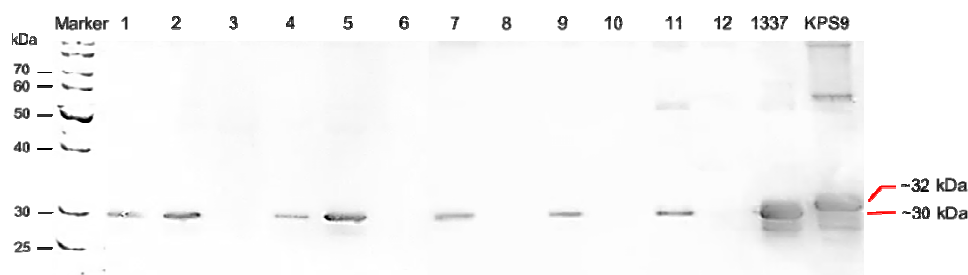
ตรวจสอบเชื้อไวรัสในตัวอย่างใบพริกที่แสดงอาการใบด่างประด้วยเทคนิค Western blot

จากการศึกษา ขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสของเชื้อไวรัสไอโซเลท Ca1337 เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัส ChiVMV-KPS9 ด้วยเทคนิค Western blot ดังภาพที่ 3 พบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสไอโซเลท Ca1337 แตกต่างกับเชื้อไวรัส ChiVMV-KPS9 โดยมีขนาดโปรตีน

ห่อหุ้มอนุภาคประมาณ 30 kDa และ 32 kDa ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าขนาดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อไวรัสไอโซเลท Ca1337 มีขนาดเล็กกว่าเชื้อไวรัส ChiVMV-KPS9 ซึ่งมีขนาดตรงกับรายงานของ Wang *et al.* (2006) พบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส ChiVMV ที่สมบูรณ์ (full-length) ขนาด 32.8 kDa และจากรายงานของ Adams *et al.* (2011) เชื้อโพที่ไวรัสจะมีขนาดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค 30-47 kDa ดังนั้นผลการศึกษานี้ร่วมกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสที่มีขนาด 810 bp จะมีขนาดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคประมาณ 30 kDa ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลใน NCBI ที่รายงานว่า WTMV-Laichau มีโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสขนาด 30.525 kDa จึงสามารถระบุได้ว่าเชื้อไวรัสไอโซเลท Ca1337 เป็นเชื้อไวรัสในจีนัสโพที่ไวรัสชนิดหนึ่ง

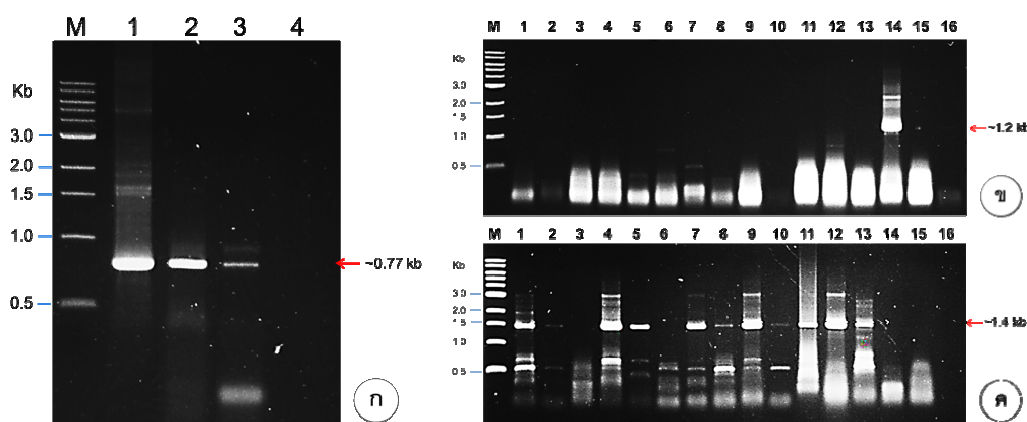


ภาพที่ 2 ลักษณะอนุภาคไวรัสไอโซเลท Ca1337 ภายใต้กล้อง TEM ที่กำลังขยาย 80,000 เท่า



ภาพที่ 3 ตรวจสอบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสด้วยเทคนิค Western blot โดยตรวจด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ

