

การศึกษาและจำแนกโรค *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ในกระเทียม
Study and Identification of *Leek yellow stripe virus* (LYSV) Disease on Garlic

สิทธิศักดิ์ แสนไพศาล แสนชัย คำหล้า
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Progress report

The leaves of garlic 21 samples from cultivated area of Fang district, Chai Pakan district Chiang Mai province and Lamphun province were tested with POCY kit ,because of LYSV is a member of the Potyvirus group. The results showed that the virus in a group of Potyvirus was detected on garlic leaf samples which showed symptom yellow chlorotic stripe at the tip of leaves and a small streak on the leaves, cause abnormal yellow stripe on leaves. The samples were studied on symptom characteristics of disease by using differential host plants as tobacco (*Nicotiana benthamiana*), tomato (*Lycopersicon esculentum*), cape gooseberry (*Physalis minima*), bush bean (*Vigna sinensis*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) in greenhouse; the temperature was controlled at 25-28°C for at least 1 month. All of differential host plants were not appeared the symptom, some samples were selected for electron microscopic examination. The specific primers were designed for coat protein gene of *Leek yellow stripe virus* (LYSV) for detection of LYSV disease, including increase amount of cDNA and nucleotide sequences analysis of cDNA product for the further. Which is in the process on October 2017 to September 2018.

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-10-60

รายงานความก้าวหน้า

ตรวจตัวอย่างใบกระเทียมที่เก็บจากแปลงปลูกกระเทียมของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ฝาง อ.ไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน จำนวน 21 ตัวอย่าง ด้วยชุดตรวจสอบ POCY kit เนื่องจากเชื้อไวรัส LYSV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus ผลตรวจพบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus กับตัวอย่างใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการเป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีดๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ จึงได้นำตัวอย่างใบกระเทียมดังกล่าวมาศึกษาลักษณะอาการของโรคบนพืชทดสอบได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), โทงเทง (*Physalis minima*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีนโโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน ผลการทดสอบพบว่า พืชทดสอบทั้งหมดไม่แสดงอาการปรากฏให้เห็น จึงได้คัดแยกตัวอย่างบางส่วนไปใช้ในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene) ของ *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เพื่อตรวจสอบโรค LYSV รวมทั้งเพื่อเพิ่มปริมาณและนำ cDNA product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป ซึ่งยังอยู่ในระหว่างดำเนินการในเดือนตุลาคม 2560-เดือนกันยายน 2561

คำนำ

ปัจจุบันมีการปลูกกระเทียมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งต้องประสบปัญหาการระบาดของแมลงและโรค ที่มีเชื้อสาเหตุมาจากเชื้อรา แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอย รวมทั้งไวรัส ส่งผลกระทบต่อผลผลิตและคุณภาพของกระเทียม ซึ่งโรคไวรัสที่มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เป็นเชื้อในกลุ่ม Potyviruses เมื่อติดเชื้อ LYSV ในแปลงสามารถเข้าทำลายต้นหอมได้ถึง 100% (Bos, 1983) ส่วนการสูญเสียผลผลิตในกระเทียมสูงถึง 60% และสูงถึง 84% เมื่อติดเชื้อไวรัสชนิดอื่นในกลุ่ม potyvirus ร่วมด้วย อัตราการงอกในกระเทียมได้รับผลกระทบและลดลงถึง 60% (Lot *et al.*, 1998) ซึ่งโรคนี้อาศัยแมลง *Myzus persicae* และ *Aphis fabae* เป็นพาหะนำโรคที่สำคัญ ทำให้เกิดการแพร่ระบาดในแปลงปลูกและเป็นแมลงปากดูดที่มีความสำคัญต่อการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส (Lunello *et al.*, 2002) พืชสกุลกระเทียม (*Allium* spp.) อยู่ในวงศ์ Alliaceae เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยว ต่างจากพืชผักในสกุลอื่นๆ ซึ่งส่วนมากเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ มีแหล่งปลูกทั่วโลก พืชสกุลหอมกระเทียมได้แก่ หอมหัวใหญ่ (Onion, *A. cepa* L.) Potato Onion (*A. cepa* var. *aggregatum* G. Don) หอมแดงและหอมแบ่ง (Shallot, *A. ascalonicum* L.) กระเทียม (Garlic, *A. sativum* L.) เป็นต้น ในประเทศไทยพืชสกุลหอมกระเทียมที่ปลูกมากและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ได้แก่ หอมหัวใหญ่ หอมแดง กระเทียม เป็นพืชที่เกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันของไทยแทบทุกครัวเรือน ใช้ปรุงเป็นอาหาร ทำยา และเครื่องสำอาง นอกจากนี้ปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้ว ยังส่งออกขายในต่างประเทศทำรายได้ให้เกษตรกรอย่างมาก กระเทียมมีพื้นที่ปลูกทางภาคเหนือ คือ จังหวัดเชียงราย พะเยา ลำปาง ลำพูน เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ตาก แพร่ น่าน อุตรดิตถ์ เพชรบูรณ์ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คือ จังหวัดนครพนม ศรีสะเกษ ชัยภูมิ และ

