



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

ปริญญา

โรคพืช

โรคพืช

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ความหลากหลายทางชีวภาพของ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกจากแตงกวาใน  
ประเทศไทย

Biodiversity of *Cucumber mosaic virus* Isolated from Cucumber in Thailand

นามผู้วิจัย นายภูวนารถ มณีโชติ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ, Dr.Agr. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี ฮงประยูร, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสุวรรณ เจียมสมบัติ, Dr.Agr. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ความหลากหลายทางชีวภาพของ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกจากแตงกวาในประเทศไทย

Biodiversity of *Cucumber mosaic virus* Isolated from Cucumber in Thailand

โดย

นายภูวนารถ มณีโชติ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กวนารต มณีโชติ 2553: ความหลากหลายทางชีวภาพของ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกจาก  
แตงกวาในประเทศไทย ปรินญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชา  
โรคพืช อาจารย์ที่ปรินญาวิทยานินพณ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิสสุวรรณ เจริญสมบัติ, Dr.Agr.  
103 หน้า

*Cucumber mosaic virus* (CMV) เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชหลาย  
ชนิดรวมทั้งพืชตระกูลแตง งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาความหลากหลายของเชื้อ CMV ที่พบใน  
แตงกวาเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์แตงกวาให้ต้านทานต่อไวรัส เก็บตัวอย่างแตงกวาและแตงร้านที่แสดง  
อาการใบด่างจากแปลงปลูกใน 11 จังหวัด จำนวน 2,250 ตัวอย่าง ตรวจสอบเชื้อและแยกเชื้อ CMV ได้ 4  
ไอโซเลทแล้วนำมาศึกษาร่วมกับอีก 6 ไอโซเลทที่ได้รับความอนุเคราะห์เตรียมไวรัสบริสุทธิ์ทั้ง 10  
ไอโซเลทได้ในปริมาณ 0.340-1.680 มก.จากใบยาสูบ 50 กรัม และตรวจสอบอนุภาคของ CMV แต่ละ  
ไอโซเลทมีขนาดประมาณ 24-28 นาโนเมตร มีโปรตีนห่อหุ้ม (coat protein, CP) ขนาดประมาณ 26  
กิโลดาลตัน เชื้อ CMV เพิ่มปริมาณและเริ่มแพร่กระจายจากใบยาสูบที่ได้รับเชื้อไปสู่ส่วนยอดผ่านจากเซลล์  
ท่อลำเลียงอาหารที่เส้นกลางใบไปยังเซลล์พาเรไคโนมาทั่วแผ่นใบในช่วง 4-13 วันหลังการปลูกเชื้อ ถั่วเขียว  
*Vigna radiata* เป็นพืชอาศัยที่แสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่งที่ใช้สำหรับแยกเชื้อสายพันธุ์เดี่ยว แตงกวา  
พันธุ์พุ่มชบาแสดงอาการใบด่างแบบไม่รุนแรงหรือไม่แสดงอาการ ยาสูบ ลำโพง โทงเทง พริกและ  
มะเขือเทศ เป็นพืชอาศัยที่แสดงอาการใบด่างแบบแพร่กระจายทั่วต้น ศึกษาการตอบ สนองของพริกพันธุ์  
หัวเรือและมะเขือเทศพันธุ์สีดาที่พืช 4 ต่อเชื้อ CMV 10 ไอโซเลท พบอัตราการก่อโรคนบนพืชมีความแตกต่าง  
กันตั้งแต่ 10-100% โดยมีความผันแปรของอาการที่เกิดจากแต่ละไอโซเลทเพียงเล็กน้อย จากการวิเคราะห์  
รหัสพันธุกรรมและทำ multiple alignment พบว่ายีน 2b ของทุกไอโซเลทมีขนาด 336 นิวคลีโอไทด์ แพล  
รหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 111 เรซิดิวส์ มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 89%-100% และ 85%-100% ตามลำดับ  
ยีน CP มีขนาด 657 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 218 เรซิดิวส์ มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ  
89%-99% และ 92%-100% ตามลำดับ ส่วนปลาย 3' NTR ของ RNA3 มีขนาด 278-280 นิวคลีโอไทด์ มี  
ความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 91%-100% ไอโซเลท CRI HC53 HC56 และ A168 จัดเป็นสายพันธุ์ที่มีความ  
ใกล้เคียงกันมากที่สุด และยีน CP มีความผันแปรมากกว่ายีน 2b การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของ CMV 10  
ไอโซเลทด้วย phylogenetic tree ของยีน 2b ยีน CP และ 3' NTR ให้ผลที่สอดคล้องกันโดยทุกไอโซเลทจัด  
อยู่ใน serogroup I subgroup IB มีความใกล้เคียงมากกับ CMV จากพริก และจับกลุ่มกันแยกออกจาก CMV  
ที่พบในต่างประเทศ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของแหล่งที่พบเชื้อกับความผันแปรของรหัสพันธุกรรมใน  
ส่วนของยีน 2b ยีน CP และ 3' NTR

Phoowanarth Maneechoat 2010: Biodiversity of *Cucumber mosaic virus* Isolated from Cucumber in Thailand. Master of Science (Agriculture), Major Field: Plant Pathology, Department of Plant Pathology. Thesis Advisor: Assistant Professor Pissawan Chiemsombat, Dr.Agr. 103 pages.

*Cucumber mosaic virus* (CMV) is one of the most important plant viruses infecting several economic crops including cucurbitaceous plants. This study aimed to explore the diversity of CMV isolated from cucumber to support breeding program for virus resistance. The total 2,250 samples were collected from fields in 11 provinces and 4 samples were positively assayed for CMV infection by indirect PTA-ELISA. These 4 isolates together with 6 received isolates were used in biodiversity study. All isolates were separately purified from 50 g tobacco leaf tissues and yielded about 0.340-1.680 mg virus. Virus particles were icosahedra shaped size of 24-28 nm. Virion coat protein (CP) M.W. was estimated to be 26 kDa. CMV multiplication and translocation started from the inoculated tobacco leaves to the upper leaves via vascular cells of midvein and veinlet through the whole area of leaf blade parenchyma cells during 4-13 days post inoculation. *Vigna radiata* was a good local lesion host for virus isolation. Infected *Cucumis sativus* cv. Poomchaba showed mild symptom or symptomless leaves while *Nicotiana* spp., *Datura metel*, *Physalis angulata*, *Capsicum annuum*, and *Solanum lycopersicum* developed severe mosaic with leaf distortion. Responses of *C.annuum* cv. Huarua and *S.lycopersicum* cv. Seedatip4 to CMV slightly varied among virus isolates but infection percentage varied from 10 to 100%. Analysis of nucleotide and amino acid sequences followed by multiple alignments indicated the same structure of 2b, CP genes and 3' NTR of all cucumber isolates. Nucleotide and amino acid sequences shared about 89-100% and 85-100% identities for 2b gene, 89%-99% and 92%-100% for CP gene, and 91%-100% for 3' NTR, respectively. Isolates HC53, HC56 and CRI, including A168 were the most closed strains. Sequence diversity was present in CP more than 2b genes. Phylogenetic analysis placed all Thai CMV isolates in subgroup IB. Thai isolates from cucumber and pepper clustered together except isolates SNK, PBR and SK211. No correlation between sampling location to sequence diversity was found.

---

Student's signature

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้กรุณามอบความรู้ การเอาใจใส่ดูแล และให้คำปรึกษาจนกระทั่งสำเร็จ การศึกษาและทำวิทยานิพนธ์สำเร็จลงได้ด้วยดี ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รัชณี สงประยูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. คณิงนิตย์ เจริญวรารการประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้ายและ ดร. ปารีชาติ เบิร์น ผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำและร่วมตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ประสาทพร สมิตะมาน หัวหน้าชุดโครงการวิจัยเรื่อง การประเมินและพัฒนาแสงกวาพันธุ์แท้นานโรคไวรัส และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนวิจัยและทุนการศึกษา

ขอขอบคุณภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำหรับสถานที่ทดลอง อุปกรณ์ เครื่องมือ และการสนับสนุนด้านวิชาการเพื่อให้ดำเนินการวิจัยได้สำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ผู้มอบความรัก กำลังใจ และทุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

ด้วยความดีและประโยชน์อันเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแต่บิดา มารดา และคณาจารย์ รวมถึงผู้มีพระคุณทุกท่าน

ภูวนารถ มณีโชติ

เมษายน 2553

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลและวิจารณ์	28
สรุป	85
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	88
ภาคผนวก	98
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	103

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไพรเมอร์สำหรับตั้งคราะห์ยีน 2b , CP และ 3' NTR ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i>	24
2	ไอโซเลทของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่ตรวจพบในแปลงปลูกและที่ได้รับความอนุเคราะห์	29
3	ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ไอโซเลท SK211 ในใบยาสูบ <i>Nicotiana tabacum</i> พันธุ์ Xanthi-nc หลังการปลูกเชื้อแล้ว 4-13 วัน แต่ละวันตรวจสอบใบยาสูบ 1 ใบต่อต้น รวม 4 ต้น โดยใช้เทคนิค indirect PTA ELISA อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ( $A_{405}$ )	33
4	ความเข้มข้น ปริมาณเชื้อ และขนาดของอนุภาค <i>Cucumber mosaic virus</i> 10 ไอโซเลทที่เตรียมให้บริสุทธิ์	36
5	ลักษณะอาการบนพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ด้วยวิธีกล	49
6	การประเมินการตอบสนองของพริกพันธุ์หัวเรือต่อเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) 10 ไอโซเลท ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลจำนวน 10 ต้นต่อไอโซเลท หลังจากนั้น 30 วัน ให้คะแนนระดับอาการของโรค ตรวจวัดปริมาณเชื้อจากค่า ELISA นับจำนวนต้นที่เป็นโรคและคำนวณเปอร์เซ็นต์ก่อโรค	52
7	การประเมินการตอบสนองของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ต่อเชื้อ CMV 10 ไอโซเลท ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลจำนวน 10 ต้นต่อไอโซเลท หลังจากนั้น 20 วัน ให้คะแนนระดับอาการของโรค ตรวจวัดปริมาณเชื้อจากค่า ELISA นับจำนวนต้นที่เป็นโรคและคำนวณเปอร์เซ็นต์ก่อโรค	53
8	Accession number ในฐานข้อมูล GenBank ของยีน 2b ยีน CP และ 3' NTR ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่แยกได้จากแตงกวา แตงร้านและพืชอื่นในการศึกษานี้	56
9	เชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) จากฐานข้อมูล GenBank ที่นำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์และสร้าง phylogenetic tree	57

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
10	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ ยีน 2b ของ <i>Cucumber mosaic virus 10</i> ไอโซเลทที่แยกจากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย	58
11	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของ ยีน CP ของ <i>Cucumber mosaic virus 10</i> ไอโซเลทที่แยกจากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย	65
12	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' NTR ของ <i>Cucumber mosaic virus 10</i> ไอโซเลทที่แยกจากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย	74

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างจีโนม (genomic RNA) ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> เป็น positive-sense RNA 3 สาย ได้แก่ RNA1, 2, 3 ขนาด 3.3, 3 และ 2.2 กิโลเบส (kb) ตามลำดับ และ subgenomic RNA 2 สาย ได้แก่ RNA4 และ 4A ขนาด 689 และ 1,000 นิวคลีโอไทด์ (nt) ตามลำดับ	6
2	อาการและระดับคะแนนของอาการที่เกิดจากเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> บนใบพริก (ก) และมะเขือเทศ (ข)	20
3	อาการต่างบนใบแตงกวา ( <i>Cucumis sativus</i> ) จากแปลงที่ตรวจพบเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i>	31
4	แบบแผนการแพร่กระจายของเชื้อ CMV ไอโซเลท SK211 ในใบยาสูบ <i>Nicotiana tabacum</i> พันธุ์ Xanthi-nc ในช่วงเวลา 4-13 วันหลังการปลูกเชื้อ (dpi.) ด้วยวิธีกล ตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค Tissue print immunoblot assay (TPIBA)	32
5	กราฟแสดงแบบแผนการเพิ่มปริมาณของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ไอโซเลท SK211 ในใบยาสูบ <i>Nicotiana tabacum</i> พันธุ์ Xanthi-nc หลังจากได้รับการปลูกเชื้อด้วย วิธีกลแล้ว 4-13 วัน (dpi) ตรวจวัดปริมาณเชื้อในใบพืชที่อยู่ ถัดขึ้น ไปจากใบที่ปลูกเชื้อด้วยเทคนิค indirect PTA ELISA อ่านค่าการ ดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร	34
6	อนุภาคของ <i>Cucumber mosaic virus</i> ไอโซเลท HC53 ที่เตรียมให้บริสุทธิ์ ตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี dip preparation ย้อมสีด้วย 2% uranyl acetate	37
7	แถบอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากอนุภาคเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ในสาร แวนอลอยไวรัสที่แยกให้บริสุทธิ์	37

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	แถบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV ในสารแขวนลอยไวรัสที่เตรียมให้บริสุทธิ์แยกขนาดใน SDS-polyacrylamide gel ย้อมสีด้วย 0.2% coomassie blue R-250	38
9	อาการแผลจุดบนพืชทดสอบที่ได้รับเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> 3 วัน หลังจากปลูกเชื้อ	40
10	แสดงภาพพันธุ์พุ่มชบาแสดงอาการใบด่างหลังจากปลูกเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> แล้วประมาณ 2 สัปดาห์	43
11	แสดงภาพพันธุ์พุ่มชบาแสดงอาการใบด่างไม่ชัดเจนและขอบใบซีด หลังจากได้รับเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> แล้วประมาณ 2 สัปดาห์	44
12	ลักษณะอาการบนมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 หลังจากปลูกเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) แล้ว 20 วัน	45
13	ลักษณะอาการบนพริกพันธุ์หัวเรือหลังจากปลูกเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) แล้ว 20 วัน	46
14	อาการใบด่างและใบเสีรูปทรงบนยาสูบที่ได้รับการปลูกเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) หลังจากปลูกเชื้อ 15-20 วัน	47
15	อาการบนลำโพงที่ได้รับเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ไอโซเลท HC53 หลังปลูกเชื้อแล้ว 20 วัน	48
16	อาการใบด่างรุนแรงและเสีรูปทรงของโพงเทงที่ได้รับเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ไอโซเลท HC53 ประมาณ 17 วันหลังการปลูกเชื้อ	48

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 2b ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่ศึกษาเปรียบเทียบกับไอโซเลต SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5	59
18	ลำดับกรดอะมิโนของยีน 2b ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่ศึกษาเปรียบเทียบกับ ไอโซเลต SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5	61
19	Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของยีน 2b แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย (ไอโซเลตที่มีเครื่องหมาย*) กับไอโซเลตจากพืชอื่นในประเทศไทยและในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อ <i>Tomato aspermy virus</i> ไอโซเลต KC (TAV-KC) เป็น outgroup	62
20	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่ศึกษาเปรียบเทียบกับไอโซเลต SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5	66
21	ลำดับกรดอะมิโนของยีน CP ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่ศึกษาเปรียบเทียบกับไอโซเลต SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5	69

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย (ไอโซเลทที่มีเครื่องหมาย*) กับไอโซเลทจากพืชอื่นในประเทศไทยและในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อ <i>Tomato aspermy virus</i> ไอโซเลท KC (TAV-KC) เป็น outgroup	71
23	joining phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย (ไอโซเลทที่มีเครื่องหมาย*) กับไอโซเลทจากพืชอื่นในประเทศไทยและในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อ <i>Tomato aspermy virus</i> ไอโซเลท KC (TAV-KC) เป็น outgroup	72
24	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 3' NTR ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่ศึกษาเปรียบเทียบกับไอโซเลท SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5	75
25	Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 3' NTR แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย (ไอโซเลทที่มีเครื่องหมาย*) กับไอโซเลทจากพืชอื่นในประเทศไทยและในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อ <i>Tomato aspermy virus</i> ไอโซเลท KC (TAV-KC) เป็น outgroup	76

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอจากยีน 2b ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) 10 ไอโซเลทจากแตงกวาและแตงร้านเปรียบเทียบกับ CMV ที่พบในพืชอื่นในประเทศไทยและต่างประเทศ วิเคราะห์แบบ virtual PCR-RFLP ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>HapII</i> โดยใช้โปรแกรม CLC main workbench 5.5	78
27	แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอจากยีน CP ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) 10 ไอโซเลทจากแตงกวาและแตงร้านเปรียบเทียบกับเชื้อ CMV ที่พบในพืชอื่นในประเทศไทย และต่างประเทศ วิเคราะห์แบบ virtual PCR-RFLP ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>SatI</i> (ก) และ <i>HapII</i> (ข) โดยใช้โปรแกรม CLC mainworkbench 5.5	80
28	Phylogenetic tree จากแบบแผน RFLP ของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านกับเชื้อ CMV จากพืชอื่นในประเทศไทยและต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.2e ใช้ค่า bootstrap จาก 1000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50%	81
29	แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอส่วนของยีน CP ต่อเข้ากับปลาย 3' NTR ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) 10 ไอโซเลทจากแตงกวาและแตงร้านเปรียบเทียบกับเชื้อ CMV ที่พบในพืชอื่นในประเทศไทย และต่างประเทศ วิเคราะห์แบบ virtual PCR-RFLP ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ <i>SatI</i> (ก) และ <i>HapII</i> (ข) โดยใช้โปรแกรม CLC mainworkbench 5.5	83
30	Phylogenetic tree จากแบบแผน RFLP ของยีน CP ต่อเข้ากับ 3' NTR แสดงความสัมพันธ์ ของเชื้อ <i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV) ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านกับเชื้อ CMV จากพืชอื่นในประเทศไทยและต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.2e ใช้ค่า bootstrap จาก 1000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50%	84