ChiVMV (ช่อง Marker: PageRuler™ Unstained Protein Ladder #SM0661 (Fermentas, Maryland, USA), ช่อง 1-5 เป็นพริกพันธุ์ต่างๆที่มีปลูกเชื้อ Ca1137 ดังนี้ 12, 38, CA446, CA500, CA741, ช่อง 6 พริกปกติ, โดยช่อง 7-8: *N. tabacum* var. Samsan NN, ช่อง 9-10: *N. tabacum* cv. Xanthi-nc และช่อง 11-12: *N. tabacum* cv. White burley ปลูกเชื้อและไม่ปลูกเชื้อไวรัสตามลำดับ), 1337: เชื้อไวรัสไอโซเลท Ca1337 และ KPS9: ChiVMV-KPS9 ในพริก



ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบพืชที่ปลูกเชื้อไวรัสโอโซเลท Ca1337 ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยไพรเมอร์ต่างๆ ที่จำเพาะต่อ ยีน CP ดังนี้ (ก) ไพรเมอร์ Poty CP1F ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อโพทิวไวรัส โดยช่อง M: 1Kb DNA marker Biolabs 100 ng, 1: Ca1337 (plasmids), 2: Ca1337 (cDNA), 3: ChiVMV-KPS9 และ 4: ปฏิกริยาควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ (no template), (ข) ไพรเมอร์ CVMV1037pol ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ ChiVMV และ (ค) ไพรเมอร์ WTMV-CP ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ WTMV โดยทดสอบกับเชื้อไวรัสโอโซเลท Ca1337 ที่ปลูกเชื้อในพืชชนิดต่างๆ ดังนี้ M: 1Kb DNA marker Biolabs 200 ng, และช่อง 1-16 เรียงตามลำดับดังนี้: 12, 38, CA446, CA500, CA918, CA1131, CA1326, CA1414, CA1736, *D. metel* L., *N. tabacum* var. Samsan NN, *N. tabacum* cv. White burley, ไวรัสโอโซเลท Ca1337 ที่เพิ่มปริมาณเชื้อในลำโพง, เชื้อไวรัสเปรียบเทียบกับ ChiVMV-KPS9, พริกพันธุ์ CA500 ปกติ และปฏิกริยาควบคุมที่ไม่มีดีเอ็นเอต้นแบบ

การตรวจเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR ด้วยการเพิ่ม ปริมาณยีน CP

จากการตรวจสอบเชื้อไวรัสโอโซเลท Ca1337 ที่ แสดงอาการใบต่างประบนพริกด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ Poty CP1F ซึ่งออกแบบให้จำเพาะกับบริเวณ core CP gene (*MV/IWCIENG* regions) ของเชื้อไวรัสใน จีโนม *Potyvirus* โดยตำแหน่ง *MV/IWCIENG* motif ที่เป็น บริเวณที่มีความอนุรักษ์พันธุกรรมสูง (Conserved regions) ของจีโนมโพทิวไวรัส (Langeveld *et al.*, 1991) พบว่าไพรเมอร์ Poty CP1F สามารถสังเคราะห์เพิ่ม ปริมาณยีนที่มีขนาดประมาณ 770 bp (ภาพที่ 4ก) และ นำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเป็นยีนบริเวณ core CP ถึง 3'UTR จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน NCBI พบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอ ไทด์กับเชื้อไวรัส WTMV isolate Laichau (DQ851495) ที่ 93% จึงออกแบบไพรเมอร์ WTMV-CP ที่จำเพาะกับ บริเวณปลาย *Nlb* gene จนถึงบริเวณ 3' UTR ของเชื้อ ไวรัส WTMV เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค RT-