นครราชสีมา ในปี พ.ศ. 2551 มีพื้นที่ปลูกรวม 87,411 ไร่ ได้ผลผลิต 85,648 ตัน ส่งออกจำนวน 199.2 ตัน มีมูลค่าการส่งออก 8.2 ล้านบาท (กลุ่มวิจัยโรคพืช, 2545) เชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เป็นเชื้อในกลุ่ม Potyviruses ซึ่งเมื่อเชื้อ LYSV เข้าทำลายในกระเทียม จะทำให้เกิดแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบ และเป็นขีดๆ มีขนาดเล็กสีเหลืองและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ ส่งผลต่อการสูญเสียผลผลิตพืช Allium โดยเฉพาะอย่างยิ่งใกล้ฐานแต่ไม่ได้จำกัดอยู่ในพื้นที่นี้ ในบางกรณีใบทั้งหมดสามารถเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Bos *et al.*, 1978)

ดังนั้น เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาจำแนกเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ในกระเทียม โดยทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนดูอนุภาค ศึกษาการถ่ายทอดโรคกับพืชทดสอบ และตรวจสอบทางเซรัมวิทยา ด้วยวิธี ELISA หรือใช้วิธี RT-PCR และยังใช้เป็นวิธีช่วยทวนสอบให้ชัดเจนมากขึ้น โดยออกแบบ primers ที่เฉพาะเจาะจง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- Ultra-centrifuge
- Spectrophotometer
- ตู้แช่แข็ง 4 และ -20°C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และตรวจสอบตัวอย่าง

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ที่มีลักษณะอาการเป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีดๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ ในแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำพูน ระหว่างเดือนตุลาคม 2559-สิงหาคม 2560 เพื่อนำกลับมาয়ห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อ LYSV และนำไปทดสอบหาเชื้อในพืชทดสอบไวรัส

2. การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV)

2.1 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างกล้วยไม้จากรังกล้วยไม้ ในแต่ละแหล่งปลูกที่เก็บรวบรวมในข้อ 1 มาตรวจสอบหาเชื้อไวรัส โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip โดยบดตัวอย่างใบพืชใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 บนแผ่นใสลัด นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh (มีช่องสี่เหลี่ยม

300 ช่องต่อตารางนิ้ว) มาคว่ำลงบนน้ำคั้นทิ้งไว้ 1 นาที ใช้คีมคีบกริดขึ้นจากน้ำคั้น ซับส่วนที่เป็นของเหลวรอบกริด หยดน้ำกลั่นลงบนกริดเพื่อชะล้างสารโมเลกุลใหญ่ เช่นเกลือต่างๆออกไป ทำการย้อมสีแบบ negative staining ซึ่งเป็นการย้อมสีพื้นที่รอบๆอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วย 2% Phosphotungstic acid (PTA) นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.2 การสกัดและตรวจสอบด้วยเทคนิคซีวโมเลกุล

สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบกระเทียมที่เป็นโรคโดยนำตัวอย่างใบกระเทียมที่เป็นโรค น้ำหนัก 100-200 มิลลิกรัม บดในไนโตรเจนเหลวจนละเอียด ย้ายตัวอย่างลงในหลอดขนาด 1.5 ไมโครลิตร เติม extraction buffer (0.1 M NaCl, 2% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 9.0) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร แล้วเติม β -mercaptoethanol ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วย vortex และบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที เติม Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol (25:24:1) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 16,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติม Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1) หนึ่งเท่าของปริมาตรส่วนใส ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่แล้ว เติม Isopropanol ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ 5M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วตากตะกอนประมาณ 20 นาที และเติม diethylpyrocarbonate (DEPC)-dH₂O ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome ของไวรัสตรงยีนในส่วนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene) ของ *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ด้วยการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties ทำการออกแบบและวิเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง เพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA และตรวจสอบโรค LYSV

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

นำ cDNA product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับ Sequence หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้อำนาจวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของทอสโปไวรัสที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)

3. การปลูกเชื้อบนพืชอาศัย

นำใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการของโรคมาปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ โดยบดใบพืชที่เป็นให้ละเอียดผสมกับ 0.5M phosphate buffer pH 7.0 ที่ผสม 2-mercaptoethanol อัตรา 0.2% ผสมผงซีไลท์ (celite) นำน้ำคั้นทาลงบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ