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

2b	=	2b protein
3' NTR	=	3' non-translated region
BCIP	=	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate
CMV	=	<i>Cucumber mosaic virus</i>
CP	=	coat protein
DIECA	=	diethylthiocarbamic acid sodium salt
DOPE	=	1, 2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-ethanolamine
GAM	=	goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase
GAR	=	goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase
IgG	=	gamma-immunoglobulin
M	=	Molecular weight markers
MAb CM2	=	monoclonal antibody clone CM2
NBT	=	nitro-blue tetrazolium salt
A <sub>260</sub>	=	optical density at 260 nanometer wavelength
A <sub>280</sub>	=	optical density at 280 nanometer wavelength
A <sub>405</sub>	=	optical density at 405 nanometer wavelength
PAb-CMV	=	anti-CMV polyclonal antibody
PBS	=	phosphate buffer saline
PBST	=	phosphate buffer saline with 0.05% Tween-20
PEG	=	polyethylene glycol
PNPP	=	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
PVP	=	polyvinylpyrrolidone
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
TBS	=	Tris buffer saline
TBST	=	Tris buffer saline with 0.05% Tween-20

# ความหลากหลายทางชีวภาพของ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกจากแตงกวาในประเทศไทย

## Biodiversity of *Cucumber mosaic virus* Isolated from Cucumber in Thailand

### คำนำ

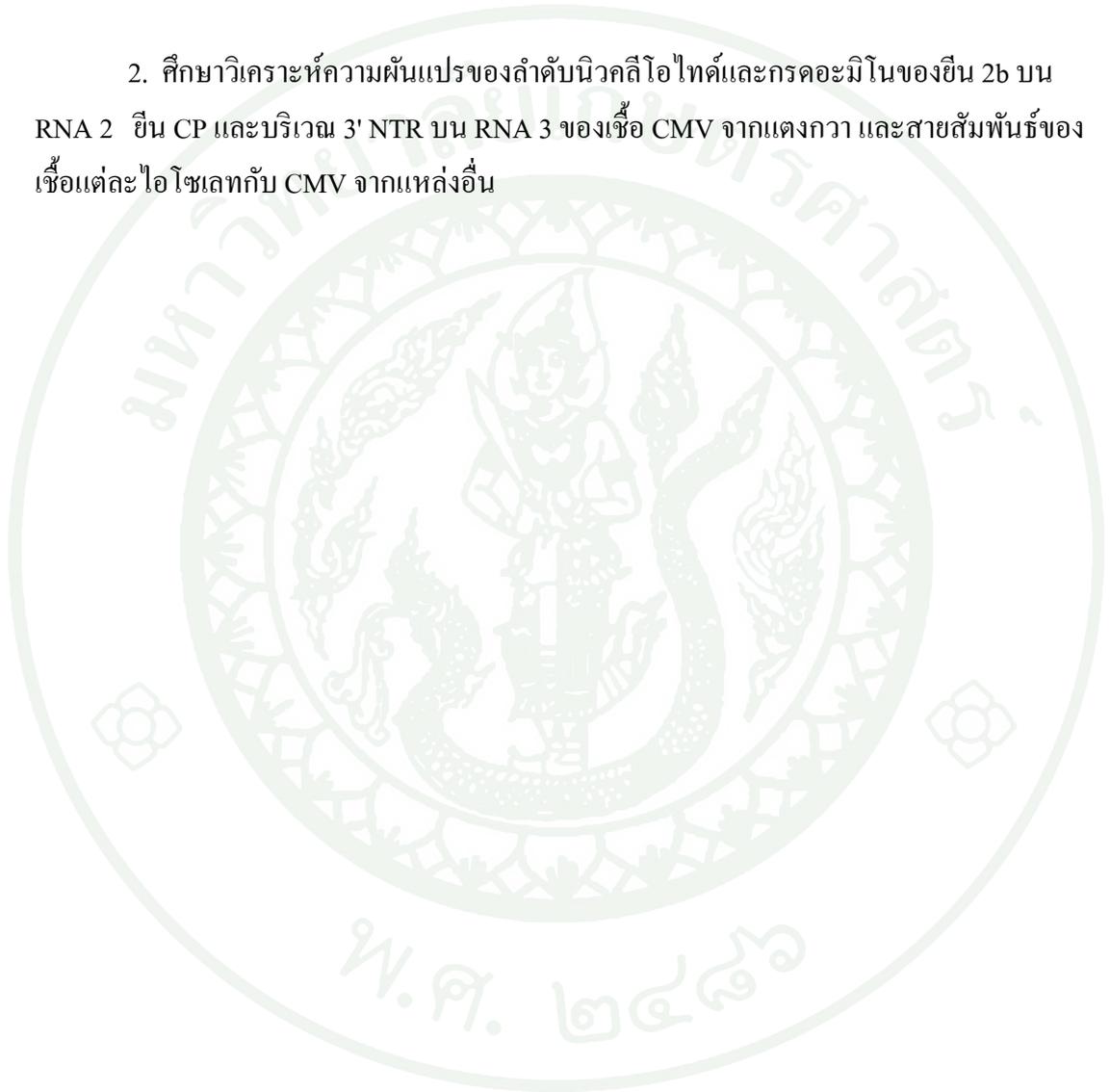
ไวรัสใบด่างแตงหรือ *Cucumber mosaic virus* (CMV) เป็นเชื้อไวรัสที่แพร่กระจายกว้างขวางทั่วทุกภูมิภาคของโลก และทำความเสียหายให้กับพืชกว่า 1,000 ชนิด ใน 85 วงศ์ โดยก่อให้เกิดความเสียหายกับพืชเศรษฐกิจจำนวนมากทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยว พืชใบเลี้ยงคู่ เช่น แตงกวา ขึ้นฉ่าย ถั่วพุ่ม ผักกาดหอม พริก มะเขือเทศ กัญชง และไม้ประดับ เป็นต้น โดยจะทำให้พืชแสดงอาการใบด่าง เจริญเติบโตผิดปกติ ใบไหม้ ใบลิบเรียวเล็ก จุกดวงแหวน ใบสีเหลืองและแผลเนื้อเยื่อตายสีน้ำตาล เนื่องจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่และพืชอาศัยใหม่ได้ดี อีกทั้งยังสามารถถ่ายทอดโรคจากต้นที่เป็นโรคไปยังต้นปกติได้หลายวิธี เช่น การสัมผัสกันระหว่างพืช การถ่ายทอดด้วยแมลงพาหะจำพวกเพลี้ยอ่อนมากกว่า 75 ชนิด ในแบบ non-persistent หรือ stylet-borne พาหะที่สำคัญได้แก่ *Aphis gossypii* Glover. และ *Myzus persicae* Sulzer. เป็นต้น

การจำแนกสายพันธุ์ของ CMV อาจใช้ลักษณะอาการบนพืชอาศัย หรือใช้ความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาซึ่งในปัจจุบันแบ่ง CMV ออกเป็น 2 ซีโรกรุป และหากใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP สามารถแบ่งเชื้อ CMV ได้เป็น 3 subgroups ได้แก่ subgroup IA , subgroup IB และ subgroup II นอกจากนี้มีการนำเทคนิค PCR-RFLP และเทคนิค microarray มาใช้ศึกษาความหลากหลายหรือความผันแปรของสายพันธุ์เชื้อ CMV การศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายหรือความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสมีประโยชน์ต่อการศึกษาเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างไวรัสกับพืช ไวรัสกับเพลี้ยอ่อนที่เป็นพาหะ การแพร่ระบาดของไวรัส รวมทั้งวิวัฒนาการของเชื้อ

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงได้ศึกษาความหลากหลายทางชีววิทยาเกี่ยวกับอาการบนพืชอาศัย และพันธุกรรมของเชื้อ CMV ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้าน รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ CMV ที่พบในแหล่งต่างๆ จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน เพื่อที่นักปรับปรุงพันธุ์พืชสามารถนำข้อมูลเหล่านั้นไปประยุกต์ใช้เพื่อพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ CMV ที่เหมาะสมสำหรับการคัดเลือกพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์แตงกวาให้ต้านทานต่อโรค

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อ CMV ที่เกี่ยวกับสมบัติทางชีววิทยา ได้แก่ ลักษณะอาการของโรคบนพืชอาศัยและพันธุกรรมของเชื้อ
2. ศึกษาวิเคราะห์ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน 2b บน RNA 2 ยีน CP และบริเวณ 3' NTR บน RNA 3 ของเชื้อ CMV จากแตงกวา และสายสัมพันธ์ของเชื้อแต่ละไอโซเลทกับ CMV จากแหล่งอื่น



## การตรวจเอกสาร

### 1. ไวรัสใบด่างแดง (*Cucumber mosaic virus*)

ไวรัสใบด่างแดงหรือ *Cucumber mosaic virus* (CMV) มีรายงานพบครั้งแรกในแตงกวา (*Cucumis sativus* L.) ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อปี ค.ศ. 1916 (Doolittle, 1916) เชื้อแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางทั่วทุกภูมิภาคของโลก และทำความเสียหายแก่พืชกว่า 1000 ชนิด ใน 85 วงศ์ ทั้งพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ (Roossinck, 2001) Gallitelli (2000) รายงานว่า CMV เป็นเชื้อไวรัสที่สำคัญที่ก่อให้เกิดโรคกับพืชเศรษฐกิจหลายชนิดเช่น แตงต่าง ๆ ขึ้นฉ่าย ถั่วพุ่ม ผักกาดหอม พริก มะเขือเทศ กัญชง และไม้ประดับ เป็นต้น สำหรับประเทศอาร์เจนตินา จีน โครเอเชีย ฝรั่งเศส อิตาลี กรีซ อิสราเอล อิตาลี ญี่ปุ่น โปแลนด์ โปรตุเกส สเปน สวีเดน และ อเมริกา ได้จัดให้ CMV เป็นเชื้อที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุด ส่วนในประเทศไทยจัดเป็นเชื้อที่มีความสำคัญอันดับต้นๆ ที่ทำความเสียหายให้กับพืชเศรษฐกิจ

ในประเทศแถบเมดิเตอร์เรเนียน CMV ก่อความเสียหายในบริเวณที่มีการปลูกเมลอนและพริก โดยเกิดความเสียหายประมาณ 30- 100% (Gallitelli, 2000) ในปี ค.ศ. 1972 มีการรายงานความเสียหายของมะเขือเทศที่เกิดจาก CMV ซึ่งทำให้มะเขือเทศเกิดอาการแผลสีน้ำตาล (necrosis) ในเมือง Alsace ประเทศฝรั่งเศส และในปี ค.ศ. 1987 มีการรายงานความเสียหายของผลผลิตมะเขือเทศมากถึง 100% ในประเทศอิตาลีและสเปน (Jorda *et al.*, 1992)

Fletcher *et al.* (1999) รายงานความเสียหายของผลผลิตถั่ว lentil (*Lens culinaris* L.) และถั่ว lupin ในประเทศออสเตรเลียที่ผลผลิตลดลง 15-19% อันเนื่องมาจากการติดเชื้อ CMV ที่ถ่ายทอดผ่านเมล็ด Gillaspie *et al.* (1997) รายงานความเสียหายของผลผลิตถั่วพุ่ม เมื่อปี ค.ศ. 1994 ที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อ CMV subgroup I ในรัฐจอร์เจีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ทำให้ผลผลิตลดลงถึง 37% Gallitelli (2000) รายงานว่า เชื้อ CMV ที่ก่อโรคกับพืชนั้นส่วนใหญ่ 80% เป็นเชื้อ CMV subgroup I นอกจากนี้พบว่า CMV สามารถก่อโรคร่วมกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นได้ในพืชตระกูลแตง เช่น *Alfalfa mosaic virus* , *Tomato spotted wilt virus* และ *Zucchini yellow mosaic virus*

ในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อ CMV ในปี พ.ศ. 2517 โดยพริกที่เป็นโรคแสดงอาการใบด่าง ซึ่งมีการแพร่ระบาดและทำความเสียหายให้กับการผลิตพริกในแหล่งปลูกทั่วไป เช่นที่แขวงคลังชั้น และบางแค จ.กรุงเทพฯ และที่ อ. ดำเนินสะดวก และโพธาราม จ.ราชบุรี (ธีระ, 2532) วันพีญและนวลจันทร์ (2523) พบการเข้าทำลายของเชื้อ CMV ในมะเขือเทศพันธุ์ L22 และ VF145 ในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง และหนองคาย

กลุ่มงานไวรัสของกรมวิชาการเกษตร ได้สำรวจโรคพริกที่เกิดจากเชื้อไวรัสใน 13 จังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกพริกขนาดใหญ่ พบว่ามีเชื้อไวรัสหลายชนิดแพร่ระบาดในทุกแหล่งปลูกโดยอัตราการเป็นโรคอยู่ระหว่าง 10-100% และโรคที่เกิดจากเชื้อ CMV มีอัตราสูงสุดถึง 56.96% (เกรือพันธุ์และคณะ, 2536)

ยุทธและเพชรรัตน์ (2551) รายงานว่า ในช่วงปี 2549-2550 พบการเข้าทำลายของเชื้อ CMV ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชตระกูลแตงในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

## 2. ลักษณะของเชื้อและโครงสร้างโมเลกุลของสารพันธุกรรม

เชื้อ CMV จัดอยู่ในตระกูล *Cucumovirus* วงศ์ *Bromoviridae* มีอนุภาคเป็นรูปทรงกลมหลายเหลี่ยม (icosahedral) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 29 นาโนเมตร อนุภาคประกอบด้วยกรดนิวคลีอิกคิดเป็นสัดส่วน 18 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบของอนุภาค สารพันธุกรรมหรือจีโนมเป็นไรโบนิวคลีอิกชนิดสายเดี่ยว (single-strand RNA) แบบ positive sense มี 3 โมเลกุล เรียกชื่อว่า RNA 1 , RNA 2 และ RNA 3 แต่ละโมเลกุลจะแยกกันอยู่ในแต่ละอนุภาค (Roossinck, 2001) สัดส่วนของเบสบนนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมแบ่งเป็น adenine (A) 23 เปอร์เซ็นต์ guanine (G) 24 เปอร์เซ็นต์ cytosine (C) 23 เปอร์เซ็นต์ และ uracil (U) 30 เปอร์เซ็นต์ (Brunt *et al.*, 1996) รหัสพันธุกรรมทั้งหมดนี้แปลเป็นโปรตีนได้รวม 5 ชนิด ดังต่อไปนี้ (Roossinck, 2001)

RNA 1 มี 3,357 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสให้โปรตีนที่เรียกว่า 1a protein มีน้ำหนักโมเลกุล 110 กิโลดาลตัน (kDa) เป็นเอนไซม์ methyltransferase และ helicase ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการจำลองตัวของไวรัส

RNA 2 มี 3,050 นิวคลีโอไทด์ แบ่งเป็น 2 ยีน แพลรหัสให้โปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ 2a protein มีน้ำหนักโมเลกุล 98 kDa ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ RNA polymerase ที่มีลำดับกรดอะมิโน GDD ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ที่พบในเอนไซม์ RNA polymerase ของไวรัสหลายชนิด (Gallitelli, 2000) ส่วนโปรตีนชนิดที่ 2 ได้แก่ 2b protein แพลรหัสมาจาก subgenomic RNA ขนาด 689 นิวคลีโอไทด์ ที่อยู่บริเวณปลาย 3' ของ RNA 2 (RNA 4A) (Roossinck, 2002) แพลรหัสให้โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 11-13 kDa ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมความรุนแรงของอาการของโรคและยับยั้งกระบวนการ gene silencing ของพืช

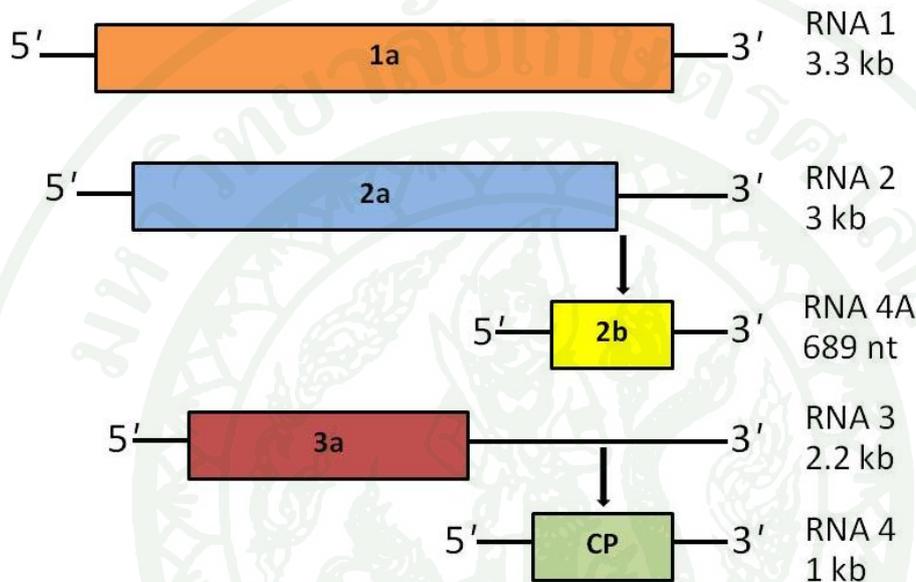
RNA 3 มี 2,216 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 2 ยีน ได้แก่ยีนที่แปลรหัสให้โปรตีน 3a หรือ movement protein มีน้ำหนักโมเลกุล 30 kDa ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของไวรัสในพืช อีกหนึ่งยีนอยู่ก่อนไปทางด้านปลาย 3' มีขนาด 1,031 นิวคลีโอไทด์ ใช้สังเคราะห์ subgenomic RNA ของ RNA 3 เรียกว่า RNA 4 และแปลรหัสให้โปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein, CP) มีน้ำหนักโมเลกุล 24 kDa ทำหน้าที่ห่อหุ้มจีโนมแต่ละโมเลกุลและทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของไวรัสในพืช การถ่ายทอดไวรัสโดยเปลี่ยอ่นรวมทั้งลักษณะอาการและความจำเพาะต่อพืชอาศัย (Roossinck, 2002)

บริเวณปลาย 5' ของ RNA ทุกสายจะพบโครงสร้างเป็นแบบ  $m^7G^5ppp^5'$  capped (Liu *et al.*, 2002) ส่วนทางด้านปลาย 3' จะพบโครงสร้างแบบ tRNA-like structure (Roossinck, 2001) นอกจากนี้เชื้อ CMV บางสายพันธุ์มี satellite RNA (satRNA) ซึ่งเป็น RNA สายสั้นขนาดประมาณ 335-405 นิวคลีโอไทด์ที่ไม่แปลรหัสให้โปรตีน และถูกห่อหุ้มไว้ด้วยโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค CMV เช่นเดียวกับจีโนมอื่น (Gallitelli, 2000) satRNA มีบทบาทต่อการพัฒนาอาการของโรคโดยอาจลดความรุนแรงของโรคหรือชักนำให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรงมากขึ้น (Kim *et al.*, 2004)