PCR และเปรียบเทียบกับไพรเมอร์ CVMV1037Pol ซึ่ง จำเพาะกับเชื้อไวรัส ChiVMV (Tsai *et al.*, 2008) และมี รายงานการพบแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส ChiVMV ใน ประเทศไทย (Kittipakorn *et al.*, 1993; Siriwong *et al.*, 1995; Tsai *et al.*, 2008) และจากรายงานพบว่าเป็นเชื้อที่ โกลัซติดกับเชื้อ WTMV (Ha *et al.*, 2008a) โดยไพรเมอร์ WTMV-CP สามารถสังเคราะห์ได้ขนาดประมาณ 1.4 kb จากพริกที่แสดงอาการหลังจากปลูกเชื้อโอโซเลท Ca1337 เท่านั้น และไพรเมอร์ดังกล่าวไม่สามารถเพิ่มปริมาณ CP gene ของพริกที่ปลูกเชื้อ ChiVMV-KPS9 ได้ ในขณะที่ ไพรเมอร์ CVMV1037 Pol สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอของ เชื้อ ChiVMV-KPS9 ได้ขนาดประมาณ 1.2 kb แต่ไม่ สามารถเข้าจับและเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสโอโซเลท Ca1337 ที่ใช้ในการทดสอบได้ (ภาพที่ 4: ข-ค ช่องที่ 13 และ 14)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP และ บริเวณ 3'UTR ของเชื้อ Ca1337 เพื่อใช้จำแนกชนิด ไวรัส

จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ ของเชื้อโพทิไวรัสไอโซเลท Ca1337 โดยใช้ไพรเมอร์ WTMV-CP สามารถสังเคราะห์ยีนบริเวณปลาย *N/b* จนถึง 3'UTR ได้ ขนาด 1,430 bp เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ เชื้อไวรัสในฐานข้อมูล NCBI พบว่าเหมือนกับเชื้อโพทิไวรัส WTMV-Laichau (DQ851495; NC_009744) ที่ 86.7% และจากการเปรียบเทียบเฉพาะบริเวณ *CP* gene และ 3'UTR มีความเหมือนกันที่ 86.6% และ 93.4% ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน ห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (Coat protein) มีความเหมือนกันที่ 93.2% (ตารางที่ 3) ซึ่งการจำแนกในระดับสปีชีส์ของเชื้อโพทิไวรัสโดยใช้ *CP* gene จะต้องมีความเหมือนกันของ ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนอย่างน้อย 76% และ 79.6% ตามลำดับ และ 3'UTR อย่างน้อยที่ 76% (Adams *et al.*, 2005) ดังนั้นเชื้อโพทิไวรัส ไอโซเลท Ca1337 สามารถจำแนกได้เป็นไวรัสในสปีชีส์ WTMV

จากการเปรียบเทียบกับเชื้อโพทิไวรัสที่ใกล้เคียง กันได้แก่ ChiVMV และ PVMV พบความเหมือนกันของ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ *CP* gene เท่ากับ 69.9-73.9% และ 74.0-74.2% และความเหมือนกันของลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 82.1-84.2% และ 83.7-84.2% ตามลำดับ (ตารางที่ 3) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ *CP* gene และ 3'UTR มีความต่างกันมากกว่าจะจำแนกให้เป็นสปีชีส์ ChiVMV และ PVMV ซึ่งสอดคล้องกับกับรายงานของ Ha *et al.* (2008a) ที่พบว่า WTMV มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ เชื้อไวรัส ChiVMV และ PVMV และจากการศึกษา Phylogenetic tree โดยใช้บริเวณ *CP* gene ถึง 3'UTR ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเปรียบเทียบกับ เชื้อโพทิไวรัสชนิดต่างๆ (ภาพที่ 5) พบว่าเชื้อไวรัสไอโซเลท Ca1337 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ WTMV และแยกกลุ่ม ออกจากเชื้อ ChiVMV และ PVMV เช่นเดียวกับรายงาน ของ Ha *et al.* (2008a)

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์ความเหมือนของ *CP* gene ถึง 3'UTR ของเชื้อไวรัส ChiVMV, PVMV, WTMV และเชื้อไวรัส ไอโซเลท Ca1337

