ชุดโครงการวิจัย วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช

โครงการวิจัย อนุกรมวิธาน ชีววิทยาและเทคนิคการตรวจวินิจฉัยศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการวินิจฉัยและตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมที่ 1 การพัฒนาเทคโนโลยีการตรวจสอบศัตรูพืชโดยเซรุ่มวิทยา

ชื่อการทดลองที่ 5.2.4 อนุกรมวิธานไวรัสกลุ่ม *Tospovirus* สาเหตุโรคพืชที่สำคัญในประเทศไทย

Taxonomy of *Tospovirus* group in important plant diseases in Thailand

คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง เยาวภา ตันติวานิช [1/]

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช[1/]

บทคัดย่อ

เชื้อทอสโพไวรัส (tospovirus) เป็นไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สำคัญกลุ่มหนึ่งซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตพืชหลายชนิด และจัดเป็นศัตรูพืชกักกัน เชื้อไวรัสกลุ่มนี้มีพืชอาศัยกว้าง และส่วนใหญ่เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น มะเขือเทศ พริก แตงต่างๆ ถั่วลิสง ไม้ดอกไม้ประดับ เชื้อไวรัสถ่ายทอดไปสู่พืชโดยอาศัยเพลี้ยไฟเป็นพาหะ และอาจแพร่ระบาดโดยปนเปื้อนไปกับเมล็ดพันธุ์หรือส่วนขยายพันธุ์ จึงต้องมีการสำรวจและตรวจสอบชนิดของทอสโพไวรัสที่พบในประเทศไทย เพื่อนำมาพัฒนาวิธีการตรวจสอบวินิจฉัยโรค งานวิจัยนี้ได้มีสำรวจและตรวจสอบเชื้อทอสโพไวรัสจากพืชชนิดต่างๆ ที่เก็บจากแปลงปลูก โดยได้เก็บตัวอย่าง พริก มะเขือเทศ มันฝรั่ง จากพื้นที่ปลูกในจังหวัดกาญจนบุรี อุบลราชธานี ศรีสะเกษ เชียงใหม่ กาฬสินธุ์ บุรีรัมย์ สระแก้ว และตาก นำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) โดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อทอสโพไวรัสซีโรกรุ๊ป IV เมื่อเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิค (N gene) ของทอสโพไวรัสที่พบในตัวอย่างพริก มะเขือเทศ และมันฝรั่ง ด้วยเทคนิค RT-PCR พบเชื้อทอสโพไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ในตัวอย่างพริกและมันฝรั่ง และเชื้อทอสโพไวรัส Thailand tomato tospovirus or *tomato necrosis virus* (TNSV) ในตัวอย่างมะเขือเทศ

คำสำคัญ: ทอสโพไวรัส การตรวจสอบ *Capsicum chlorosis virus Tomato necrosis virus*

Abstract

Tospoviruses are a viral disease that causes significant of highly damaging to yield plants. and a quarantine pest Tospovirus has a wide host. The majority of the plants are of economic importance such as tomato, pepper, cucumber peanut and ornamental plants. Tospoviruses are transmitted by several species of thrips, the most important of which is *Frankliniella occidentalis* (Thripidae, Thysanoptera), and may be spread by contaminated seeds or propagation. We need to explore and examine the types of Tospovirus in Thailand. To develop methods to determine the diagnosis. This research was a survey and detection tospovirus from peppers, tomatoes, potatoes from growing areas in Kanchanaburi Sisaket Chiangmai Kalasin

Buriram Sakeaw and Tak was determined by using serological techniques,direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).We found *Capsicum chlorosis virus* (CaCV). in peppers and tomatoes and *tomato necrosis virus* (TNSV) in tomato samples.