### 3. สมบัติทางกายภาพและความคงทนในน้ำคั้นของอนุภาคไวรัส

อนุภาคของ CMV มีค่า sedimentation coefficient เท่ากับ 99s ความหนาแน่นของการลอยตัวในซีเซียมคลอไรด์ (CsCl) เท่ากับ  $1.367 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  และมีค่า pI (isoelectric point) เท่ากับ 5.5 ค่า Extinction coefficient ที่ 260 nm ( $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 1cm light path) เท่ากับ 5.0 และค่าสัดส่วนการดูดกลืนแสงที่  $A_{260}/A_{280}$  เท่ากับ 1.7 (Brunt *et al.*, 1996)

เชื้อ CMV ทนต่อความร้อน (thermal inactivation point, TIP) ที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลานาน 10 นาที มีค่าอัตราเจือจางสูงสุด (dilution end point, DEP) ที่ยังก่อให้เกิดโรคได้ที่ 1:10,000 และมีความคงทนในสภาพอุณหภูมิห้อง (Longevity in vitro, LIV) นาน 14 ชั่วโมง (ซีระ, 2532; Brunt *et al.*, 1996)



ภาพที่ 1 โครงสร้างจีโนม (genomic RNA) ของเชื้อ CMV ซึ่งเป็น positive-sense RNA 3 สาย ได้แก่ RNA1, 2, 3 ขนาด 3.3, 3 และ 2.2 กิโลเบส (kb) ตามลำดับ และ subgenomic RNA 2 สาย ได้แก่ RNA4 และ 4A ขนาด 689 และ 1,000 นิวคลีโอไทด์ (nt) ตามลำดับ กรอบสี่เหลี่ยมสีต่าง ๆ แสดงบริเวณของสายพันธุกรรมที่แปลรหัสเป็นโปรตีน ตัวเลขและอักษรกำกับในกรอบสี่เหลี่ยมแสดงชื่อเรียกของโปรตีน

#### 4. ลักษณะอาการบนพืชอาศัยชนิดต่างๆ

อาการของพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส CMV เข้าทำลายจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของพืช สำหรับแตงกวาจะเริ่มจากอาการใบด่างแบบไม่มีขอบเขตชัดเจน (mottle) ร่วมกับอาการใบบิด โดยเฉพาะส่วนขอบใบ อาการดังกล่าวพบหลังจากได้รับการปลูกเชื้อแล้ว 4-5 วัน ขึ้นกับสภาพอุณหภูมิและธาตุอาหารที่พืชได้รับ ต่อมาอัตราการเจริญลดต่ำลง พันธุ์ที่อ่อนแอจะหยุดการเจริญข้อสั้น ใบมีขนาดเล็กลง การแตกแขนงน้อย รวมถึงมีดอกจำนวนน้อยลง ใบแก่จะมีสีเหลือง และมี

เนื้อเยื่อตายในส่วนขอบใบแล้วลามจนถึงตายทั้งใบ ผลมีขนาดเล็ก บิดเบี้ยว มีอาการด่างเป็นจุดๆ และมีริ้วชม (Agrios, 2005)

Sulistyowati (2004) รายงานลักษณะอาการบนพืชทดสอบ 2 ชนิดที่ได้รับเชื้อ CMV 6 ไอโซเลทจากออสเตรเลีย ได้แก่ 207, 237, 241, 242, 243 และ Twa โดยพบว่าแตงกวาพันธุ์ Green Gum แสดงอาการใบด่างแบบไม่ชัดเจน (mild mosaic) ร่วมกับอาการเส้นใบใส (vein clearing) ข้าวโพดหวาน (sweet corn) ที่ได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท 207 และ 237 แสดงอาการใบขีดเหลือง (chlorotic streak) ไปตามความยาวของใบข้าวโพด ส่วนไอโซเลท 245 (Q strain) ทำให้เกิดอาการแผลจุดเฉพาะบนใบข้าวโพดที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ในประเทศไทย มณีรัตน์และรัชนี (2547) ศึกษาลักษณะอาการบนพืชทดสอบชนิดต่างๆ ที่ได้รับเชื้อ CMV จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 3KCu จากแตงกวา ไอโซเลท 3STb จากยาสูบ *Nicotiana tabacum* ไอโซเลท 1KDr จากลำโพง ไอโซเลท 30RS และ KB8 จากพริก พบอาการที่เกิดจากเชื้อ CMV ไอโซเลทที่นำมาศึกษามีดังนี้

*Gomphrena globosa* แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลบนใบที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย CMV ไอโซเลท 3STb 30RS และ KB8 ส่วนไอโซเลท 3KCu และ 1KDr ทำให้เกิดอาการแผลไหม้แบบแพร่กระจายบนใบและลำต้นเมื่อได้รับเชื้อแล้ว 14-21 วัน

*Chenopodium amaranticolor* หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 2-3 วัน แสดงอาการจุดสีเหลืองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-0.5 มิลลิเมตร เฉพาะบนใบที่ได้รับเชื้อ CMV ทุกไอโซเลท ต่อมาหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 8-9 วันแผลแห้งเป็นสีน้ำตาล มีขนาดประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร

*Vigna sinensis* แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลขนาดเล็กบนใบเลี้ยงที่ได้รับการปลูกเชื้อแต่ละไอโซเลทแล้ว 2-3 วัน

*Cucurbita moschata* พันธุ์ Burpee hybrid zucchini หลังจากได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท 3KCu แล้ว 7-8 วัน เกิดแผลจุดสีเหลืองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร เฉพาะใบเลี้ยงที่ปลูกเชื้อ แต่ไม่พบอาการผิดปกติบนใบจริงที่เกิดใหม่ ส่วนต้นที่ได้รับเชื้อไอโซเลท 3STb, 1KDr และ

KB8 เกิดแผลจุดสีเหลืองบนใบจริงที่เกิดใหม่ ต่อมาแผลจุดขยายขนาดและใบแสดงอาการต่างเหลือง ใบหย่นและมีรูปร่างผิดปกติ ลำต้นแคระแกร็น

*Capsicum annuum* พันธุ์บางช้าง หลังจากได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท 3KCu, 3STb, 1KDr และ 30RS เป็นเวลา 14-16 วัน แสดงอาการใบด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนที่ใบยอด ต่อมาเกิดอาการต่างแพร่กระจายทั่วต้น เชื้อไอโซเลท KB8 ทำให้เกิดอาการแผลจุดใหม่บนใบและ ลำต้นของพริก แต่ไม่พบอาการผิดปกติบนผลพริกจากทุกไอโซเลท

*Solanum lycopersicum* พันธุ์สีดาทิพย์ 3 หลังจากได้รับเชื้อประมาณ 14-21 วัน พบอาการใบยอดด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ต่อมาอาการต่างแพร่กระจายทั่วต้น สำหรับไอโซเลท 30RS และ KB8 ทำให้เกิดอาการใบลิบเรียวเล็กลักษณะคล้ายใบเฟิร์นและต้นแคระแกร็น แต่ไม่พบอาการผิดปกติบนผลมะเขือเทศ

*Datura metel* หลังจากได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท 3KCu, 1KDr และ 30RS แล้วประมาณ 6-7 วัน ใบที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบยอดด่าง ห่อม้วน ลิบเรียวเล็ก ต้นแคระแกร็น

ยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi หลังจากได้รับเชื้อไวรัส CMV ไอโซเลท 3KCu, 3STb, 30RS หรือ KB8 แล้ว 6-7 วัน แสดงอาการใบยอดด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ต้นแคระแกร็น ส่วนต้นที่ได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท 1KDr แล้ว 4 วัน เกิดแผลจุดสีเหลืองกระจายทั่วไปที่ปลูกเชื้อ ต่อมาแผลจุดขยายขนาดทำให้ใบไหม้และหลุดร่วง ใบยอดแสดงอาการต่าง มีรูปร่างผิดปกติ

ยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ White Burley หลังจากได้รับเชื้อไวรัส CMV ไอโซเลท 3KCu, 3STb, 1KDr, 30RS หรือ KB8 แล้ว 6-7 วัน ใบยอดแสดงอาการด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ต่อมาเกิดอาการใบด่างแพร่กระจายทั่วต้น ใบมีรูปร่างผิดปกติและหย่น ต้นแคระแกร็น

## 5. การถ่ายทอดเชื้อ CMV

เชื้อ CMV ถ่ายทอดได้ด้วยวิธีกลและง่ายต่อการถ่ายทอดโรคโดยการสัมผัส โดยพบว่าภายในเซลล์ชั้นใบของแตงกวาที่เป็นโรคมียูเชื้อ CMV ในปริมาณมาก เชื้อ CMV ถ่ายทอดได้โดยแมลงจำพวกเพลี้ยอ่อนมากกว่า 75 ชนิด ความสัมพันธ์ของเชื้อ CMV และเพลี้ยอ่อนพาหะเป็นแบบ



## 6. การจำแนกสายพันธุ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ CMV

### 6.1 การจำแนกสายพันธุ์จากลักษณะอาการบนพืชอาศัย

Wahyuni *et al.* (1992) ศึกษาอาการของพืชทดสอบหลังจากได้รับเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ที่อยู่ใน subgroup I และ subgroup II พบว่า ยาสูบ *Nicotiana tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc ที่ได้รับเชื้อ CMV subgroup II จะแสดงอาการใบด่างสีเหลืองซีด (chlorotic mosaic) และเสียวรูปร่าง ส่วนอาการหลังจากที่ได้รับ CMV subgroup I ส่วนใหญ่เป็นอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน (green mosaic) และเสียวรูปร่าง จึงสามารถใช้พืชดังกล่าวระบุความแตกต่างระหว่างเชื้อ CMV ทั้งสอง subgroup ได้

Cillo (1994) จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อ CMV จำนวน 3 สายพันธุ์ในประเทศอิตาลี โดยอาศัยลักษณะอาการที่แตกต่างกันบนมะเขือเทศ ได้แก่ CMV-PG ทำให้ต้นมะเขือเทศตาย (lethal necrosis) ส่วน CMV-Tfm ทำให้เกิดแผลสีน้ำตาลบนผล (fruit necrosis) และ CMV-TTS ทำให้ต้นมะเขือเทศแสดงอาการยอดแคระแกร็น (top stunting)

Choi *et al.* (2004) รายงานการจำแนกสายพันธุ์เชื้อ CMV จากความแตกต่างของอาการที่เกิดบนพืชอาศัย โดยปลูกเชื้อ CMV-Sa ที่ก่อโรคใน water chickweed ลงบน *Physalis floridana*, *Tetragonia expansa* และ *Nicotiana rustica* โดยใช้เชื้อ CMV-Mf ซึ่งจัดอยู่ใน subgroup I และ CMV-PaFM ซึ่งจัดอยู่ใน subgroup II เป็นเชื้อเปรียบเทียบ (control) ซึ่งปรากฏว่าเชื้อ CMV-Sa ทำให้พืชที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการใบด่างเหมือนกับเชื้อ CMV-Mf ในขณะที่เชื้อ CMV-PaFM ไม่ทำให้พืชทดสอบดังกล่าวแสดงอาการใบด่าง

### 6.2 การจำแนกสายพันธุ์จากสมบัติด้านซีรัมวิทยา

Wahyuni *et al.* (1992) ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการจำแนกเชื้อไวรัส CMV สายพันธุ์ Ywa ที่แยกได้จากถั่ว lupin ในประเทศออสเตรเลีย ด้วยวิธี gel immunodiffusion test พบว่าเส้น precipitin line เกิดลักษณะ spur line แต่ไม่สามารถจำแนก subgroup ได้ เมื่อใช้ โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ subgroup ของไวรัส CMV (Porta *et al.*, 1989) พบว่าสายพันธุ์ Ywa อยู่ใน subgroup II

Choi *et al.* (2004) จำแนกสายพันธุ์ CMV ด้วยเทคนิค gel immunodiffusion test พบว่า CMV-Sa และ CMV-Mf เหมือนกัน เนื่องจากเส้น precipitin line มาบรรจบกัน ในขณะที่พบว่า ปฏิกิริยาจากเชื้อ CMV-Sa และ CMV-PaFM นั้นทำให้เส้น precipitin line เกิดเป็นลักษณะ spur line แสดงให้เห็นว่าสองสายพันธุ์นี้มีความแตกต่างกัน

### 6.3 การจำแนกสายพันธุ์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

Roossinck *et al.* (2001) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ ยีน CP และส่วนที่ไม่แปลรหัสด้านปลาย 5' (5' NTR) ของ RNA 3 ของเชื้อ CMV จำนวน 26 สายพันธุ์ ทำให้สามารถแยกเชื้อ CMV ออกได้เป็น 3 subgroups ได้แก่ subgroup IA, IB และ II

เชื้อ CMV ที่อยู่ต่าง subgroup กันมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 75% (Moury, 2004; Verma *et al.*, 2006) ส่วนเชื้อ CMV ที่จัดอยู่ใน subgroup IA และ subgroup IB มีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 92-95% (Roossinck, 2002; Aramburu *et al.*, 2007) ทั้งนี้เชื้อ CMV สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่พบในประเทศแถบทวีปเอเชีย (Asian strain) ส่วนใหญ่จัดอยู่ใน subgroup IB (Gallitelli, 2000; Moury, 2004; Verma *et al.*, 2006)

Srivastava and Raj (2004) ศึกษาเชื้อไวรัส CMV ที่แยกได้จาก *Amaranthus tricolor*, *Datura innoxia* และ *Hyoscyamus muticus* ในประเทศอินเดีย โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CP พบว่าเหมือนกับยีนของเชื้อ CMV subgroup IB ที่ระดับ 95

Bashir *et al.* (2006) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CMV ที่แยกได้ในประเทศอิหร่าน ตรงบริเวณยีน CP และปลายสาย RNA3 ด้าน 5' จำนวน 79 นิวคลีโอไทด์ และปลาย 3' จำนวน 105 นิวคลีโอไทด์ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ CP และส่วน 3' NTR ทำให้จำแนกเชื้อได้เป็น subgroup IA แต่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ 5' NTR มีความผันแปรมากและไม่สามารถนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์

Verma *et al.* (2006) ศึกษาเชื้อ CMV-Gera ที่แยกได้จาก *Pelargonium spp.* ในประเทศอินเดีย โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CP พบว่าเหมือนกับเชื้อ CMV สายพันธุ์ที่จัดไว้ใน subgroup II ที่ 98-99% และ 96-99% ตามลำดับ แต่เหมือนกับเชื้อ CMV subgroup IA และ IB ที่ 75-77% และ 74-78% ตามลำดับ

#### 6.4 การจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

Kim *et al.* (2002) จำแนกเชื้อ CMV-PaFM1 ที่แยกจากพริกด้วยการนำผลผลิตดีเอ็นเอของยีน CP จากการทำ RT-PCR มาย่อยด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 7 ชนิด ได้แก่ *AvaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HincII*, *HindIII*, *SaI* และ *XhoI* และเปรียบเทียบกับ CMV-Mf (subgroup I) และ CMV-LS (subgroup II) ปรากฏว่าแบบแผนการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะทั้ง 7 ชนิดของดีเอ็นเอที่ได้จากเชื้อ CMV-PaFM1 เหมือนกับ CMV-LS จึงสรุปว่าเชื้อ CMV-PaFM1 จัดอยู่ใน subgroup II

Srivastava and Raj (2004) ทำการทดลองย่อยดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน CP ของ CMV-A, CMV-Dat และ CMV-H ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *AluI* และ *RsaI* พบว่าดีเอ็นเอจากทุกไอโซเลทมีแบบแผนการตัดคล้ายกับ CMV-P ที่จัดอยู่ใน subgroup IB

Bashir *et al.* (2006) จำแนกเชื้อ CMV จำนวน 9 ไอโซเลทที่ได้จากพืชตระกูลแตงในประเทศอิหร่าน โดยการย่อยดีเอ็นเอผลผลิตจากยีน CP ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *MspI* ปรากฏว่าไอโซเลท B13, B23, B5, SH5, SH 17, S342 และ S337 มีแบบแผนการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะคล้ายกับ CMV-Rs ใน subgroup I ส่วนไอโซเลท SH12 และ B7 มีแบบแผนการตัดคล้ายกับ CMV-Q ใน subgroup II

Parrella and Sorrentino (2009) ทดลองย่อยดีเอ็นเอบริเวณด้านปลาย 3' ของยีน CP ขนาดประมาณ 500 คู่เบส ของเชื้อ CMV-PAE1 จากเสาวรสพันธุ์สีม่วงในประเทศอิตาลี ด้วยเทคนิค RT-PCR-RFLP แบบเสมือนจริงโดยใช้โปรแกรม pDRAW32 วิเคราะห์การใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด ได้แก่ *EcoRI*, *HapII* และ *HindIII* พบว่ามีแบบแผนการตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะเหมือนกับ CMV-Q ใน subgroup II จากแบบแผนนี้สามารถจัด CMV-PAE1 อยู่ใน subgroup II

#### 6.5 การจำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค Microarray

Deyong *et al.* (2005) จำแนก subgroup ของเชื้อ CMV จำนวน 14 ไอโซเลทด้วยเทคนิค microarray printing โดยใช้โพรบติดตามที่จำเพาะต่อ subgroup I, IA, IB และ II ปรากฏว่า subgroup IA ประกอบด้วยไอโซเลท RT52 และ RT88 ส่วน subgroup IB ประกอบด้วยไอโซเลท 20RT06, RT54, P3613, CN03, AN, TR15 และ KS44 สำหรับ subgroup II ประกอบด้วยไอโซเลท

RT68, PV0418, RT67 และ PV04 สำหรับไอโซเลท RT114 ไม่ทำปฏิกิริยากับโพรบติดตามที่จำเพาะต่อ subgroup IA และ IB แต่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับโพรบติดตามที่จำเพาะต่อ subgroup I เท่านั้น