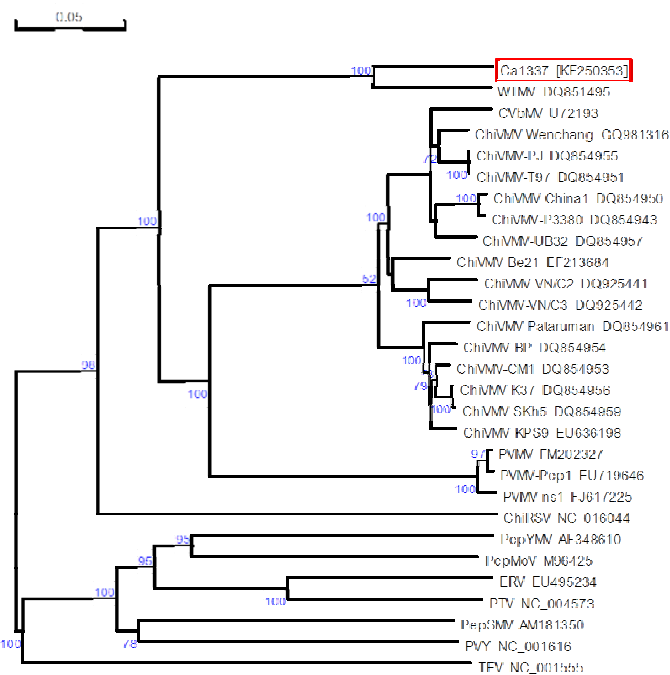
ไวรัสไอโซเลทเปรียบเทียบ		CP gene- 3'UTR (%nt)	CP gene		3'UTR (%nt)
กับไวรัส			(%nt)	(%aa)	
Ca1337	WTMV ^{1/}	89.2	86.6	93.2	93.4
	ChiVMV ^{2/}	69.4-71.7	69.9-73.9	82.1-84.2	55.7-59.4
	PVMV ^{3/}	69.4-69.6	74.0-74.2	83.7-84.2	47.2
	Potyruses ^{4/}	54.6-61.6	59.0-66.6	58.4-73.7	27.4-38.7

1/ = WTMV-Laichau (DQ851495; NC_009744)

2/ = ChiVMV 35 ไอโซเลท (ข้อมูลจาก NCBI)

3/ = PVMV 3 ไอโซเลท (stian P, Pep1 and ns1)

4/ = Potyruses; ChiRSV, ERV, PVY, PepMoV, PepSMV, PTV, PepYMV และ TEV (รายละเอียดในภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 Phylogenetic tree ที่สร้างจากผลการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ CP gene ถึง 3'UTR ของเชื้อไวรัส Ca1337 กับเชื้อไวรัสชนิดต่างๆที่เข้าทำลายพริก

สรุป

เชื้อ WTMV เป็นเชื้อไวรัส พบรายงานครั้งแรกในมะเขือพวง ที่ประเทศเวียดนาม จากการสำรวจโรคไวรัสพริกในจังหวัดกาญจนบุรี พบเชื้อไวรัสไอโซเลต Ca1337 ที่มีลักษณะอนุภาคไวรัสแบบท่อนยาวคด ยาวประมาณ 730 nm โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสขนาดประมาณ 30 kDa เมื่อทดสอบการก่อโรคในพริก *C. baccatum*, *C. chinense* และ *C. frutescens* พบอาการใบต่างประ เส้นใบขยายใหญ่ และใบบิดเบี้ยวเสียรูปในลำโพงและยาสูบพันธุ์ *N. tabacum* (cv. Whiteberley, var. Samsan NN และ cv. Xanthi-nc) นอกจากนี้ยังพบอาการจุดแผลเฉพาะแห่งในยาสูบพันธุ์ *N. glutinosa* แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับแอนติซีรัมที่จำเพาะกับเชื้อไวรัส ChiVMV และ PVY ที่ใช้ในการทดสอบ ผลจากวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณปลาย *Nlb* gene - 3'UTR ขนาด 1,430 bp มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อไวรัส WTMV-Laichau ที่ 86.7% และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ทั้ง CP gene และเฉพาะ 3'UTR มี

ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์กับเชื้อ ไวรัส WTMV-Laichau ที่ 86.6% และ 93.4% ตามลำดับ จากผลการตรวจวิเคราะห์สามารถสรุปได้ว่า เชื้อไวรัสไอโซเลต Ca1337 ที่แยกเชื้อได้จากพริกคือเชื้อ *Wild tomato mosaic virus* โดยตั้งชื่อไวรัสไอโซเลต Ca1337 ใหม่เป็น WTMV-KAN และส่งบันทึกข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อนี้ในฐานข้อมูล GenBank โดยมีหมายเลขข้อมูลคือ KF250353

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน (Tropical Vegetable Research Center) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์พริกและมะเขือเทศเพื่อใช้ในการทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