Keywords: Tospovirus detection *Capsicum chlorosis virus Tomato necrosis virus*

คำนำ

ทอสโพไวรัสจัดอยู่ใน Family Bunyaviridae และ Genus *Tospovirus* อนุภาคของทอสโพไวรัสมีลักษณะทรงกลม (spherical) ขนาด 80-120 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิคเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยว 3 ชิ้น คือ ขนาดใหญ่ (L-RNA) ขนาดกลาง (M-RNA) และขนาดเล็ก (S-RNA) แต่ละชิ้นห่อหุ้มด้วยโปรตีน (coat protein) และมีเยื่อหุ้มอนุภาค (envelope) ซึ่งประกอบด้วยไขมันและไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ทอสโพไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุโรคที่สำคัญของพืชผักเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก มีการจำแนกชนิดไว้แล้วมากกว่า 19 ชนิด (Hassani-Mehraban *et al*., 2010) ทอสโพไวรัสที่ได้รับการรับรองชื่อชนิด (species) จากสถาบัน The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) มี 8 ชนิด ได้แก่ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Brittlebank, 1919), *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV), *Groundnut ringspot virus* (GRSV) (De Avila *et al*., 1993), *Impatiens necrotic spot virus*(INSV) (Law *et al*., 1991), *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) (Reddy *et al*., 1992), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) (Yeh and Chang, 1995), *Peanut yellow spot virus* (PYSV) (Satyanarayana *et al*., 1998) และ *Zucchini lethal chlorosis virus* (ZLCV) (Bezerra *et al*., 1999) (Elliot *et al*., 2000; Nichol *et al*., 2005; Lin *et al*., 2005) อาการของพืชที่เกิดจากเชื้อทอสโพไวรัสที่พบในธรรมชาติเป็นแบบแพร่กระจายทั่วทั้งต้น (systemic infection) พบบนใบ ลำต้นและผล เช่นในพริก มะเขือเทศ แตงโม แคนตาลูป เมลอน แตงกวา ถั่วลิสง ลำโพง โทงเทง และยาสูบ เป็นต้น อาการที่พบได้แก่ เนื้อเยื่อตาย (necrosis) พบบนใบ ลำต้น และผล ใบเหลือง (chlorosis) ด่างวงแหวน (ring pattern) จุด (spot) ด่างประ (mottle) ใบม่วง ใบสีเงิน (silver mottle) ต้นเตี้ยแคระแกร็น (stunt) (German *et al.,* 1992; Mumford *et al*., 1996; Chiemsombat *et al*., 2008) ส่วนอาการจุดแผลเฉพาะแห่ง (local lesion) พบในถั่วพุ่ม คีโนโปเดียม และพิทูเนีย เกิดจากการปลูกเชื้อโดยตรงโดยการทาน้ำคั้น (Chiemsombat *et al*., 2008; Mandal *et al*., 2006; Mandal *et al*., 2001) ใช้เครื่องพ่นอะตอมไมเซอร์จากแรงดันอากาศ (Mandal *et al*., 2007) หรือการใช้เพลี้ยไฟพาหะในห้องปฏิบัติการ (Premachandra *et al*., 2005)

ทอสโพไวรัสมีความหลากหลายมากทั้งในด้านพืชอาศัย แมลงพาหะ และสามารถจัดแบ่งได้อย่างน้อย 6 ซีโรกรุ๊ป (Serogroup) (Cortes *et al*., 1998) ตามลักษณะการทำปฏิกิริยาทางซีรัมวิทยาของเชื้อแต่ละชนิด ทอสโพไวรัสมีเพลี้ยไฟเป็นพาหะถ่ายทอดโรคโดยมีความสัมพันธ์เป็นแบบคงทน (persistent) (German *et al*., 1992) นอกจากนี้เชื้อไวรัสยังสามารถปนเปื้อนมากับเมล็ดและส่วนขยายพันธุ์ (Ie, 1970)