## 6.6 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ CMV

Blanchard *et al.* (1996) พบความแตกต่างของส่วนปลายสายทางด้าน 3' NTR ของ RNA 1-4 ที่มีจำนวนนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ไม่เท่ากัน เช่น พบว่า RNA 1 และ 2 ของ CMV สายพันธุ์ Q มีบริเวณอนุรักษ์อยู่ 307 นิวคลีโอไทด์ ส่วน RNA 3 และ 4 มีบริเวณอนุรักษ์อยู่ 304 นิวคลีโอไทด์

Gaacia-Arenal *et al.* (2000) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ sat-RNA ของเชื้อ CMV ในประเทศสเปน จากผลการศึกษาพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ sat-RNA มีความผันแปรทางพันธุกรรมอย่างมากในกลุ่มประชากรของเชื้อ CMV แม้ว่าจะเป็นเชื้อที่ได้มาจากแหล่งปลูกช่วงเวลาและพืชอาศัยชนิดเดียวกัน

Roossinck (2002) นำเอานิวคลีโอไทด์ด้านปลาย 3' NTR ของ RNA ทุกโมเลกุลของ CMV จำนวน 15 ไอโซเลทมาเปรียบเทียบกันพบว่าเป็นบริเวณที่มีการอนุรักษ์สูง เนื่องจากบริเวณนี้มีส่วนที่เป็น promoter สำหรับเอนไซม์ replicase ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการ replication

Lin *et al.* (2004) ทำการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัส CMV ที่พบในรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยแบ่งตัวอย่างเชื้อ CMV ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ group B เก็บจากพืชตระกูลแตงในแหล่งปลูกและในปีเดียวกัน ส่วน group B เก็บจากพืชต่างชนิดกันจากแหล่งปลูกหลายแห่งในช่วงปี 1985-1994 จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 2b ยีน MP และบริเวณ 3' NTR พบว่านิวคลีโอไทด์ทั้ง 3 ส่วนของ group B มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์น้อยกว่าของ group B โดยเฉพาะยีน 2b มีความผันแปรมากที่สุด สำหรับบริเวณ 3' NTR ของ group A พบความผันแปรน้อยกว่า group B ทั้งนี้ได้วิจารณ์ผลการศึกษเกี่ยวกับความผันแปรที่อาจจะเกิดขึ้นเนื่องมาจากชนิดของพืชอาศัย แหล่งปลูก และช่วงระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง CMV ใน group A ที่มีความผันแปรน้อยเป็นเชื้อที่มาจากแตงกวาในแหล่งปลูกเดียวกัน และใน

ระยะเวลาเดียวกัน ส่วน CMV ใน group B ซึ่งพบความผันแปรมากกว่า เป็นเชื้อที่เก็บมาจากพืชต่างชนิดกัน จากแหล่งปลูกและช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

## 7. กลไกความต้านทานของพืชต่อเชื้อ CMV

### 7.1 ความต้านทานต่อการเคลื่อนที่ของไวรัส

Kim and Palukaitis (1997) รายงานว่าความต้านทานต่อการเคลื่อนที่ของพืชเกิดขึ้นในลักษณะการเกิด hypersensitive response (HR) ซึ่งชักนำให้เกิดการตายของเซลล์พืชที่เรียกว่า programmed cell death และส่งผลต่อการเคลื่อนที่แพร่กระจายของไวรัสจากเซลล์พืชที่ได้รับเชื้อไวรัสไปยังเซลล์ข้างเคียง กรณีเชื้อ CMV-Fny พบว่ามีการชักนำให้ cowpea แสดงอาการแผลเนื้อเยื่อตาย (necrosis) หลังจากได้รับเชื้อ 24-36 ชั่วโมง และตรวจพบอาร์เอ็นเอของเชื้อ CMV เพียงเล็กน้อยในใบที่ได้รับการปลูกเชื้อ แต่ไม่พบอาร์เอ็นเอของเชื้อในใบที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

### 7.2 การยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอของไวรัสด้วยกลไก RNA silencing

กลไกการป้องกันตัวของพืชต่อเชื้อไวรัสแบบ RNA silencing ส่งผลให้พืชเกิดความต้านทานต่อโรค (Waterhouse *et al.*, 2001) เกิดขึ้นได้จากการที่สายนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ของพืชที่เรียกว่า short interference RNA หรือ siRNA (Finnegan and Matske, 2003) เข้าไปจับกับอาร์เอ็นเอของไวรัสตรงบริเวณที่เป็นคู่สมกันจนมีลักษณะเป็นสายคู่ ทำให้เกิดกระบวนการทำลายอาร์เอ็นเอสายคู่สั้นๆ และหลังจากเซลล์พืชเกิดภาวะติดเชื้อมีการส่งสัญญาณของความต้านทานนี้ไปทั่วทั้งต้นพืชในแบบ cell-to-cell และแบบ long distance ผ่านทางท่อลำเลียงอาหารของพืช (MacDiarmid, 2005)

## 8. การคัดเลือกพันธุ์พืชที่ต้านทานต่อเชื้อ CMV

Shubin (1995) คัดเลือกพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อเชื้อ CMV ไอโซเลต CMY-15 (Thai-strain) ที่แยกได้จากพริก จากพันธุ์ที่นำมาทดสอบจำนวน 14 สายพันธุ์ โดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีการกลบบนพริกจำนวน 12 ต้นต่อสายพันธุ์ แล้วประเมินความต้านทานโรคจากเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของพริก และค่า ELISA พบว่าพริกพันธุ์ VC 16a และ Sujiao#14 มีความต้านทานต่อเชื้อ CMV ไอโซเลต

CMY-15 โดยมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 2.33% และ 8.33% ตามลำดับ ส่วนอีก 12 พันธุ์ จัดเป็นพริกที่อ่อนแอต่อเชื้อ CMV นอกจากนี้ยังพบว่าความรุนแรงของอาการบนพริกมีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อในพริกซึ่งตรวจวัดได้จากค่า ELISA

Chiemsombat and Kittipakorn (1996) ทดสอบความต้านทานของพริกจำนวน 40 สายพันธุ์ ต่อเชื้อ CMV จำนวน 5 ไอโซเลทที่แยกจากพริก ได้แก่ ไอโซเลท CM1, 30RS, PJ15, UB50 และ KB8 โดยปลูกเชื้อ CMV แต่ละไอโซเลทด้วยวิธีกลบบนกล้าพริกจำนวน 20 ต้นต่อสายพันธุ์ แล้วประเมินความต้านทานด้วยเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคซึ่งตรวจสอบการติดเชื้อได้จากค่า ELISA พบว่าพริกทุกพันธุ์ติดเชื้อ CMV โดยที่พันธุ์ PBC 569-5 CVMV-R และ VC34A CVMV-R มีความต้านทานต่อเชื้อ CMV

Grube *et al.* (2000) ศึกษาความต้านทานของพริก *Capsicum frutescens* BG2814-6 ที่ได้จากการผสมตัวเองของพริก *C. frutescens* BG2814 โดยทำการปลูกเชื้อ CMV-V27 ด้วยวิธีกลบบนพริกพันธุ์นี้ในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่าพริก *C. frutescens* BG2814-6 มีความต้านทานต่อเชื้อ CMV-V27 โดยต้นพริกแสดงอาการของโรค 10 ต้นจาก 44 ต้น หลังปลูกเชื้อแล้ว 34 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับพริก *C. annuum* พันธุ์ Jupiter ที่แสดงอาการของโรคอย่างรุนแรงทุกต้นหลังจากได้รับเชื้อแล้ว 8 วัน

สุจินต์และคณะ (2551) ศึกษาคัดเลือกพันธุ์พริกที่ต้านทานต่อเชื้อ CMV จาก germplasm ของศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชผักเขตร้อน จำนวน 320 สายพันธุ์ในสภาพโรงเรือนทดลอง โดยการปลูกเชื้อ CMV-KPS10 ด้วยวิธีกลบบนต้นกล้าพริกแต่ละพันธุ์ ๆ ละ 10 ต้น ประเมินความต้านทานจากอัตราการเกิดโรคบนพริกและตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วย ELISA ผลการศึกษาพบพันธุ์พริกที่มีความต้านทานต่อเชื้อ CMV-KPS10 4 พันธุ์ ได้แก่ CA1369, CA1444, CCMV37 และ CCMV41

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. ไอโซเลทและแหล่งของเชื้อ CMV ที่นำมาศึกษา

#### 1.1 เชื้อ CMV ในตัวอย่างใบเตงกวาและแตงร้านจากแปลงปลูก

เก็บตัวอย่างใบเตงกวาและแตงร้าน (แตงกวาผลใหญ่) ที่แสดงอาการใบด่าง ใบบิดจากแปลงปลูกของเกษตรกรในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรี เพชรบุรี สระแก้ว ขอนแก่น มหาสารคาม หนองคาย อุดรธานี นครราชสีมาและเชียงใหม่ ใส่ตัวอย่างใบพืชในถุงพลาสติกและเก็บรักษาในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจหาเชื้อ CMV

#### 1.2 เชื้อ CMV ที่ได้รับความอนุเคราะห์

1.2.1 เชื้อ CMV ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. ประสาทพร สมิตะมาน ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งแยกเชื้อได้จากแตงกวา จำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท A168 จากจังหวัดลำปาง A27, BK16 และ C113 จากจังหวัดเชียงใหม่ โดยตัวอย่างที่ได้รับเป็นใบเตงกวาสดที่แสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน และใบเสี้ยวรูปทรง

1.2.2 เชื้อ CMV ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากคุณสุพรรณิ ชีววิริยะกุล บริษัทเซมินิส เวจ็ทเทเบิล ซีดส์ (ประเทศไทย) จำกัด ซึ่งแยกได้จากแตงกวา จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท CRI จากจังหวัดเชียงราย และไอโซเลท SNK จากจังหวัดสกลนคร ตัวอย่างที่ได้รับเป็นใบเตงกวาเป็นโรคที่เก็บรักษาไว้ในสภาพใบแห้ง

1.2.3 เชื้อ CMV ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. เพชรรัตน์ ธรรมเบญจผล ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แยกเชื้อได้จากเมลอน จำนวน 1 ไอโซเลทคือ ML25 เป็นเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในยาสูบ *N. tabacum*

1.2.4 เชื้อ CMV ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. สุจินต์ ภัทรภูวศล ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน แยกเชื้อได้จากพริก จำนวน 1 ไอโซเลท คือ KPS10 และเพิ่มปริมาณเชื้อ

ในยาสูบ *N. glutinosa* และอีก 1 ไอโซเลท คือ 30RS ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน เพิ่มปริมาณและเก็บรักษาเชื้อไว้ในมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 3

## 2. แอนติบอดี และเทคนิค Indirect PTA-ELISA ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อ CMV

ใช้ Anti CMV monoclonal antibody clone CM2 (MAb-CM2) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ MAb-CM2 มีค่าไตเตอร์เท่ากับ 80,000 จากการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส CMV ไอโซเลท 30RS บริสุทธิ์เข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเป็นแอนติบอดีที่สามารถทำปฏิกิริยาได้กับเชื้อ CMV ทั้ง subgroup I และ subgroup II (มณีรัตน์, 2547)

เทคนิค indirect PTA-ELISA มีขั้นตอนดังนี้ ใช้ใบพืชหนัก 0.1 กรัม บดให้ละเอียดใน carbonate coating buffer (0.05 M sodium carbonate , pH 9.6 ที่เติม 0.2% sodium diethyldithiocarbamate ก่อนใช้) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร คูลน้ำคั้นพืชใส่ในหลุม ELISA plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วเติม MAb-CM 2 (เข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน PBST ที่ผสม 2% skim milk) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBST 3 ครั้ง แล้วเติม goat anti-mouse conjugate ที่เจือจาง 1:30,000 เท่า (ใน PBST ที่ผสม 2% skim milk) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง และเติม substrate solution (10% diethanolamine, pH 9.8 ที่มี *p*-nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ด้วยเครื่อง Multiskan EX ELISA reader (Labsystems, Finland) ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

## 3. การปลูกเชื้อด้วยวิธีกล และการแยกเชื้อ CMV จากแตงกวาและแตงร้าน

การปลูกเชื้อ CMV ด้วยวิธีกล ทำโดยบดใบพืชที่มีเชื้อ CMV ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 ที่เติม 0.01 M sodium sulfite ก่อนใช้ ในอัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร โรยผงคาร์บอนร่นคัมลงบนใบพืชทดสอบที่จะปลูกเชื้อ แล้วทาน้ำคั้นลงบนใบพืชทดสอบให้ทั่วทั้งใบ เก็บต้นพืชไว้ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บันทึกอาการที่เกิดขึ้น

แยกเชื้อ CMV แต่ละไอโซเลท โดยนำใบพืชจากแปลงปลูกที่ตรวจพบเชื้อ CMV และที่ได้รับความอนุเคราะห์มาปลูกเชื้อลงบนยาสูบ *N. glutinosa* ด้วยวิธีกล จากนั้นปลูกเชื้อจากน้ำคั้นใบยาสูบที่คิดเชื้อลงบนใบเลี้ยงคู่แรกของต้นกล้าถั่วเขียว (*Vigna radiata*) อายุ 7 วัน เมื่อใบเลี้ยงของถั่วเขียวเกิดแผลจุดสีน้ำตาลแดงขนาดประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร ตัดเนื้อเยื่อใบถั่วเขียวบริเวณจุดแผลแต่ละจุดมาบดใน 0.1 M phosphate buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทาน้ำคั้นที่ได้ลงบนใบยาสูบ *N. glutinosa* อายุประมาณ 15-20 วัน เมื่อยาสูบ *N. glutinosa* แสดงอาการของโรคจึงนำมาตรวจสอบเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA และให้ชื่อแต่ละไอโซเลทของเชื้อ CMV ที่เพิ่มปริมาณได้ในต้นยาสูบดังกล่าว

#### 4. การศึกษาลักษณะอาการของโรคบนพืชทดสอบ

ปลูกเชื้อ CMV ด้วยวิธีกลจากใบยาสูบ *N. glutinosa* ที่มีเชื้อ CMV แต่ละไอโซเลทลงบนพืชทดสอบชนิดละ 10 ต้น เก็บต้นพืชทดสอบไว้ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส บันทึกลักษณะอาการที่เกิดขึ้นและตรวจสอบเชื้อ CMV ในต้นพืชที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA ภายหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 12 วัน ทั้งพืชที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการ

พืชทดสอบที่ใช้มี 13 ชนิด ได้แก่ คีโนโปเดียม *C. amaranticolor* ถั่วเขียว (*V. radiata*) พันธุ์ KPS2 ถั่วพุ่ม (*V. sinensis*) แตงกวา (*C. sativus*) พันธุ์พุ่มชบา เมลอน (*C. melo*) แคนตาลูป (*C. melo* var. *Cantalupensis*) พันธุ์ศรีทอง แตงโม (*Citrullus lanatus*) พันธุ์มรกตดำ มะเขือเทศ (*S. lycopersicum*) พันธุ์สีดาทิพย์ 4 พริก (*C. annuum*) พันธุ์หัวเรือ ยาสูบ *N. glutinosa* ยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc ถั่วโพรง (*D. metel*) และ โทงเทง (*Physalis angulata*)

#### 5. การศึกษาการเพิ่มปริมาณของเชื้อ CMV ในพืชอาศัยด้วยเทคนิค tissue print immunoblot assay

ปลูกเชื้อ CMV ด้วยวิธีกลลงบนยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc ระยะที่มีใบจริง 5 ใบ จำนวน 40 ต้น โดยบดใบยาสูบ *N. glutinosa* ที่มีเชื้อ CMV ในบัพเฟอร์สำหรับบด แล้วทาน้ำคั้นที่ได้ลงบนใบยาสูบพันธุ์ Xanthi-nc ที่อยู่เหนือโคนต้นขึ้นไป 3 ใบ หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 4 วัน ตรวจสอบการเพิ่มปริมาณและการแพร่กระจายของเชื้อ CMV โดยทยอยเก็บตัวอย่างใบยาสูบ 1 ใบ

จากยาสูบ 4 ต้น รวมเป็น 4 ตัวอย่างต่อวัน จนครบ 10 วัน และใช้เทคนิค tissue print immunoblot assay (TPIBA; Lee *et al.*, 2007) ในการตรวจสอบตามขั้นตอนดังนี้

นำแผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane; NCM) มาแช่ในสารละลาย 0.2 M CaCl<sub>2</sub> เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วผึ่งไว้ประมาณ 5 นาที นำใบยาสูบทั้งใบมากดลงบนแผ่น NCM จากนั้นแช่ NCM ในสารละลาย 3% skim milk นาน 30 นาที แล้วจึงแช่ในสารละลาย แอนติบอดี MAб-CM 2 เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินโดยแช่ NCM ในสารละลาย TBST (0.05% tween 20, tris-buffer saline) 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วนำมาแช่ในสารละลาย goat anti-mouse conjugate (Sigma) ที่เจือจางในอัตรา 1: 10,000 ด้วย TBST บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นล้าง NCM ด้วย TBST 3 ครั้ง แล้วนำมาแช่ใน substrate solution ที่เป็นส่วนผสมระหว่าง BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) และ NBT (nitroblue tetrazolium) บ่มนาน 10-30 นาทีในที่มืด จนเกิดตะกอนสีม่วงของปฏิกิริยาหยุดปฏิกิริยาโดยแช่ NCM ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที แล้วผึ่งให้แห้ง ศึกษาการเพิ่มปริมาณและการแพร่กระจายของเชื้อ CMV จากลักษณะของตะกอนสีม่วงที่ปรากฏบนแผ่น NCM

นำใบยาสูบที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค TPIBA แล้ว มาตรวจสอบปริมาณเชื้อ CMV ในใบพืชด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA อีกวิธีหนึ่งควบคู่กัน