(*Lycopersicon esculentum*), พริก (*Capsicum annum*) และคีนัว (*Chenopodium quinoa*) แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบอาการของพืชทดสอบเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และตรวจสอบตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Leek yellow stripe virus* (LYSV) ที่มีลักษณะอาการเป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีดๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ จากแปลงปลูกกระเทียมของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ฝาง อ.ไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน จำนวน 21 ตัวอย่าง ในระหว่างเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2560 ในเบื้องต้นได้ใช้ชุดตรวจสอบ POCY kit ในการตรวจตัวอย่างใบกระเทียมที่มีลักษณะอาการดังกล่าวเนื่องจากเชื้อไวรัส LYSV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus ซึ่งผลการตรวจสอบพบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus กับตัวอย่างใบกระเทียม ดังนั้น จึงได้นำตัวอย่างใบกระเทียมดังกล่าวกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบและเพิ่มปริมาณ cDNA ของเชื้อไวรัส LYSV ด้วยเทคนิคซีวโมเลกุล และเพื่อศึกษาบนพืชอาศัยต่อไป



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะอาการของเชื้อไวรัส Leek yellow stripe virus (LYSV) บนใบกระเทียม

2. การปลูกเชื้อบนพืชอาศัย

หลังนำไปกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการของโรคมารูปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ โดยบดใบพืชให้ละเอียดกับ 0.5M phosphate buffer pH 7.0 ผสมผงซีไลท์ (celite) แล้วนำมาทาบบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), โทงเทง (*Physalis minima*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีนัว (*Chenopodium quinoa*) แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อแล้วเมื่อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ จากผลการทดลองตรวจไม่พบอาการ systemic บนพืชทดสอบ ต้นพืชทดสอบทั้งหมดไม่แสดงอาการปรากฏให้เห็น จึงได้ทำการทดสอบซ้ำพร้อมทั้งได้คัดแยกตัวอย่างบางส่วนไปใช้ในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และทำการสกัดและตรวจสอบด้วยเทคนิคซีวโมเลกุล

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ตัวอย่างใบกระเทียมที่แสดงลักษณะอาการเป็นแถบสีเหลืองอ่อนที่ส่วนปลายใบและเป็นขีดๆ บนใบมีขนาดเล็กและทำให้เกิดแถบสีเหลืองผิดปกติบนใบ จากแปลงปลูกกระเทียมของเกษตรกรในพื้นที่ อ.ฝาง อ.ไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดลำพูน จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยได้ตรวจในเบื้องต้นด้วยชุดตรวจสอบ POCY kit เนื่องจากเชื้อไวรัส LYSV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus ซึ่งผลการตรวจสอบพบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus กับตัวอย่างใบกระเทียม จึงได้นำตัวอย่างใบกระเทียมดังกล่าวมาศึกษา ลักษณะอาการของโรค โดยปลูกเชื้อบนพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), โทงเทง (*Physalis minima*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีนัว (*Chenopodium quinoa*) ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งจากผลการทดสอบดังกล่าวตรวจไม่พบอาการ systemic บนพืชทดสอบและต้นพืชทดสอบทั้งหมดไม่แสดงอาการปรากฏให้เห็น จึงได้ทำการทดสอบซ้ำพร้อมทั้งเตรียมบัฟเฟอร์ใหม่ทั้งหมด อีกทั้งได้คัดแยกตัวอย่างบางส่วนไปใช้ในการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome ของไวรัสตรงยีนในส่วนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene) ของ *Leek yellow stripe virus* (LYSV) เพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA และตรวจสอบโรค LYSV และนำ cDNA product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) ต่อไป

ซึ่งยังอยู่ในระหว่างการดำเนินการในเดือนตุลาคม 2560-เดือนกันยายน 2561

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, 2554, โรคผักและการป้องกันกำจัด, หน้า 138.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี (2557). กระเทียม สืบค้นเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน 2557 Website:

<http://th.wikipedia.org/wiki/กระเทียม>

Bos, L. 1983. Viruses and virus diseases of Allium species. Acta Horticulturae 127: 11-29.

Bos, L., Huijberts, N., Huttinga, H., and Maat, D.Z. 1978. *Leek yellow stripe virus* and its relationships to *Onion yellow dwarf virus* - characterization, ecology, and possible control. Netherlands Journal of Plant Pathology 84(5): 185-204.

Lot, H., Chovelon, V., Souche, S., and Delecolle, B. 1998. Effects of *Onion yellow dwarf virus* and *leek yellow stripe viruses* on symptomatology and yield loss of three French garlic cultivars. Plant Disease 82(12): 1381-1385.

Lunello, P., Ducasse, D.A., Heiguera, M., Nome, S.F., and Conci, V.C. 2002. An Argentinean isolate of *Leek yellow stripe virus* from leek can be transmitted to garlic. Journal of Plant Pathology 84(1): 11-17.