สำหรับในประเทศไทยได้มีการตรวจพบทอสโพไวรัสตั้งแต่ปี 2516 ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้แอนติซีรัมต่อซีโรกรุ๊ปของทอสโพไวรัส แต่ยังไม่ได้จำแนกไวรัสสาเหตุโรคในระดับ Species ต่อมาในปี 2528 ได้มีการตรวจในถั่วลิสงโดยใช้แอนติซิรัมต่อเชื้อ Groundnut bud necrosis virus : GBNV เป็นตัวตรวจ (โสภณ, 2536) และได้ตรวจพบการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดมะเขือเทศลูกผสมเบอร์ 578 ในอัตรา 1.3-2.5% และเบอร์ 674 ในอัตรา 2.5% (โสภณและจุฑารัตน์, 2537) Pongsapich และ Chiemsombat (2002) ได้ตรวจจำแนกทอสโพไวรัสที่เข้าทำลายมะเขือเทศพบว่าเป็นทอสโพไวรัสซีโรกรุ๊ป 4 (Serogroup IV) แต่ยังไม่ได้ระบุชนิด (Species) ของเชื้อและยังไม่ทราบชนิดของเพลี้ยไฟที่เป็นพาหะถ่ายทอดโรค หรือการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ด นอกจากนั้นแล้วยังพบพืชปลูกหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยในสภาพธรรมชาติ คือ พริก มะเขือเทศ แตงโม แคนตาลูป ยาสูบ ถั่วพุ่ม รวมทั้งวัชพืชในแปลงปลูก เช่น โทงเทง ผักเป็ด แพงพวย ผักเสี้ยนผี ผักแครด และกระดุมใบ (โสภณ, 2536) ลักษณะอาการของพืชที่ถูกทอสโพไวรัสเข้าทำลาย จะมีอาการไหม้ (necrosis) บนส่วนต่างๆ ของพืช อาการบนใบ เช่น ใบซีด (chlorosis) ด่างวงแหวน (ring spot) ด่างประ (mottling) ใบเป็นสีเงิน (silvering) แคระแกร็น (stunting) และใบจุด (local lesion) ซึ่งอาการของโรคจะผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัส พืชอาศัย ระยะเวลาที่เชื้อเข้าทำลายพืชและสภาพแวดล้อม ในสภาพธรรมชาติทอสโพไวรัสมีเพลี้ยไฟเป็นพาหะถ่ายทอดโรค เพลี้ยไฟที่มีรายงานว่าเป็นพาหะของทอสโพไวรัสมีทั้งหมด 8 ชนิด

ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบและจำแนกชนิดทอสโพไวรัสแล้ว 4 ชนิด ได้แก่ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) Thailand tomato tospovirus or *tomato necrosis virus* (TNSV) *Capsicum chlosis virus* (CaCV) และ *Melon yellow spot virus* (MYSV) (โสภณ, 2536; Pongsapich และ Chiemsombat, 2002; วิมลและคณะ, 2548)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. CTAB buffer
2. 0.05M sodium carbonate coating buffer
3. chloroform:isoamyl alcohol
4. anti-rabbit IgG alkaline phosphatase
5. substrate buffer (Diethanolamine 9.7%, Sodium azide 0.02%)
1. 1% agarose gel

วิธีการ

มีขั้นตอนการวิจัย ดังนี้

1. การเก็บตัวอย่างพืชในแปลงปลูก เก็บตัวอย่างพืช เช่น มะเขือเทศ พริก พืชตระกูลแตง จากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างพืชที่แสดงอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากทอสโพไวรัสเข้าทำลายอัน ได้แก่ อาการด่างจุดวงแหวน แผลเนื้อเยื่อตาย ผลมีสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม ใบด่างแบบใบโอ๊ค เป็นต้น ใส่ตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกปิดปากถุง จดบันทึกสถานที่เก็บตัวอย่าง อายุพืช พันธุ์พืช รวมทั้ง บันทึกภาพลักษณะ

อาการของโรค และนำตัวอย่างพืชกลับมาตรวจสอบที่ห้องปฏิบัติการ โดยเก็บ ตัวอย่างพืชไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 , -20, -80 องศาเซลเซียส หรือทำให้ใบพืชแห้งโดยการดูดความชื้นด้วย silica gel แล้วเก็บรักษาใบแห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใส่ตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกกันน้ำและเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ห้องปฏิบัติการ

2. ตรวจสอบทอสโพไวรัสในตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) การตรวจสอบเชื้อทอสโพไวรัสในเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค ทำโดยบดตัวอย่างพืชใน 0.05M sodium carbonate coating buffer (Na_2CO_3 1.59 กรัม/ลิตร, $NaHCO_3$ 2.93 กรัม/ลิตร) ที่แช่เย็น ในอัตราใบพืชต่อบัฟเฟอร์ 1:20 (กรัมต่อมิลลิลิตร) ดูดน้ำคั้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ ELISA plate ที่ใช้ทดสอบ บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ครบเวลาแล้วล้าง plate ด้วย 1x PBST (NaCl 8.0 กรัม/ลิตร, $NaHPO_4$ $12H_2O$ 2.9 กรัม/ลิตร, KH_2PO_4 0.2 กรัม/ลิตร, KCl 0.2 กรัม/ลิตร, Tween 20 0.05%) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที บดใบพืชปกติใน conjugate buffer (PBST ที่ผสม PVP 2% และ ovalbumin 0.2%) อัตรา 1:50 น้ำหนักต่อปริมาตร กรองเอาเฉพาะน้ำคั้นมาผสมกับแอนติซีรัม ในอัตราส่วน 1:1,000 (โดยปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20-40 นาที จากนั้นใส่แอนติซีรัมในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้น ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้าง plate ตามวิธีเดิม เตรียม anti-rabbit IgG alkaline phosphatase ที่เจือจางในอัตรา 1:30,000 (โดยปริมาตร) ใน conjugate buffer นำไปใส่ในหลุมตัวอย่างที่ล้างแล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ล้าง plate ตามวิธีเดิม เตรียม 0.1% p - nitrophenyl phosphate ใน substrate buffer (Diethanolamine 9.7%, Sodium azide 0.02%) ใส่ในหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45-60 นาที หยุดปฏิกิริยา ด้วยสารละลาย 3M NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร อ่านค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

3. การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิค (nucleocapsid gene; N gene) ของไวรัสด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (PCR; polymerase chain reaction)

3.1 การสกัดอาร์เอ็นเอจากใบพืช ด้วยการสกัดอาร์เอ็นเอรวม (total RNA) ตามวิธี CTAB method (Chang *et al*., 1993) โดยบดตัวอย่างใบพืชน้ำหนัก 100 มิลลิกรัม ในไนโตรเจนเหลว ให้เป็นผงละเอียด ย้ายใบพืชที่บดแล้วใส่ลงในหลอดทดสอบ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% Na_2SO_3, 2% PVP) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากัน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อีกครั้ง ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม 4M LiCl ปริมาตร 1 เท่าของส่วนใส เพื่อตกตะกอนอาร์เอ็นเอ ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที

เทสารละลายออก และละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 200 ไมโครลิตร TE buffer ที่ผสม 1% SDS เติม 100 ไมโครลิตร 5M NaCl และ 300 ไมโครลิตร isopropanol ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายออก ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย แอลกอฮอล์ 70% หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทำตะกอนให้แห้ง และละลายตะกอนด้วย 50 ไมโครลิตร Rnase-free water เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การสังเคราะห์ N gene-cDNA จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบพืชเป็นโรค ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR (Goblet *et al.,* 1989) โดยสังเคราะห์ cDNA สายแรกโดยเตรียมส่วนผสมในหลอดทดสอบขนาด 0.2 มิลลิลิตร ดังนี้ Rnase-free water 8.6 ไมโครลิตร, สารละลายอาร์เอ็นเอจากพืชเป็นโรค 5 ไมโครลิตร และ reverse primer 100 pmole 0.4 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน อุ่นที่ 75 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แช่น้ำแข็ง นาน 5 นาที แล้วเติม 5x RT buffer 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม M-MuLV reverse transcriptase (200 units ต่อไมโครลิตร) 1 ไมโครลิตร รวมปริมาตร 20 ไมโครลิตร บ่มที่ 42 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที นำ cDNA ไปทำปฏิกิริยา PCR ทันที หรือเก็บ cDNA ที่ได้ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

สังเคราะห์ N gene-cDNA สายที่สอง ในปฏิกิริยามีส่วนผสมดังนี้ cDNA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร 10x PCR buffer 5.0 ไมโครลิตร 25 mM $MgCl_2$ 2.5 ไมโครลิตร 10 mM dNTPs 1 ไมโครลิตร 100 pmole forward primer 0.4 ไมโครลิตร 100 pmole reverse primer 0.4 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase (5 units ต่อไมโครลิตร) 0.2 ไมโครลิตร Rnase-free water 30.5 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดสอบขนาด 0.2 มิลลิลิตร ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำหลอดส่วนผสมไปใส่ในเครื่อง thermal cycler ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที 1 รอบ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 55 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที รวม 30 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที 1 รอบ ตรวจผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ (DNA product) จากปฏิกิริยา PCR ใน 1% agarose gel electrophoresis ใน 1x Tris-borate buffer (TBE) ย้อมดีเอ็นเอด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UVtransilluminator และบันทึกผล