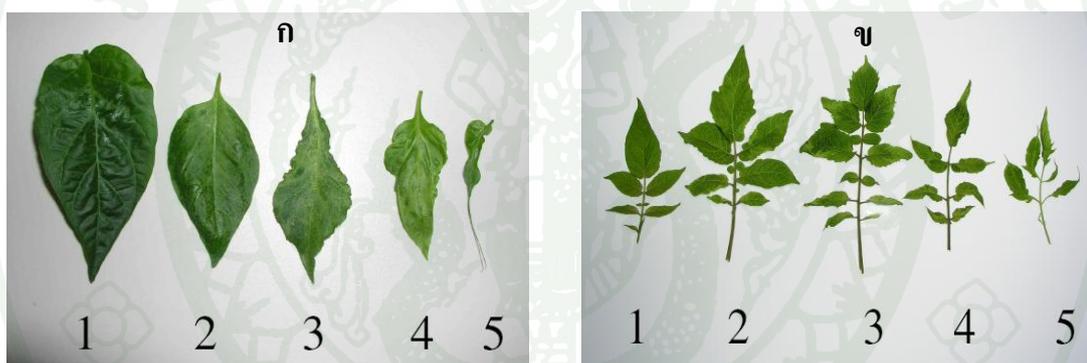
## 6. การตอบสนองของพืชและมะเขือเทศต่อเชื้อ CMV

ศึกษาการก่อโรคและการตอบสนองของพืชต่อเชื้อ CMV จำนวน 10 ไอโซเลทที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ เพื่อบ่งชี้ความหลากหลายทางชีววิทยาของ CMV จากลักษณะอาการของพืชที่ได้รับเชื้อแต่ละไอโซเลท ใช้พริกพันธุ์หัวเรือและมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 เป็นพืชทดสอบ เนื่องจากมีรายงานของสายพันธุ์ที่อ่อนแอต่อเชื้อซึ่งสามารถปลูกเชื้อ CMV และติดโรคได้ง่ายกว่า แดงกว่า เตรียมต้นกล้าพริกและมะเขือเทศระยะที่มีใบจริงประมาณ 4 ใบ ชนิดละ 10 ต้น เตรียมน้ำคั้นใบยาสูบที่ติดเชื้อ CMV แต่ละไอโซเลทเพื่อปลูกเชื้อด้วยวิธีการตามที่กล่าวแล้ว ทาน้ำคั้นใบยาสูบลงบนใบพริกหรือมะเขือเทศทุกใบ ล้างใบและเก็บต้นพืชในโรงเรือนกระจกควบคุมอุณหภูมิที่ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 วัน

เก็บข้อมูลของลักษณะอาการบนต้นพืช และให้คะแนนอาการของโรคในพืชทดสอบแต่ละต้นหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 20 วัน รวมทั้งตรวจสอบปริมาณเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA

เกณฑ์ให้คะแนนอาการของโรคบนพริกและมะเขือเทศ แบ่งเป็น 5 ระดับ ดังนี้ (ภาพที่ 2)

- |         |   |
|---------|---|
| คะแนน 1 | ไม่แสดงอาการหรือไม่พบเชื้อ                  |
| คะแนน 2 | ใบด่างแบบไม่ชัดเจน                          |
| คะแนน 3 | ใบด่างชัดเจน                                |
| คะแนน 4 | ใบด่างรุนแรงและเสียรูปทรง                   |
| คะแนน 5 | ใบด่างรุนแรงและมีลักษณะเรียวเล็กคล้ายเชื้อก |



ภาพที่ 2 อาการและระดับคะแนนของอาการที่เกิดจากเชื้อ *Cucumber mosaic virus* บนใบพริก (ก) และมะเขือเทศ (ข)

- |   |                              |
|---|------------------------------|
| 1: ใบไม่แสดงอาการหรือไม่พบเชื้อ           | 2: ใบด่างไม่ชัดเจน           |
| 3: ใบด่างและเสียรูปทรง                    | 4: ใบด่างรุนแรงและเสียรูปทรง |
| 5: ใบด่างรุนแรงและลดรูป ลักษณะคล้ายเชื้อก |                              |

ที่มา: Balci (2005)

## 7. การแยกเชื้อ CMV ให้บริสุทธิ์

เพิ่มปริมาณเชื้อ CMV แต่ละไอโซเลทโดยปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 14 วัน เก็บใบยาสูบมาล้างด้วยน้ำสะอาดผึ่งให้แห้ง แยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์โดยดัดแปลงวิธีการจาก Lot *et al.* (1972) การกวนและหมุนเหวี่ยงในแต่ละขั้นตอนทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บดใบยาสูบ 50 กรัม ใน grinding buffer (0.5 M sodium citrate buffer, pH 6.5 ที่เติม 0.5% thioglycolic acid ก่อนใช้) อัตราส่วนใบยาสูบ 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ปั่นในเครื่องปั่นที่แช่เย็น กรองน้ำคั้นด้วยผ้าขาวบางแล้วนำน้ำคั้นที่ได้ไปเติม chloroform ในน้ำคั้นในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร กวนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำน้ำคั้นมาหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนน้ำใสและเติม 10% polyethylene glycol (PEG) (M.W. 6,000) นำไปกวนเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที ละลายตะกอนใน suspending buffer (5 mM sodium borate buffer) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติม 2% triton x-100 แล้วนำไปกวนเป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 g เป็นเวลา 90 นาที ละลายตะกอนใน suspending buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เตรียม sucrose gradient ความเข้มข้น 5-25% (เตรียมข้ามคืน) ดูดสารละลายไวรัสปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ลงบนส่วนบนสุดของสารละลาย sucrose ในแต่ละหลอด นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 g เป็นเวลา 90 นาที ดูดสารละลายจากแถบไวรัส (viral zone) ไป dialyse ใน suspending buffer นานข้ามคืน โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ 20,000 g เป็นเวลา 90 นาที ละลายตะกอนใน suspending buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อคำนวณความเข้มข้นและค่าสัดส่วน  $A_{260}/A_{280}$  ของไวรัสที่เตรียมได้

$$\text{คำนวณค่าความเข้มข้นจากสูตร } C = \frac{A_{260}}{E} \text{ มก. / มล.}$$

ค่า E (extinction coefficient) ของเชื้อ CMV เท่ากับ 5.0 (Francki *et al.*, 1966)

ค่าสัดส่วน  $A_{260}/A_{280}$  มาตรฐานของเชื้อ CMV เท่ากับ 1.7 (Brunts *et al.*, 1996)

## 8. เทคนิค SDS-PAGE เพื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส

เตรียม polyacrylamide gel เข้มข้น 6% สำหรับ stacking gel และ 12% สำหรับ running gel เพื่อแยกขนาดของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสด้วยเทคนิค slab gel electrophoresis (Laemmli, 1970) เตรียมตัวอย่างโดยนำสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 2x loading buffer (0.1% bromophenol blue, 4% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol และ 0.5 M tris-HCl, pH 6.8) ปริมาตรเท่ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ครบเวลาแล้วแช่หลอดในน้ำแข็งทันที เป็นเวลา 5 นาที หยอดตัวอย่างที่อยู่ในหลอดทดสอบ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในช่อง stacking gel แล้วแยกขนาดโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้า 50 โวลต์ นาน 30 นาที จึงเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าเป็น 100 โวลต์ นาน 150 นาที เมื่อครบเวลาแล้วย้อมสีเจดด้วย staining solution (0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250 ที่ละลายใน 50% methanol และ 7% acetic acid) นาน 10 นาที ล้างเจดด้วย destaining solution (25% methanol และ 7% acetic acid) 2-3 ครั้ง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบขนาดของแถบโปรตีนที่พบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (protein molecular weight marker #SM0431; Fermentas)

## 9. เทคนิค dip preparation เพื่อตรวจสอบอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

หยดสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ที่เจือจาง 1: 10 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนกริดทองแดงที่เคลือบด้วยฟอรัมวาร์และคาร์บอน รอนาน 1 นาที จากนั้นล้างกริดด้วยน้ำกลั่นนาน 1 นาที ซับให้แห้ง ย้อมด้วยสารละลาย 2% uranyl acetate นาน 1 นาที ล้างกริดด้วยน้ำกลั่นแล้วซับให้แห้ง นำไปดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน และบันทึกภาพเพื่อวัดขนาดของอนุภาคไวรัส

## 10. การสกัดอาร์เอ็นเอ

### 10.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

ใช้วิธี CTAB method ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Chang *et al.* (1993) โดยชั่งตัวอย่างใบพืช 0.1 กรัม นำมาบดด้วยไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ย้ายส่วนของพืชที่บดแล้วใส่ลงใน

หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. ที่มี CTAB buffer (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM tris-HCl pH 8.0 และ 25 mM EDTA; อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสก่อนใช้) และ 2-mercapto ethanol) ปริมาตรรวม 630 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมน้ำ chloroform: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ แล้วเติมน้ำ 10M LiCl ปริมาตร 1/4 เท่าของส่วนใสนำไปบ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงหลอดส่วนผสมที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทส่วนใสทิ้ง จากนั้นเติมน้ำ SSTE (1M NaCl, 0.5% SDS, 1mM EDTA และ 10mM tris-HCl, pH 8.0; อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เติมน้ำ chloroform:isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตรเท่ากับสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติมน้ำ absolute ethanol ปริมาตรเท่ากับส่วนใส บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทสารละลายทิ้ง เติมน้ำ 70% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เท ethanol ทิ้ง ปล่อยให้ตะกอนแห้งแล้วละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นที่เติมน้ำ diethyl pyrocarbonate (DEPC) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้อาร์เอ็นเอที่ได้เป็นต้นแบบสำหรับปฏิกิริยา RT-PCR

## 10.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากอนุภาคไวรัส

สกัดอาร์เอ็นเอจากอนุภาคไวรัสที่เตรียมให้บริสุทธิ์โดยดัดแปลงจากวิธี phenol-chloroform extraction (Peden and Symons, 1973) ดูดสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์เข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ phenol ปริมาตรเท่ากับสารละลายไวรัส ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับหลอดๆมาประมาณ 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดส่วนใสปริมาตร 150 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่แล้วเติมน้ำ chloroform ปริมาตรเท่ากับสารละลาย ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่ แล้วตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย absolute ethanol บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย 70% ethanol ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เท ethanol ทิ้งแล้วปล่อยให้ตะกอนแห้ง

## 11. ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน 2b ยีน CP และ 3' NTR ของเชื้อ CMV

ออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้สังเคราะห์ยีน 2b ยีน CP และ 3' NTR (Lin *et al.*, 2003) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CMV subgroup I ไอโซเลท Fny (accession number D00355, RNA2; D10538, RNA3) และ subgroup II ไอโซเลท Q (accession numbers J02059, RNA3) (ตารางที่ 1) ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน 2b ของ subgroup I ประกอบด้วย 2bF และ 2bR ซึ่งตรงกับนิวคลีโอไทด์ของ RNA 2 ตำแหน่งที่ 2418-2438 และ 2798-2815 ตามลำดับ ไพรเมอร์ของยีน CP subgroup I ประกอบด้วย CMV-CPF และ CMV-CPR ซึ่งตรงกับนิวคลีโอไทด์ของ RNA 3 ตำแหน่งที่ 1245-1266 และ 1902-1922 ตามลำดับ ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์บริเวณ 3' NTR ของ subgroup I ประกอบด้วย 3' NTRF และ 3' NTRR ซึ่งตรงกับนิวคลีโอไทด์ของ RNA 3 ตำแหน่งที่ 1902-1922 และ 2161-2181 ตามลำดับ

การสังเคราะห์ยีน CP และ 3' NTR ของ subgroup II ใช้ไพรเมอร์ CMV-Q1 และ CMV-Q4 ซึ่งตรงกับนิวคลีโอไทด์ของ RNA 3 ตำแหน่งที่ 2170-2193 และ 1235-1256

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ยีน 2b , CP และ 3' NTR ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus*

Subgroup	ไพรเมอร์	ยีน	ขนาดยีน (nt)	ลำดับนิวคลีโอไทด์
I	2b-F	2b (RNA2)	392	5'-TTATGGAATTGAACGTAGGTG-3'
	2b-R			5'-AATACTGCCAACTCAGCTCCC-3'
	CPF	CP (RNA3)	678	5'-TTGAGTCGAGTCATGGACAAATC-3'
	CPR			5'-AACACGGAATCAGACTGGGAG-3'
	3' NTRF	3' NTR (RNA3)	278	5'-CTCCAGTCTGATTCCGTGTT-3'
	3' NTRR			5'-GCACCCGTACCCTGAAACTA-3'
II	Q1	CP+3' NTR (RNA3)	958	5'-CTCCTTATGGAGAACCTGTGTGGT-3'
	Q4			5'-TCTCCCAATGCTAGTAGAACCT-3'

## 12. ปฏิบัติการ One step RT-PCR

สังเคราะห์ชิ้น 2b, CP และ 3' NTR ของเชื้อไวรัส CMV จากอาร์เอ็นเอรวมที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสมของ one step RT-PCR (QIAGEN) ทำปฏิบัติการในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตรประกอบด้วย

nuclease free water	11.6	ไมโครลิตร
5x buffer	5.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	0.8	ไมโครลิตร
10 pmole forward primer	0.8	ไมโครลิตร
10 pmole reverse primer	0.8	ไมโครลิตร
enzyme mix	0.8	ไมโครลิตร
RNA template	2.0	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิบัติการในการสังเคราะห์ดังนี้

1) first strand synthesis	50 °C	30 นาที
pre-denaturation	94 °C	15 นาที
2) three step-cycling	35 cycles	
denaturation	94 °C	1 นาที
annealing	58 °C	1 นาที
extension	72 °C	1 นาที
3) final extension	72 °C	10 นาที

เมื่อปฏิบัติการเสร็จสมบูรณ์ ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x TBE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที จากนั้นนำเจลไปแช่ในสารละลาย

ethidium bromide นาน 10 นาที ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง gel documentation

### 13. การโคลนยีน

แยกดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis เชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega) โดยเติมดีเอ็นเอ 150 นาโนกรัม, T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, pGEM-T easy vector 50 นาโนกรัม และ T4 DNA ligase 3 Units รวมปริมาตรสาร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2 M EDTA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E.coli*) สายพันธุ์ DH5 $\alpha$  โดยใช้วิธี heat shock transformation (Sambrook and Russell, 2000) คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของยีน 2b ยีน CP และ 3' NTR ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนีและสีฟ้า 1 โคโลนี มาผสมน้ำปริมาตร 2 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน 2b ยีน CP และ 3' NTR

### 14. การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของเชื้อ CMV

#### 14.1 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป CLC Main workbench 5 (CLC Bio) จำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ CMV ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนและส่วนที่ไม่แปลรหัสด้วยโปรแกรม ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ CMV ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 4.1 (Tamura *et al.*, 2007)

#### 14.2 การวิเคราะห์แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอด้วยเทคนิค virtual PCR-RFLP

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอจากยีน 2b ยีน CP และส่วนของ 3' NTR ของเชื้อ CMV "ไอโซเลทที่ศึกษาในครั้งนี้และในฐานะข้อมูลที่มีรายงานอยู่ก่อนแล้ว มาวิเคราะห์หลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR-RFLP แบบเสมือนจริง หรือ *in silico* (Parrella and Sorrentino, 2009) ด้วยโปรแกรม CLC Main workbench 5 (CLC Bio) เพื่อคัดเลือกเอ็นไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถนำมาใช้เพื่อแสดงความหลากหลายของเชื้อ CMV จากนั้นนำแบบแผนการย่อยดีเอ็นเอที่ให้ขนาดของชิ้นส่วนแตกต่างกัน (polymorphisms) มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.2e

## ผลและวิจารณ์

### 1. เชื้อ CMV ที่แยกได้จากเตงกวา

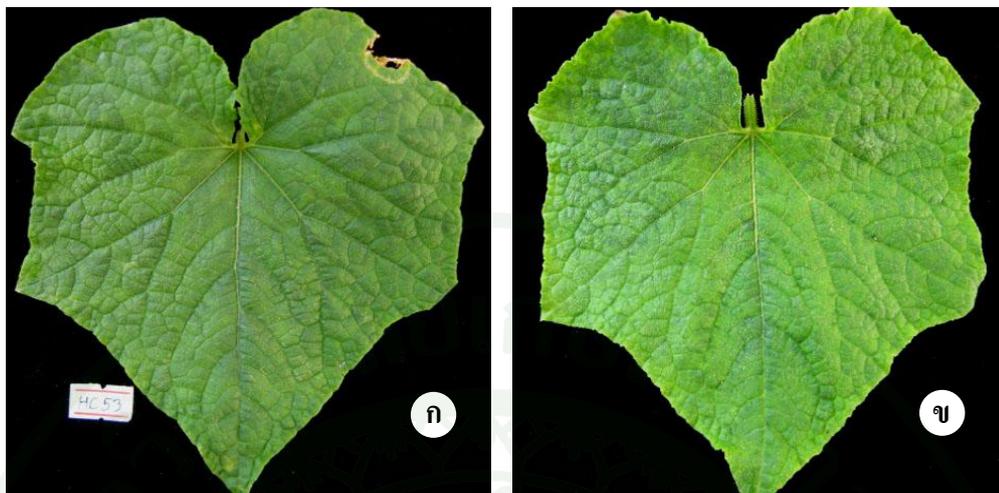
ตัวอย่างใบเตงกวาที่เก็บจากแปลงปลูกเตงกวาและแตงร้านใน 11 จังหวัด รวม 2,250 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยใช้ MAb CM-2 พบว่ามีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ MAb CM-2 จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้จากเตงกวา 2 ตัวอย่าง คือจากจังหวัด นครปฐม 2 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างแสดงอาการใบด่างแบบไม่ชัดเจนและใบไม่เสียรูปทรง ให้ เป็นไอโซเลท HC 53 (ภาพที่ 3ก) และ HC56 (ภาพที่ 3ข) อีก 2 ตัวอย่างได้จากเตงกวาผลใหญ่ (แตงร้าน) ในจังหวัดสระแก้ว 1 ตัวอย่าง แสดงอาการใบด่างแบบไม่ชัดเจนและใบไม่เสียรูปทรง ให้ เป็นไอโซเลท SK211 และจังหวัดเพชรบุรี 1 ตัวอย่าง แสดงอาการใบด่างแบบไม่ชัดเจนและใบไม่ เสียรูปทรง ให้เป็นไอโซเลท PBR