- Adams, M.J., J.F. Antoniwi and C.M. Fauquet. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. Arch. Virol. 150: 459–79.
- Adams, M.J., F.M. Zerbini, R. French, F. Rabenstein, D.C. Stenger and J.P.T. Valkonen. 2011. Family *Potyviridae*, pp 1069–1089. In A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens, E.J. Lefkowitz, eds. Virus taxonomy: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier, New York.
- Chiemsobat, P., N. Sea-ung, S. Attahom. S. Patarapuwadol and P. Siriwong. 1998. Molecular Taxonomy of a new potyvirus isolated from chili pepper in Thailand. Arch. Virol. 143: 1855-1863
- Clark, M.F and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- Frenkel, M.J., C.W. Ward and D.D. Shukla. 1989. The use of 3' non-coding nucleotide-sequences in the taxonomy of potyviruses – application to *Watermelon mosaic virus-2* and *Soybean mosaic virus-N*. J. Gen. Virol. 70: 2775–2783.
- Green, S.K. and J.S.Kim. 1991. Characteristics and control of viruses infecting peppers: a literature review. Asian Vegetable Research and Development Center. Technical Bulletin. Shanhua, Taiwan.
- Ha, C., P. Revill, R.M. Harding, M. Vu and J.L. Dale. 2008a. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. Arch. Virol. 153: 25-36.
- _____. 2008b. Identification and sequence analysis of potyviruses infecting crops in Vietnam. Arch. Virol. 153: 45-60.
- Hussain, S., T. Yasmin, M. Fahim, S. Hameed and M.I. Haque. 2008. Transmission and host range studies of Pakistani isolate of *Chili veinal mottle virus*. J. Pak. Bot. 40: 2669-2681.
- ICTV. 2011. Committee on Taxonomy of Viruses. Available Source: <http://www.ictvonline.org/>, May 15, 2011.
- Janzac, B., M.F. Fabre, A. Palloix and B. Moury. 2008. Characterization of a new *Potyvirus* infecting pepper crops in Ecuador. Arch. Virol. 153: 1543-1548.
- Kittipakorn, K., N. Chiyoichi, N. Deema and S. Kladpan. 1993. Studies on pepper viruses and screening for resistance to certain pepper viruses, 331-340 p. in Proceedings of the 31th Kasetsart University Annual Conference: Plants. Kasetsart University, Bangkok. (in Thai)
- Langeveld, S. A., J. M. Dore, J. Memelink, A. F. Derks, C. I. van der Vlugt. 1991. Identification of *Potyriviruses* using the polymerase chain reaction with degenerate primers. J. Gen. Virol. 72: 1531–1541.
- Monthatip, T., A. Bhunchoth, N. Warin, O. Chatchawankanphanich and P. Burns. 2009. Cloning and expression of Ethylene response sensor 1 (Den-ERS1) gene of *Dendrobium* 'Pompadour' flower during development and senescence. Agricultural Sci. J. 42: 227-236. (in Thai)

- Patarapuwadol, S., W. Sompratoom, K. Sitatane and S. Wasee. 2011. Effect of inheritance of resistance to *Chili veinal mottle virus* isolate KPS9 (ChiVMV-KPS9) in pepper (*Capsicum annuum*). Thai Phytopathol. 25(1-2): 45-55. (in Thai)
- Robertson, D., G.P. Mitchell, J.S. Gilroy, C. Gerrish, G.P. Bolwell and A.R. Slabas. 1997. Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from plants. J. Biol. Chem. 272: 15841–15848.
- Sambrook J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.
- Siriwong, P., K. Kittipakorn and M. Ikegami. 1995. Characterization of *Chili vein-banding mottle virus* isolated from pepper in Thailand. Plant Pathol. 44: 718-727.
- Spetz, C., A.M. Taboada, S. Darwich, J. Ramsell, L.F. Salazar and J.P.T. Valkonen. 2003. Molecular resolution of a complex of potyviruses infecting solanaceous crops at the center of origin in Peru. J. Gen. Virol. 84: 2565–2578.
- Tsai, W.S., Y.C. Huang, D.Y. Zhang, K. Reddy, S.H. Hidayat, W. Srithongchai, S.K. Green and F.J. Jan. 2008. Molecular characterization of the CP gene and 3'UTR of *Chilli veinal mottle virus* from South and Southeast Asia. Plant Pathol. 57: 408-416.
- Wang, J., Z. Liu, S. Niu, M. Peng, D. Wang, Z. Weng and Z. Xiong. 2006. Natural occurrence of *Chili veinal mottle virus* on *Capsicum chinense* in China. Plant Dis. 90: 377-377.