เวลาสถานที่

แหล่งปลูกพืชที่สำคัญในประเทศไทย

ห้องปฏิบัติการทดลองของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

รวมระยะเวลาดำเนินการตลอดการทดลอง เริ่มต้น ตุลาคม 2553- สิ้นสุดกันยายน 2556

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างพืช ได้แก่ พริก มะเขือเทศ และมันฝรั่ง จากแปลงปลูกใน 8 จังหวัด คือ กาญจนบุรี อุบลราชธานี ศรีสะเกษ เชียงใหม่ กาฬสินธุ์ บุรีรัมย์ สระแก้ว และจังหวัดตาก ที่แสดงอาการคล้ายถูกทอสโพไวรัสเข้าทำลาย ได้ตัวอย่างพริก 80 ตัวอย่าง มะเขือเทศ 25 ตัวอย่าง และ มันฝรั่ง 37 ตัวอย่าง

จากการตรวจวินิจฉัยทอสโพไวรัสในตัวอย่างพริก มะเขือเทศ และมันฝรั่ง ด้วยวิธี DAC-ELISA พบว่าตัวอย่างพืชเกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับแอนติซีรัมต่อซีโรกรุ๊ป IV แต่ไม่เกิดปฏิกิริยากับแอนติซีรัม ซีโรกรุ๊ป I (TSWV) โดยตรวจพบทอสโพไวรัสในพริก 4 ตัวอย่าง มะเขือเทศ 2 ตัวอย่าง มันฝรั่ง 3 ตัวอย่าง

สำหรับการตรวจสอบด้วยสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิค (N gene) ด้วยเทคนิคอาร์ที พีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ตาม Table 1 พบ CaCV ในตัวอย่างพริก และมันฝรั่ง และ TNRV ในมะเขือเทศ

Table 1 Primers used in RT-PCR for amplification of N gene fragments of *Tospovirus*

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
CaCV-R	5’CCCGGATCCTTACACTTC(A/T)A(C/T)AGAAG3’
CaCV-F	5’CCCGGATCCATGTCTA(A/C)CGTCAGGC3’
WSMoV-VR	5′ATGTCTAACGTTAAGCAGCACACAG 3′
WSMoV-CF	5′TTACACTTCCAAAGAAGTGCTGGGC 3′
3VgTospoIV	5’GTAAACACCATGTCTA(CA)CGT3’
TNRVN-F	5’ATATATCAAACACACACAGAC3’
MY150F	5’CACCTCATCTCTCACATCCGT3’
WS204F	5’CTTGCAGGCTGCAAA AATCTG3’
Ca162F	5’TGTGAAAGTCATTTCAACGCT3’
TN172F	5’TCAAGCAGTTCGTGAAGGTC3’

ตัวอย่างพริกที่ตรวจพบทอสโพไวรัส แสดงอาการที่ใบ ก้านใบ และลำต้นมีลักษณะเป็นแผลเนื้อเยื่อตายเป็นวงซ้อนกัน ในมะเขือเทศอาการที่พบคือ ใบมีลักษณะเป็นจุดสีเหลือง และเกิดอาการแผลเซลล์ตายบนใบ ก้านใบ และลำต้น ใบ ยอดเป็นสีม่วงร่วมกับมีแผลเซลล์ตายเป็นวงสีน้ำตาลหรือสีดำ ผลมะเขือเทศ พบอาการแผลไหม้สีน้ำตาล แผลด่างเป็นวง สำหรับมันฝรั่งอาการที่พบคือ ใบจุดสีเหลือง น้ำตาล จุดแผลไหม้เป็นวง แผลเซลล์ตายบนใบ

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบทอสโพไวรัสในตัวอย่างพริก มะเขือเทศ และมันฝรั่ง ด้วยวิธี DAC-ELISA และ การสังเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิค (N gene) ด้วยเทคนิคอาร์ที พีซีอาร์นั้น พบเชื้อทอสโพไวรัสในตัวอย่างพริกและมันฝรั่ง พบเชื้อทอสโพไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ในตัวอย่างพริก และมันฝรั่ง และเชื้อทอสโพไวรัส Thailand tomato tospovirus or *tomato necrosis virus* (TNSV) ในตัวอย่างมะเขือเทศ

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาแนวทางในการเฝ้าระวังและการป้องกันการระบาดของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อทอสโพไวรัสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ธีระ สูตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. บริษัทฟันนี่พับบลิชซิ่ง ,กรุงเทพฯ

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ. 2524. **โรคของมะเขือเทศที่เกิดจาก tomato spotted wilt virus.** รายงานประจำปี 2524. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ วิมล สีเทา อัญจนา บุญชด นุชนาถ วารินทร์ และอรประไพ คชนันทน์. 2548. การใช้เรียวไทม์พีซีอาร์สำหรับตรวจสอบชนิดของเชื้อทอสโพไวรัส. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 (สาขาพืช) (abstract)** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

โสภณ วงศ์แก้ว. 2536. **โรคของถั่วลิสงในประเทศไทย.** กลุ่มพืชน้ำมัน กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ. 44 น.