การปลูกเชื้อ CMV ทั้ง 4 ไอโซเลทจากเตงกวาและแตงร้านในแปลง และจากที่ได้รับ ความอนุเคราะห์อีก 6 ไอโซเลทลงบนถั่วเขียว พบว่าใบถั่วเขียวเกิดแผลจุดสีน้ำตาลขนาดประมาณ 1-1.5 มิลลิเมตร หลังปลูกเชื้อแล้ว 3 วัน เหมือนกันทุกไอโซเลท เมื่อแยกจุดไปเพิ่มปริมาณบนยาสูบ *N. glutinosa* พบว่าหลังปลูกเชื้อ 5 วัน ทุกไอโซเลททำให้ใบยอดแสดงอาการด่างและโค้งงอ ต่อมา ประมาณ 10 วันใบยาสูบแสดงอาการใบด่างกระจายทั่วต้น จึงเก็บรักษาเชื้อ CMV สายพันธุ์เดี่ยว จากการศึกษารั้งนี้ทั้ง 10 ไอโซเลทไว้ในยาสูบเพื่อการศึกษาในขั้นต่อไป (ตารางที่ 2)

สำหรับ MAb CM-2 (มณีรัตน์, 2547) ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับเชื้อ CMV subgroup I แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ CMV subgroup II

ตารางที่ 2 ไอโซเลทของเชื้อ CMV ที่ตรวจพบในแปลงปลูกและที่ได้รับความอนุเคราะห์

ไอโซเลท	จังหวัดที่เก็บตัวอย่าง	พืชอาศัย	ปีที่เก็บ
30RS	ปทุมธานี	พริก	2539
A168	ลำปาง	แตงกวา	2550
A27	เชียงใหม่	แตงกวา	2552
BK16	เชียงใหม่	แตงกวา	2552
C113	เชียงใหม่	แตงกวา	2552
CRI	เชียงราย	แตงกวา	ไม่ระบุ
HC53	นครปฐม	แตงกวา	2550
HC56	นครปฐม	แตงกวา	2550
KPS10	นครปฐม	พริก	2548
ML25	ขอนแก่น	เมลอน	2551
PBR	เพชรบุรี	แตงร้าน	2551
SK211	สระแก้ว	แตงร้าน	2551
SNK	สกลนคร	แตงกวา	ไม่ระบุ



ภาพที่ 3 อาการต่างบนใบแตงกวา (*Cucumis sativus*) จากแปลงที่ตรวจพบเชื้อ *Cucumber mosaic virus*

ก) ไอโซเลต HC53

ข) ไอโซเลต HC56

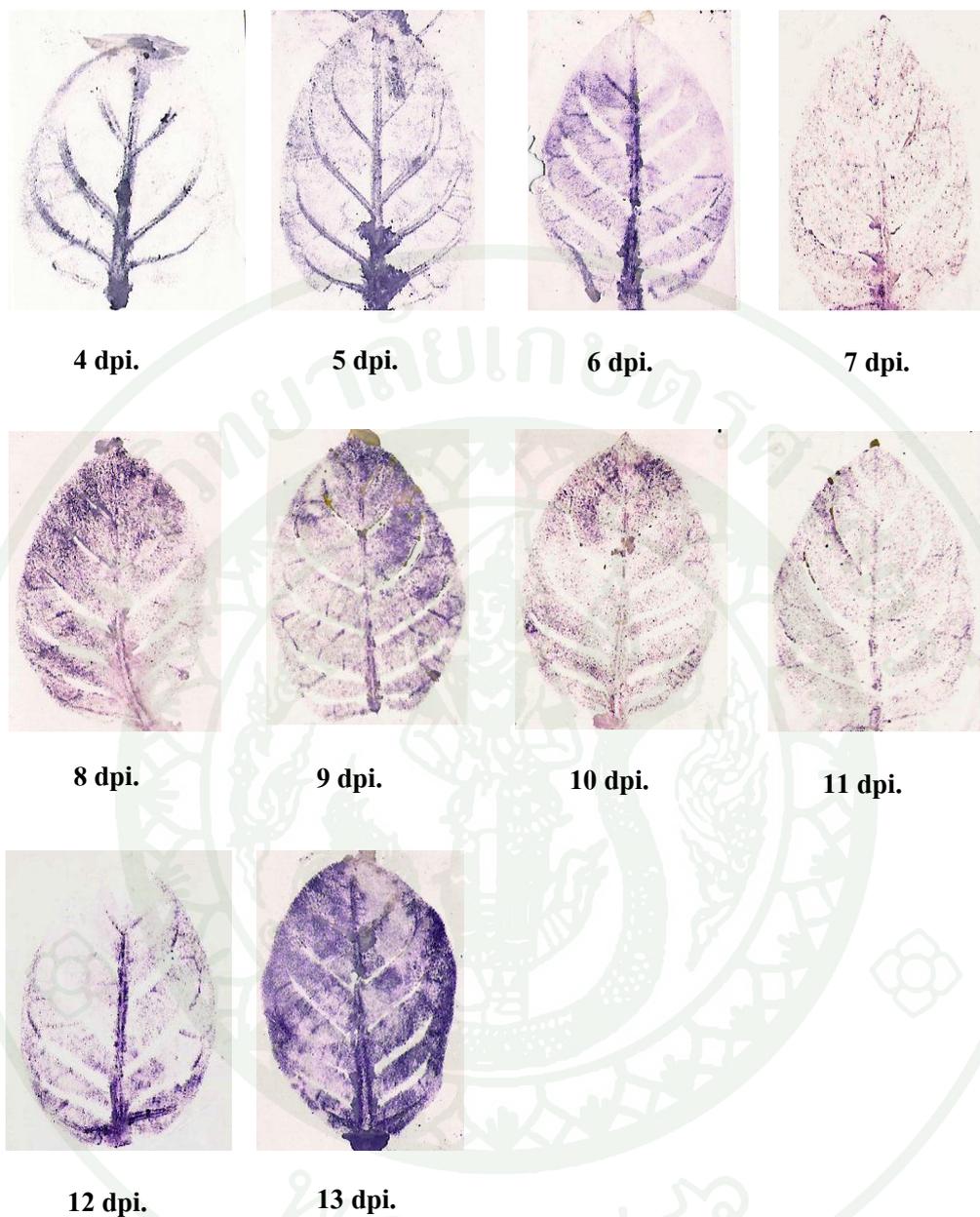
## 2. การแพร่กระจายและการเพิ่มปริมาณของเชื้อ CMV ในต้นยาสูบที่ได้รับการปลูกเชื้อ

ต้นกล้าของยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc ที่ได้รับการปลูกเชื้อแล้ว 7 วันแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบเสยรูปทรงเล็กน้อย ใบยอดด่างและโค้งงอ ส่วนใบที่ได้รับการปลูกเชื้อแสดงอาการใบด่างและใบเหลือง

ตรวจสอบการแพร่กระจายตัวของเชื้อ CMV ในใบยาสูบที่อยู่ถัดขึ้นมาจากใบที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วยเทคนิค TPIBA หลังปลูกเชื้อแล้ว 4 วัน พบเชื้อแพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนของ vascular บริเวณเส้นใบ (vein) ก่อนส่วนอื่น โดยตรวจพบเชื้อ CMV มากในส่วนเส้นกลางใบ และเส้นใบย่อยที่ติดกับเส้นกลางใบ ต่อมาในวันที่ 5 เชื้อแพร่กระจายจากเส้นใบไปยังเซลล์ parenchyma ของเนื้อใบมากขึ้น โดยเฉพาะตามบริเวณขอบใบ ตั้งแต่วันที่ 6 เป็นต้นไปพบว่าเชื้อแพร่กระจายทั่วทั้งแผ่นใบ (ภาพที่ 4)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าใบยาสูบที่อยู่เหนือใบที่ได้รับการปลูกเชื้อแล้ว 4 วันตรวจพบเชื้อ CMV มากในส่วนของเส้นกลางใบ class I และ class II โดย class III นั้นพบเชื้อเพียงเล็กน้อย ต่อมาในวันที่ 5 ตรวจพบในส่วนของเส้นใบ class III มากขึ้นและเริ่มแพร่กระจายเข้าเนื้อใบทางเส้นใบ class IV และ V ต่อมาในวันที่ 6-13 พบว่าเชื้อ CMV แพร่กระจายเต็มเนื้อใบ

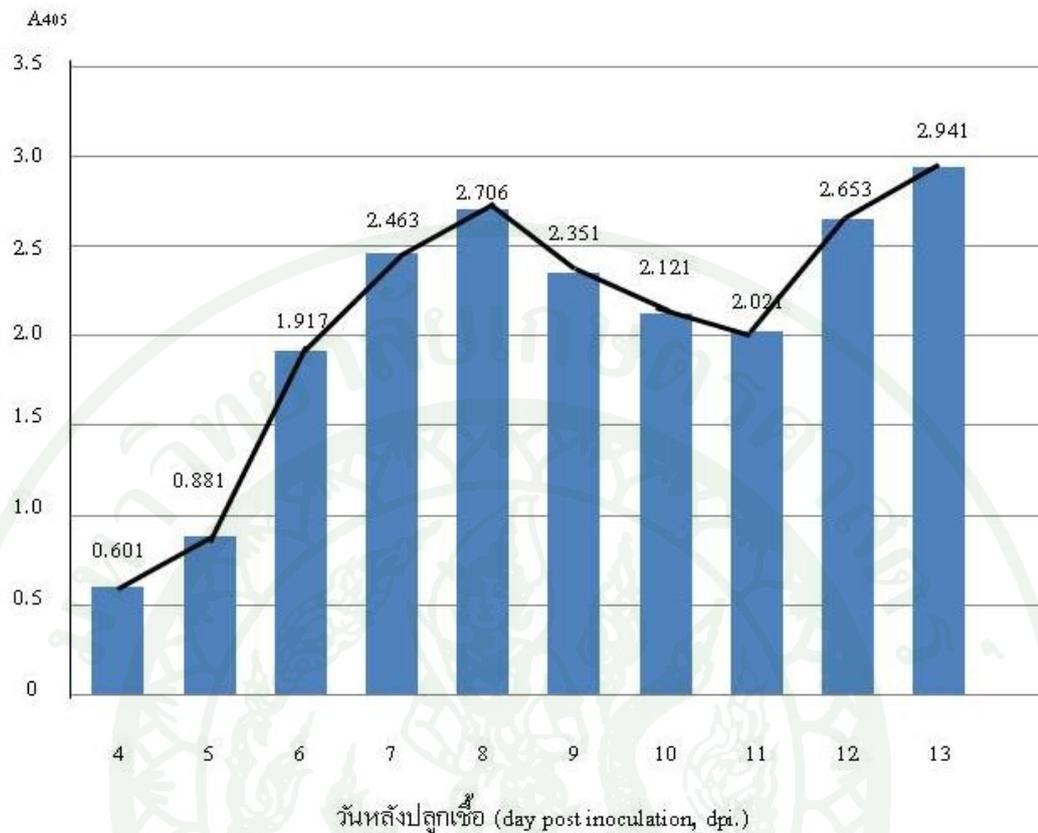
หลังจากจากปลูกเชื้อแล้ว 4 วัน เริ่มตรวจพบเชื้อ ( $A_{405}$  เฉลี่ย 0.600) ในวันที่ 5 เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ( $A_{405}$  เฉลี่ย 0.881) ต่อมาในวันที่ 6, 7 และ 8 ปริมาณของเชื้อ CMV เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยค่า  $A_{405}$  เฉลี่ย 1.917, 2.463 และ 2.706 ตามลำดับ ในวันที่ 9, 10 และ 11 ปริมาณของเชื้อมีการลดลงโดยมีค่า  $A_{405}$  เฉลี่ย 2.351 2.121 และ 2.021 ตามลำดับ จากนั้นตรวจพบปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้นอีกครั้งเป็นรอบที่สองในวันที่ 12 และ 13 มีค่าเฉลี่ย  $A_{405}$  เท่ากับ 2.653 และ 2.941 ตามลำดับ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 แบบแผนการแพร่กระจายของเชื้อ CMV ไอโซเลต SK211 ในใบยาสูบ *Nicotiana tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc ในช่วงเวลา 4-13 วันหลังการปลูกเชื้อ (dpi.) ด้วยวิธีการตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค Tissue print immunoblot assay (TPIBA)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวัดปริมาณเชื้อ CMV ไอโซเลท SK211 ในใบยาสูบ *Nicotiana tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc หลังการปลูกเชื้อแล้ว 4-13 วัน แต่ละวันตรวจสอบใบยาสูบ 1 ใบ ต่อต้น รวม 4 ต้น โดยใช้เทคนิค indirect PTA ELISA อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ( $A_{405}$ )

วันหลังปลูกเชื้อ	$A_{405}$ ของ CMV ในใบยาสูบต้นที่				ค่าเฉลี่ย $A_{405}$
	1	2	3	4	
4	0.617	0.603	0.598	0.584	0.601
5	0.915	0.855	0.899	0.853	0.881
6	1.928	1.897	1.949	1.892	1.917
7	2.456	2.414	2.423	2.558	2.463
8	2.721	2.703	2.791	2.609	2.706
9	2.326	2.306	2.370	2.400	2.351
10	2.069	2.177	2.214	2.023	2.121
11	2.030	2.011	2.103	1.940	2.021
12	2.679	2.591	2.570	2.772	2.653
13	2.948	2.939	2.862	3.016	2.941



ภาพที่ 5 กราฟแสดงแบบแผนการเพิ่มปริมาณของเชื้อ CMV ไอโซเลท SK211 ในใบยาสูบ *Nicotiana tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc หลังจากได้รับการปลูกเชื้อด้วยวิธีกลแล้ว 4-13 วัน (dpi) ตรวจวัดปริมาณเชื้อในใบพืชที่อยู่ถัดขึ้นไปจากใบที่ปลูกเชื้อด้วยเทคนิค indirect PTA ELISA อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร

### 3. ลักษณะสัณฐานของอนุภาคไวรัสและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค

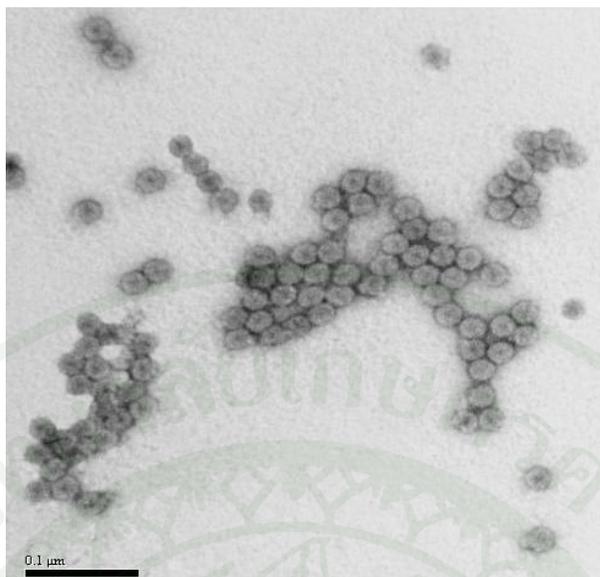
เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงหลอดสารแขวนลอยไวรัสใน sucrose gradient พบแถบไวรัสสีขาวขุ่น (viral zone) อย่างชัดเจนอยู่ที่บริเวณ 4.5 ซม. จากปากหลอด สารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ภายหลังจากทำ dialysis มีความเข้มข้นประมาณ 1 มก.ต่อ มล. ปริมาณไวรัสที่เตรียมได้จากใบยาสูบ 50 กรัม อยู่ในช่วง 0.436-1.680 มก. และค่าสัดส่วน  $A_{260}/A_{280}$  ของไวรัสที่เตรียมให้บริสุทธิ์ที่สอดคล้องตามมาตรฐาน (1.7) (Brunt *et al.*, 1996) พบในไอโซเลท HC53 และ HC56 (ตารางที่ 4)

จากภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าอนุภาคของเชื้อ CMV แต่ละไอโซเลทที่เตรียมได้มีลักษณะเป็นรูปทรงกลม แต่โปรตีนหน่วยย่อยที่ห่อหุ้มอนุภาคมีสภาพและการติดสีข้อมแตกต่างกัน รวมทั้งพบการติดสีข้อมในช่องกลางอนุภาคของเกือบทุกไอโซเลท เมื่อวัดขนาดอนุภาคจากภาพถ่ายจำนวน 20 อนุภาคและหาค่าเฉลี่ย พบว่ามีขนาดต่างกันอยู่ในช่วง 24-28 นาโนเมตร (ภาพที่ 6) ในสารแขวนลอยไวรัสบางไอโซเลทที่เตรียมได้ เช่น PBR SNK SK211 และ CRI พบสิ่งปะปนอยู่ด้วย ผลการสกัดและแยกขนาดอาร์เอ็นเอของเชื้อ CMV จากสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ พบแถบอาร์เอ็นเอ 3 แถบประกอบด้วยอาร์เอ็นเอ 4 โมเลกุล โดยที่ RNA 1 และ RNA 2 มีขนาดใกล้เคียงกัน จึงเห็นอยู่ชิดกันเป็นแถบเดียว (ภาพที่ 7)

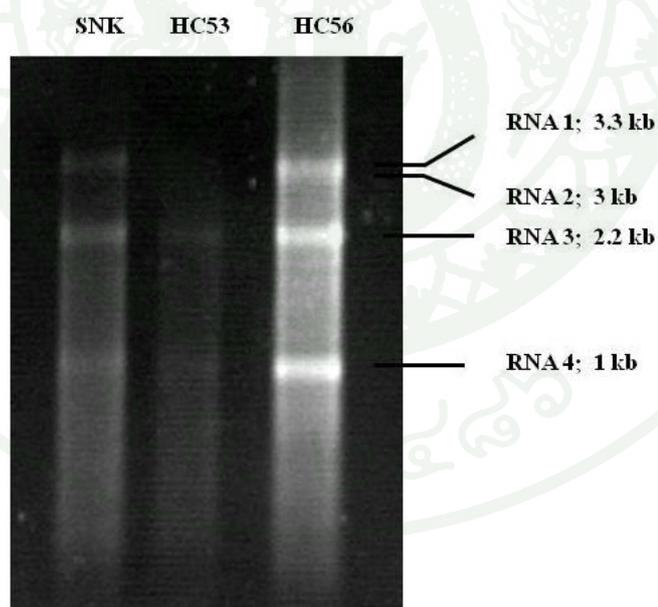
ผลการแยกขนาดโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV จากสารแขวนลอยไวรัสที่เตรียมได้ ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวจากอนุภาค CMV ทุกไอโซเลทซึ่งเคลื่อนที่เป็นระยะทางเท่ากันบนเจล จากการพล็อตกราฟและคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV ทุกไอโซเลทมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 8)

ตารางที่ 4 ความเข้มข้น ปริมาณเชื้อ และขนาดของอนุภาค CMV 10 ไอโซเลทที่เตรียมให้บริษัท

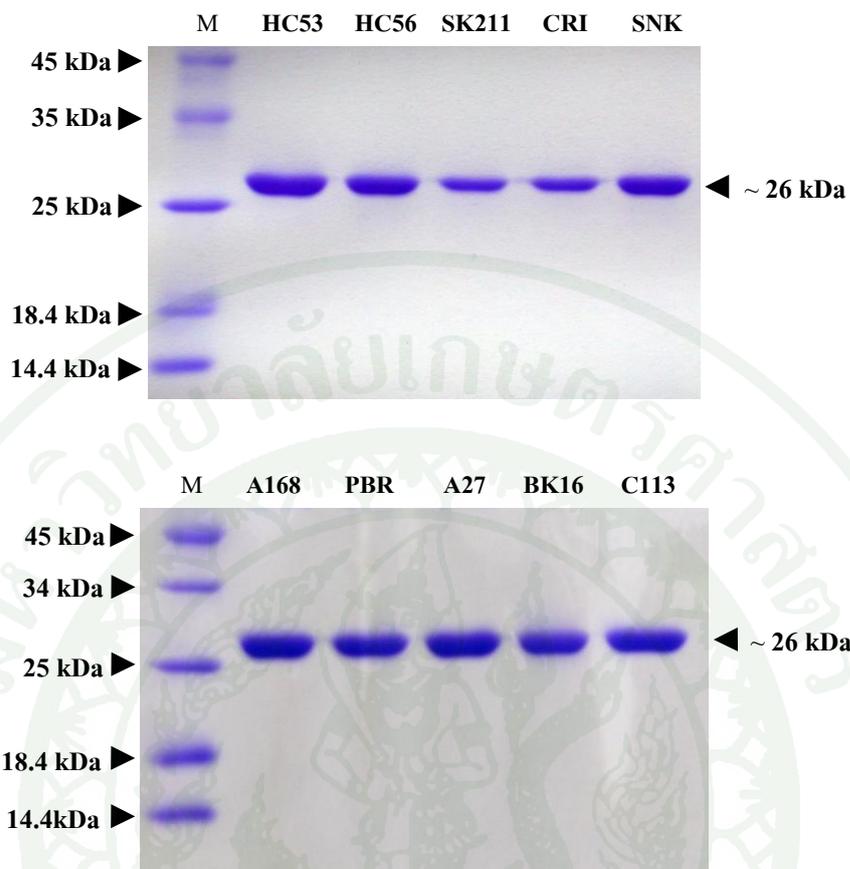
ไอโซเลท	ความเข้มข้น (มก./มล.)	ปริมาณเชื้อ (มก.) ในใบยาสูบ 50 กรัม	ค่าสัดส่วน $A_{260}/A_{280}$	ขนาดอนุภาค (นาโนเมตร)
HC53	0.840	1.680	1.72	26
SNK	0.778	1.556	1.41	25
HC56	0.718	1.426	1.79	24
A27	0.450	0.900	1.24	27
A168	0.428	0.856	1.17	26
PBR	0.418	0.836	1.32	25
BK16	0.410	0.820	1.08	26
C113	0.390	0.780	1.13	25
SK211	0.218	0.436	1.49	26
CRI	0.170	0.340	1.49	28



ภาพที่ 6 อนุภาคไวรัส CMV ไอโซเลท HC53 ที่เตรียมให้บริสุทธิ์ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เตรียมตัวอย่างด้วยวิธี dip preparation ย้อมสีด้วย 2% uranyl acetate



ภาพที่ 7 แอบบาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากอนุภาคเชื้อ CMV ในสารแขวนลอยไวรัสที่แยกให้บริสุทธิ์



ภาพที่ 8 แถบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CMV ในสารแขวนลอยไวรัสที่เตรียมให้บริสุทธิ์ แยกขนาดใน SDS-polyacrylamide gel ย้อมสีด้วย 0.2% coomassie blue R-250  
 M = โปรตีนมาตรฐาน 14.4-45 kDa (Low range Protein marker, Fermentas)

#### 4. ความหลากหลายทางชีววิทยาของเชื้อ CMV ที่แยกได้จากแตงกวา

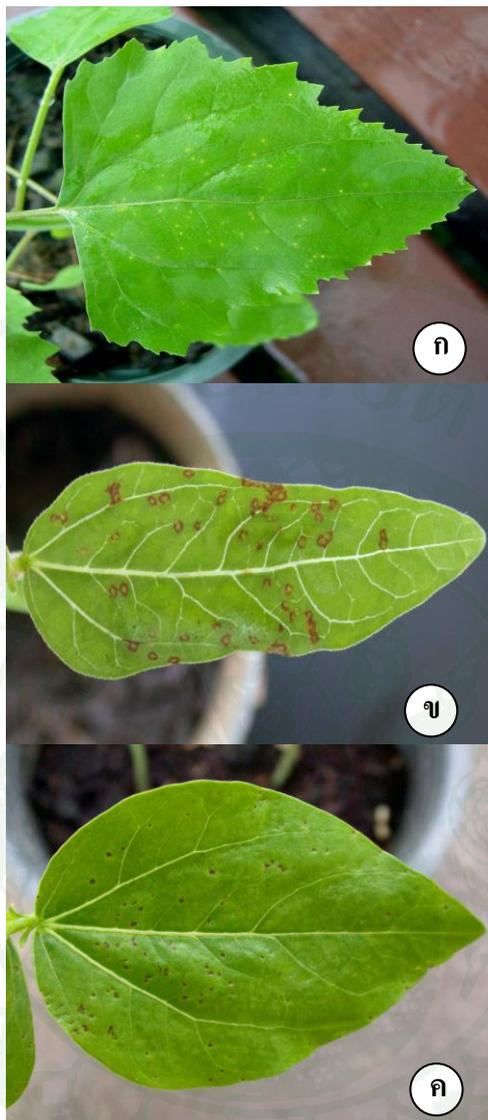
##### 4.1 อาการบนพืชอาศัยที่ได้รับเชื้อ CMV

เชื้อ CMV ที่แยกจากแตงกวาและแตงร้านทั้ง 10 ไอโซเลททำให้เกิดอาการ 2 แบบกับพืชทดสอบ คือ *Chenopodium amaranticolor* ถั่วเขียว และถั่วพุ่ม เกิดอาการแบบแผลจุดเฉพาะแห่ง (local lesion symptom) โดยลักษณะอาการและระยะเวลาการแสดงอาการของโรคของเชื้อ CMV แต่ละไอโซเลทบนพืชทดสอบแต่ละชนิดมีความคล้ายกันมาก จึงทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างของแต่ละไอโซเลทบนพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด ส่วนพืชทดสอบชนิดอื่นเกิดอาการแบบแพร่กระจายทั่วต้น (systemic symptom) โดยมีรายละเอียดดังนี้

*C. amaranticolor* หลังจากปลูกเชื้อ 3 วัน พบอาการแผลจุดสีเหลืองซีดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-0.5 มิลลิเมตร เฉพาะบนใบเลี้ยงที่ปลูกเชื้อเท่านั้น ต่อมา 7 วัน แผลจุดจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขอบแผลสีเหลืองซีด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1-1.5 มิลลิเมตร (ภาพที่ 9ก)

ถั่วเขียวพันธุ์ KPS2 หลังปลูกเชื้อประมาณ 3 วัน แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลแดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-1.5 มิลลิเมตร เฉพาะบนใบเลี้ยงที่ปลูกเชื้อ (ภาพที่ 9ข)

ถั่วพุ่ม หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 3 วันพบอาการแผลจุดสีน้ำตาลแดงขนาดเล็กเท่าปลายเข็ม (pin point) เฉพาะบนใบเลี้ยงที่ปลูกเชื้อ (ภาพที่ 9ค)



**ภาพที่ 9** อาการแผลจุดบนพืชทดสอบที่ได้รับเชื้อ *Cucumber mosaic virus* 3 วันหลังจากปลูกเชื้อ  
 ก) *Chenopodium amaranticolor* แสดงอาการแผลจุดสีดขนาดเล็กมากบนใบที่ปลูกเชื้อ  
 ข) ถั่วเขียวพันธุ์ KPS2 แสดงอาการแผลจุดสีดมีขอบสีน้ำตาลแดงบนใบเลี้ยงที่ปลูกเชื้อ  
 ค) ถั่วพุ่มพันธุ์เฮอรัรี บุษ แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลเข้ม ขนาดเล็กบนใบเลี้ยงที่ปลูกเชื้อ

แตงกวาพันธุ์พุ่มขบาที่ได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท HC53 HC56 และ A168 แสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนชัดเจน (ภาพที่ 10) ส่วนแตงกวาที่ได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลทอื่นๆ แสดงอาการใบด่างแบบไม่ชัดเจน (mild mosaic) ขอบใบซีด แต่ใบไม่เสียรูปทรง (ภาพที่ 11)

มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 หลังจากได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท A27 BK16 C113 CRI HC53 HC56 และ PBR (ภาพที่ 12ก) แสดงอาการด่างอย่างชัดเจนสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนทั่วต้น และใบมีขนาดเล็ก ไอโซเลท A168 SNK และ SK211 ทำให้เกิดอาการใบด่าง ใบมีขนาดเล็กและแตกเป็นพุ่ม ลำต้นแคระแกร็นไม่มีการเจริญของข้อปล้อง (ภาพที่ 12ข)

พริกพันธุ์หัวเรือแสดงอาการด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนกระจายทั่วทั้งต้น (ภาพที่ 13ก) ไอโซเลท SK211 ทำให้พริกแสดงอาการใบด่างและใบเสียรูปทรง ใบมีขนาดเล็กและมีส่วนของเนื้อใบน้อย ไอโซเลท SNK แสดงอาการใบด่างคล้ายกับไอโซเลทอื่น มีใบน้อย มีใบเฉพาะส่วนบนของลำต้น (ภาพที่ 13ข)

ยาสูบ *N. glutinosa* พบอาการด่างที่ใบยอดหลังปลูกเชื้อประมาณ 5-7 วัน ต่อมาประมาณ 10 วันแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อนแพร่กระจายทั่วทั้งต้นและใบเสียรูปทรง (ภาพที่ 14ก)

ยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc พบอาการใบยอดด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน หลังจากปลูกเชื้อประมาณ 6-7 วัน ต่อมาประมาณ 10-14 วัน อาการใบด่างแพร่กระจายทั่วทั้งต้นและใบเสียรูปทรง (ภาพที่ 14ก) ไอโซเลท SNK ทำให้ใบยาสูบแสดงอาการใบด่างร่วมกับอาการใบบิด (ภาพที่ 14ข)

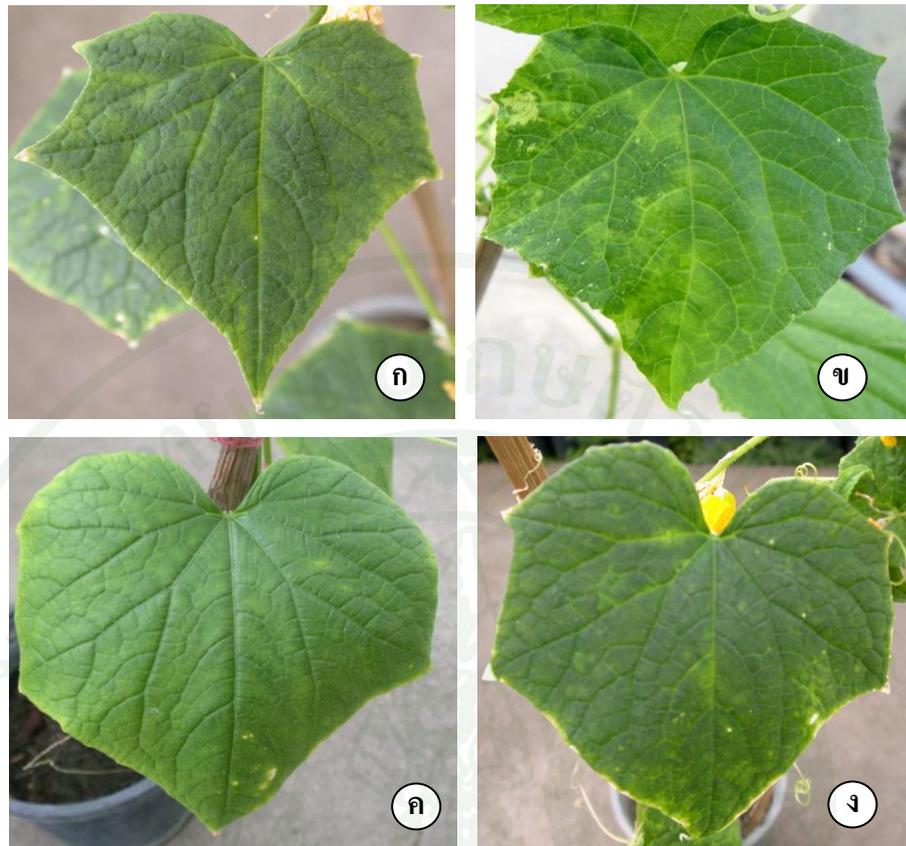
ลำโพง แสดงอาการจุดซีดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-3 มิลลิเมตร หลังปลูกเชื้อประมาณ 7-10 วัน ต่อมาประมาณ 15-20 วัน มีอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนอย่างรุนแรงแพร่กระจายทั่วทั้งต้น ใบเสียรูปทรง ดอกด่าง และรูปทรงบิดเบี้ยว (ภาพที่ 15)

โทงเทง พบอาการใบยอดด่างแบบไม่ชัดเจนหลังปลูกเชื้อประมาณ 7-10 วัน ต่อมาประมาณ 14-17 วัน เกิดอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนแพร่กระจายทั่วทั้งต้น และใบเสียรูปทรง (ภาพที่ 16)

เมลอน แดงโมพันธุ์มรกตดำ และ แคนตาลูปพันธุ์ศรีทอง ไม่พบอาการของโรค และตรวจไม่พบเชื้อ CMV จากทั้ง 10 ต้นของแต่ละไอโซเลทด้วยเทคนิค ELISA

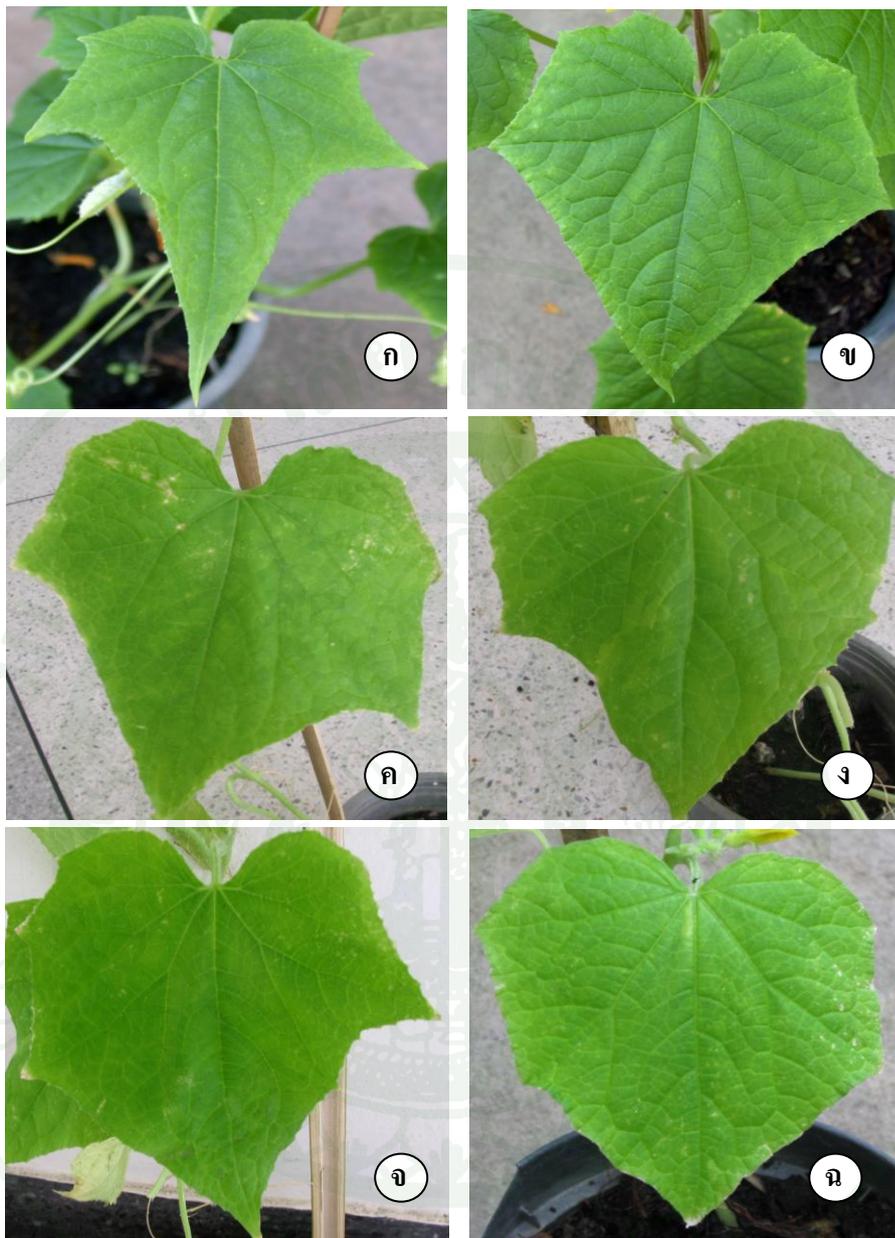
ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าไอโซเลท SNK ทำให้เกิดลักษณะอาการที่แตกต่างจากไอโซเลทอื่น บนยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc ไอโซเลท A168 และ SK211 บนมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ทำให้เกิดอาการใบเล็ก ยอดแตกเป็นพุ่มและลำต้นแคระแกร็น แต่ไม่พบลักษณะอาการใบเรียวยาว (shoe string) ซึ่งเป็นอาการที่พบเฉพาะพืชที่ถูกเชื้อ CMV เข้าทำลาย