โสภณ วงศ์แก้ว และ จุฑารัตน์ เชื้อพงษ์. 2537. ระบาดวิทยาของไวรัสยอดไหม้ถั่วลิสง ปี 2536-2537, น. 197-202. *ใน* **รายงานการสัมมนางานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 12**, 25-27 ตุลาคม 2537. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

วิมล สีเทา พิสสวรรณ เจียมสมบัติ โสภณ วงศ์แก้ว อรประไพ คชนันทน อัญจนา บุญชด และนุชนาถ วารินทร์. 2548. การตรวจพบทอสโพไวรัสสองชนิดเข้าทำลายพืชร่วมกันในประเทศไทย น. 558-564 *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43 (สาขาพืช)**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Bezerra, I.C., R. de O. Resende, L. Pozzer, T. Nagata, R. Kormelink and A.C. de Avia. 1999. Increase of tospoviral diversity in Brazil with the identification of two new tospovirus species, one from chrysanthemum and one from zucchini. **Phytopathology.** 89: 823-830.

Brittlebank, C.C. 1919. Tomato diseases. **J Agric Victoria** 17: 231–235.

Chiemsombat, P., O. Gajanandana, N. Warin, R. Honprayoon, A. Bhunchoth and P. Pongsapich. 2008. Biological and molecular characterization of tospoviruses in Thailand. **Arch. Virol**. 153(3): 571-7.

Cortes, I., IC. Livierators, A. Peters and R. Kormelink. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. **Phytopathology.** 88: 1276-1282.

De Avila, A.C., P. de Haan, R. Kormelink, R. de O. Resende, R.W. Goldbach and D. Peters. 1993. Classification of tospoviruses based on the phylogeny of nucleocapsid gene sequences. **J.Gen. Virol.** 74: 153-159.

Elliot, R.M., M. Bouloy, C.H. Calisher, R. Goldbach, J.T. Moyer, S.T. Nichol, R. Pettersson, A. Plyusnin and C.S. Schmaljohn. 2000. Bunyaviridae. pp.617–621. *In*: van Regenmortal, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wicknewr (eds.). **Virus Taxonomy**, **7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Academic Press**,** San Diego, USA

German, T.L., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. Tospoviruses : diagnosis, molecular biology,phylogeny, and vector relationships. Annu. Rev. **Phytopathology.** 30: 315-348.

Hassani-Mehraban, A., M. Botermans. J. Th. J. Verhoeven, E. Meekes , J. Saaijer, D. Peters,R. Goldbach and R. Kormelink. 2010. A distinct tospovirus causing necrotic streak on Alstroemeria sp. in Colombia. **Arch. Virol.** 155: 423–428.

Law, M.D., J. Speck and J.W. Moyer. 1991. Nucleotide sequence of the 30 non-coding region and N gene of the S RNA of a serologically distinct tospovirus. **J. Gen. Virol.** 72: 2597–2601.

Lin, Y.H., T.C. Chen, H.T. Hsu, F.L. Liu, F.H. Chu, C.C. Chen, Y.Z. Lin and S.D. Yeh. 2005. Serological comparison and molecular characterization for verification of *Calla lily chlorotic spot virus* as a new tospovirus species belonging to *Watermelon silver mottle virus* serogroup.**Phytopathology** 95: 1482–1488.

Mandal, B., A. S. Csinos, N. Martinez-Ochoa and H. R. Pappu. 2007. A rapid and efficient inoculation method for Tomato spotted wilt tospovirus. **J. Virol. Methods** 149: 195-198.

Mandal, B., A. S. Csinos,and A.K. Culbreath. 2006. Response of peanut, pepper, tobacco and tomato cultivars to two biologically distinct isolates *Tomato spotted wilt wirus*. **Plant Dis**. 90: 1150-1155.

Mandal, B., A. S. H.R. Pappu and A.K. Culbreath. 2001. Factors Affecting Mechanical Transmission of *Tomato spotted wilt virus* to Peanut (*Arachis hypogaea*). **Plant Dis**. 85: 1259-1263.

Mumford, R.A., I. Barker and K.R. Wood. 1996. An improved method for the detection of *Tospoviruses* using the polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.** 57: 109-115

Nichol, S.T., B.J. Beaty, R. M. Elliott, R. Goldbach, A .Plyusnin, C.S. Schmaljohn and R.B. Tesh. 2005. Bunyaviridae. *In*: Fauquet.,C.M , M.A.Mayo, J.Maniloff, U.Desselberger, L.A Ball. (eds) **Virus Taxonomy, 8th Report of the ICTV**. Elsevier/Academic Press,

Pongsapich, P. and P. Chiemsombat. 2002. Characterization of Tospovirus Infecting Tomatoes in Thailand Revealed the Presence of Serogroup IV-tospovirus But Not Serogroup I-tomato spotted wilt virus. 92p. *In* **The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease.** The Imperial Mae Ping Hotel Chiang Mai, Thailand.

Reddy, D.V.R., A.S. Ratana, M.R. Sudarshana, F. Poul and I.K. Kumar. 1992. Serological relationships and purification of bud necrosis virus, a tospovirus occurring in peanut (*Arachia hypogaea* L.) in India. **Ann. Appl. Biol.** 120: 279-286.

Yeh, S.D. and T.F. Chang. 1995. Nucleotide sequence of the N gene of *watermelon silver mottle virus*, a proposed new member of the genus Tospovirus. **Phytophology.** 85: 58-64.

Satyanarayana, T., S. Gowda, K. Lakshminarayana Reddy, S.E. Mitchell, W.O. Dawson and D.V.R. Reddy. 1998. Peanut yellow spot virus is a member of serogroup V of tospovirus genus based on small(S) RNA sequence and organization. **Arch. Virol.** 143: 353-364.

ภาคผนวก

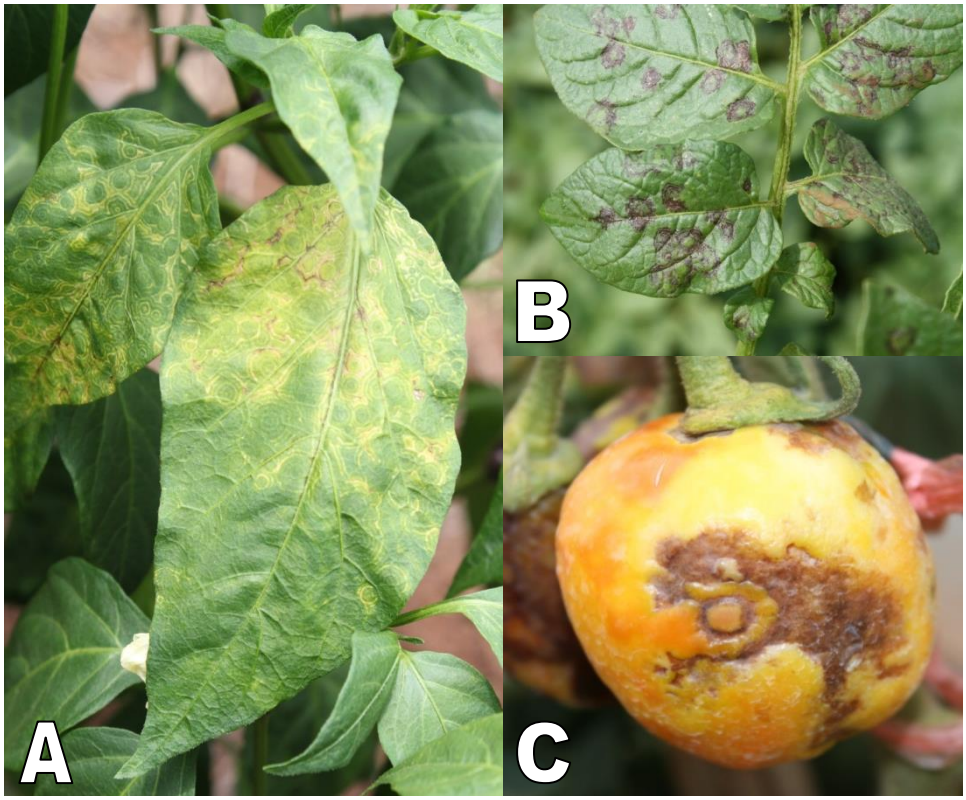

Figure 1. Symptoms of *Tospovirus*

A. *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) on chili
B. *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) on potato
C. *tomato necrosis virus* (TNSV) on tomato