ภาพที่ 10 แสดงภาพพันธุ์ฟุ่มชบาแสดงอาการใบด่างหลังจากปลูกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* แล้วประมาณ 2 สัปดาห์

- |                 |                 |
|-----------------|-----------------|
| ก) ไอโซเลท HC53 | ข) ไอโซเลท HC56 |
| ค) ไอโซเลท A168 | ง) ไอโซเลท PBR  |



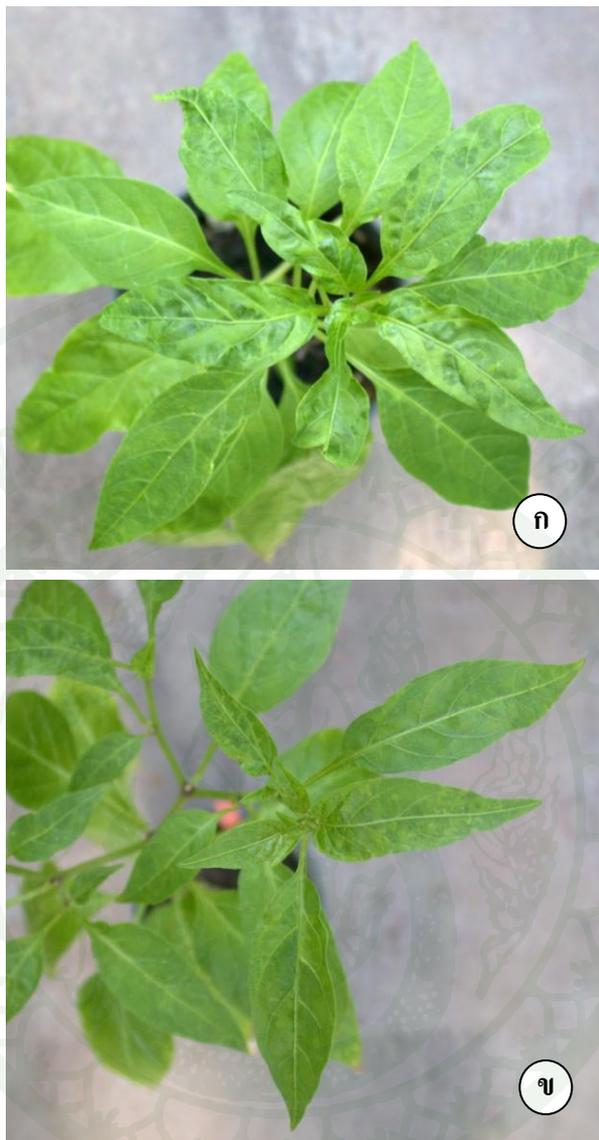
ภาพที่ 11 แสดงภาพพันธุ์พุ่มชบาแสดงอาการใบด่างไม่ชัดเจนและขอบใบซีด หลังจากได้รับเชื้อ *Cucumber mosaic virus* แล้วประมาณ 2 สัปดาห์

- |                 |                  |
|-----------------|------------------|
| ก) ไอโซเลท CRI  | ข) ไอโซเลท SNK   |
| ค) ไอโซเลท A27  | ง) ไอโซเลท BK16  |
| จ) ไอโซเลท C113 | ฉ) ไอโซเลท SK211 |



ภาพที่ 12 ลักษณะอาการบนมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 หลังจากปลูกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) แล้ว 20 วัน

- ก) อาการใบด่างและใบมีขนาดเล็กหลังจากได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท HC56
- ข) อาการใบด่าง ใบมีขนาดเล็กหลังจากได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท A168



ภาพที่ 13 ลักษณะอาการบนพริกพันธุ์หัวเรือหลังจากปลูกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) แล้ว 20 วัน  
 ก) อาการใบด่างและเสีชรูปทรง เมื่อได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท CRI  
 ข) อาการใบด่าง ใบเรียวเล็ก และเสีชรูปทรง เกิดจากเชื้อ CMV ไอโซเลท SNK



ภาพที่ 14 อาการใบด่างและใบเสี้ยนรูปทรงบนยาสูบที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) หลังจากปลูกเชื้อ 15-20 วัน

- ก) ยาสูบ *Nicotiana glutinosa* ได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลต C113
- ข) ยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc ได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลต A168
- ค) ยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc ได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลต SNK



ภาพที่ 15 อาการบนลำโพงที่ได้รับเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท HC53 หลังปลูกเชื้อแล้ว 20 วัน



ภาพที่ 16 อาการใบค่างรุนแรงและเสียรูปทรงของโงงเหงที่ได้รับเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ไอโซเลท HC53 ประมาณ 17 วันหลังการปลูกเชื้อ

ตารางที่ 5 ลักษณะอาการบนพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ด้วยวิธีกล

พืชทดสอบ	ไอโซเลต									
	A168	A27	BK16	C113	CRI	HC53	HC56	PBR	SK211	SNK
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
<i>Vigna radiata</i> พันธุ์ KPS2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
<i>Vigna sinensis</i> พันธุ์เฮอริรี่ บุษ	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
<i>Cucumis sativus</i> พันธุ์พุ่มชบา	M	m	m	m	m	M	M	M	m	m
<i>Solanum lycopersicum</i> พันธุ์สีดาพิพย์ 4	S	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	S	S
<i>Capsicum annuum</i> พันธุ์หัวเรือ	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD
<i>N. glutinosa</i>	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD
<i>N. tabacum</i> พันธุ์ Xanthi-nc	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	T
<i>Datura metel</i>	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD
<i>Physalis angulata</i>	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD	MD

หมายเหตุ L: ผลจุดเฉพาะแห่ง, M: ใบด่าง, m: ใบด่างไม่ชัดเจน, MD: ใบด่างและเสียรูปทรง, S: ลำต้นแคระแกร็น, T: ใบบิดเกลียว

พืชทดสอบที่ไม่แสดงอาการและตรวจไม่พบเชื้อได้แก่แตงโมพันธุ์มรกตคำ แคนตาลูปพันธุ์ศรีทอง และเมลอนไม่นำมาแสดงในตารางนี้

## 4.2 การตอบสนองของพริกและมะเขือเทศต่อเชื้อ CMV 10 ไอโซเลทที่แยกได้จากแตงกวา

### 4.2.1 พริกพันธุ์หัวเรือ

เชื้อ CMV ไอโซเลท A168 A27 BK16 C113 CRI HC53 HC56 และ PBR ทำให้เกิดอาการใบด่างแบบสีเขียวซีดบนใบยอดหลังปลูกเชื้อประมาณ 17-20 วัน ต่อมาประมาณ 25 วัน หลังปลูกเชื้อพบอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบที่อยู่ถัดจากใบยอดลงมาเริ่มแสดงอาการด่างตรงบริเวณโคนใบที่ติดกับก้านใบ และประมาณ 27-30 วันหลังปลูกเชื้อใบมีอาการด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนร่วมกับอาการใบเหลือง ใบยอดที่แตกใหม่ด่างซีด ใบม้วนงอและเสีรูปร่าง พริกที่ได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท SK211 แสดงอาการใบด่าง เสีรูปร่าง ใบมีขนาดเล็กและเรียวยาว พริกที่ได้รับเชื้อ CMV ไอโซเลท SNK แสดงอาการใบด่างคล้ายกับไอโซเลท อื่น จำนวนใบน้อย มีใบเฉพาะส่วนบนของลำต้น ผลการประเมินคะแนนของระดับอาการของโรคอยู่ในช่วง 2-4 ค่าเฉลี่ยของคะแนนในช่วง 2.0-2.9 พบในไอโซเลท A168 A27 BK16 C113 CRI HC53 HC56 และ PBR ช่วงคะแนน 3.0-3.9 พบในไอโซเลท SK211 และช่วงคะแนน 4.0-4.9 พบในไอโซเลท SNK (ตารางที่ 6)

เมื่อกำหนดเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อจากการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล เชื้อ CMV ไอโซเลท CRI ทำให้พริกเกิดโรคได้สูงสุด 70% รองลงมาได้แก่ ไอโซเลท A168 BK16 HC56 และ SK211 ทำให้เกิดโรค 50% รองลงมาไอโซเลท C113 และ A27 เกิดโรค 40 และ 30% ตามลำดับ ไอโซเลท PBR และ HC53 ทำให้เกิดโรค 20% ส่วนไอโซเลท SNK ทำให้เกิดโรคได้น้อยที่สุดเพียง 10%

### 4.2.2 มะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4

ใบยอดของมะเขือเทศแสดงอาการใบด่างแบบไม่ชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อ 10-14 วัน ต่อมามะเขือเทศที่ได้รับเชื้อไอโซเลท A27 HC53 HC56 BK16 C113 CRI และ PBR แสดงอาการด่างชัดเจนสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบเหลือง เสีรูปร่างและมีขนาดเล็ก มะเขือเทศที่ได้รับเชื้อไอโซเลท A168 SK211 และ SNK แสดงอาการลำต้นแคระแกร็นและ แตกเป็นพุ่ม ไม่มีการเจริญของข้อปล้อง ผลการประเมินคะแนนระดับอาการของโรคอยู่ในช่วง 2-3 ค่าเฉลี่ยของคะแนน 2.0-2.9 ได้จากไอโซเลท A168 A27 BK16 C113 HC53 HC56 PBR และ SK211 ค่าเฉลี่ยในช่วง 3.0-3.9 ได้จากไอโซเลท CRI และ SNK (ตารางที่ 7)

เมื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ CMV ของมะเขือเทศ พบว่าไอโซเลท A168 และ SK211 ทำให้มะเขือเทศเกิดโรคได้สูงสุด 100% รองลงมาไอโซเลท HC56 ทำให้เกิดโรค 70% ไอโซเลท BK16 C113 และ HC53 เกิดโรค 60% ไอโซเลท A27 PBR CRI และ SNK เกิดโรค 50 30 20 และ 10% ตามลำดับ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างคะแนนอาการของโรคและปริมาณเชื้อจากค่า ELISA ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์สถิติ The SAS System พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันของระดับอาการของโรคและปริมาณเชื้อในพืชทั้งสองชนิดที่ทดสอบ

จากการศึกษาการตอบสนองของพริกและมะเขือเทศต่อเชื้อ CMV ทั้ง 10 ไอโซเลทที่ศึกษา พบว่ามะเขือเทศแสดงอาการของโรคเร็วกว่าในพริกโดยจะเริ่มแสดงอาการหลังจากได้รับการปลูกเชื้อ CMV ประมาณ 14 วัน ในขณะที่พริกเริ่มแสดงอาการของโรคประมาณ 20 วันหลังจากปลูกเชื้อ ความรุนแรงของอาการที่พบในพริกและมะเขือเทศนั้นเมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยคะแนนระดับอาการของแต่ละไอโซเลทพบว่าส่วนใหญ่อยู่ในระดับใกล้เคียงคือ 2.0-2.9 ส่วนปริมาณเชื้อ CMV และเปอร์เซ็นต์การก่อโรคของเชื้อ CMV แต่ละไอโซเลทพบว่าปริมาณเชื้อและเปอร์เซ็นต์ก่อโรคในมะเขือเทศสูงกว่าในพริกเมื่อพิจารณาจากค่า ELISA ( $A_{405}$ ) และเปอร์เซ็นต์ก่อโรคของแต่ละไอโซเลท

Stoimenova *et al.* (2005) ประเมินความต้านทานของพริกต่อเชื้อ CMV และพบว่า การเกิดโรคบนพริกนั้นจะขึ้นอยู่กับความต้านทานของพริก และความเข้มข้นของเชื้อในน้ำคั้นที่ใช้เชื้อ CMV ที่ใช้ปลูกลงบนพริกที่มีความเข้มข้น 75  $\mu\text{g/ml}$  สามารถทำให้พริกเกิดโรคได้ในอัตราสูงกว่าเชื้อที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า Shubin (1995) ได้คัดเลือกหาพริกพันธุ์ต้านทานจำนวน 14 สายพันธุ์ต่อเชื้อ CMV ไอโซเลท CMY-15 (Thai-strain) ที่แยกได้จากพริก พบว่าความรุนแรงของอาการบนพริกที่เป็นพันธุ์อ่อนแอที่พบมีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อในพริกเมื่อตรวจวัดจากค่า ELISA

ตารางที่ 6 การประเมินการตอบสนองของพริกพันธุ์หัวเรือต่อเชื้อ CMV 10 ไอโซเลท ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลจำนวน 10 ต้นต่อไอโซเลท หลังจากนั้น 30 วัน ให้คะแนนระดับอาการของโรค ตรวจวัดปริมาณเชื้อจากค่า ELISA นับจำนวนต้นที่เป็นโรคและคำนวณเปอร์เซ็นต์ก่อโรค

ไอโซเลท	คะแนนระดับอาการ		ค่า ELISA		เปอร์เซ็นต์ก่อโรค
	เฉลี่ย	พิสัย	เฉลี่ย	พิสัย	
CRI	2.4	2-3	1.241	0.525-1.557	70
A168	2.4	2-3	0.612	0.209-1.201	50
BK16	2.4	2-3	1.670	1.204-2.159	50
HC56	2.6	2-3	1.540	0.518-1.942	50
SK211	3.8	3-4	2.024	1.453-2.317	50
C113	2.5	2-3	1.517	1.265-1.816	40
A27	2.6	2-3	1.195	0.891-1.401	30
HC53	2.5	2-3	1.234	0.706-1.762	20
PBR	2.5	2-3	1.550	1.268-1.836	20
SNK	4	4	1.024	1.024	10

ตารางที่ 7 การประเมินการตอบสนองของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ต่อเชื้อ CMV 10 ไอโซเลท  
ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลจำนวน 10 ต้นต่อไอโซเลท หลังจากนั้น 20 วัน ให้คะแนนระดับ  
อาการของโรค ตรวจวัดปริมาณเชื้อจากค่า ELISA นับจำนวนต้นที่เป็นโรคและคำนวณ  
เปอร์เซ็นต์ก่อโรค

ไอโซเลท	คะแนนระดับอาการ		ค่า ELISA		เปอร์เซ็นต์ก่อโรค
	เฉลี่ย	พิสัย	เฉลี่ย	พิสัย	
A168	2.4	2-3	1.657	1.147-2.099	100
SK211	2.3	2-3	1.536	0.664-2.303	100
HC56	2.6	2-3	1.570	0.573-2.147	70
BK16	2.3	2-4	1.650	0.904-2.384	60
C113	2.5	2-3	1.532	1.049-1.867	60
HC53	2.3	2-3	1.976	1.454-2.407	60
A27	2.4	2-3	1.638	1.311-2.172	50
PBR	2.3	2-3	1.612	1.479-1.762	30
CRI	3.5	2-3	1.878	1.774-1.982	20
SNK	3	3	1.328	1.328	10

## 5. ความหลากหลายของรหัสพันธุกรรม

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 2b ยีน CP และ 3' NTRของเชื้อ CMV จากแตงกวาและแตงร้าน ทั้ง 10 ไอโซเลทที่ศึกษา ได้รายงานเข้าสู่ฐานข้อมูลของ GenBank และได้รับ Accession number รวม 30 รายการ รวมทั้งได้โคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลท ML25 30RS และ KPS10 เพิ่มเติมอีกรวม 6 รายการ (ตารางที่ 8)

### 5.1 ยีน 2b

#### 5.1.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

ทุกไอโซเลทมีขนาด 336 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 17) แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 111 เรซิดิวส์ (ภาพที่ 18) จำนวนน้ำหนักรวมได้ 13.06-13.12 กิโลดาลตัน (Protein calculator v3.3; <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html>) ความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ในระหว่างไอโซเลทต่าง ๆ เฉลี่ยรวมเท่ากับ 10.73% ซึ่งส่วนใหญ่เป็นลักษณะของ base transition คือ A กับ G คิดเป็น 45.9% รองลงมาคือ T กับ C 32.4 % ส่วนลักษณะที่เป็น transversion มีเพียง 2.7-8.1% ไอโซเลทที่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากกลุ่มมากที่สุดได้แก่ SNK

จากการทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน 2b พบว่ามีอยู่ 9 ไอโซเลทที่มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 98-100% ยกเว้น ไอโซเลท SNK อยู่ที่ระดับ 85% (ตารางที่ 10) ความคล้ายคลึงกับเชื้อ CMV subgroup IB จากพืชอื่นทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศอยู่ที่ระดับ 82-99% คล้ายคลึงกับ subgroup IA และ II ที่ระดับ 75-82% และ 46-47% ตามลำดับ และพบว่ามีกรดอะมิโนบนโปรตีน 2b ที่แตกต่างจากไอโซเลทอื่นอยู่ในบริเวณสำคัญของ nuclear localization signal (NLS) และ silencing suppressor activity domain

Ye *et al.* (2009) รายงานว่าลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 62-71 (<sup>62</sup>GSELIEMYHH<sup>71</sup>) ของโปรตีน 2b มีความสำคัญต่อการยับยั้งกระบวนการ gene silencing ของพืชและเกี่ยวข้องกับลักษณะอาการบนพืช จากการศึกษายีน 2b ในงานวิจัยนี้พบว่าส่วนของ NLS ทั้ง 2 แห่งในเชื้อ CMV ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้าน รวม 9 ไอโซเลท มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนดังกล่าวแล้วข้างต้น ยกเว้น ไอโซเลท SNK ที่พบว่ามีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 22 เป็น K และตำแหน่ง

ที่ 24 เป็น R (<sup>22</sup>KRRRRK<sup>27</sup> คู่ตำแหน่งที่ขีดเส้นใต้) ส่วนลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 62-71 พบใน ไอโซเลท A27 ซึ่งแตกต่างออกไปเพียง 1 ตำแหน่งคือ 68H (<sup>62</sup>GSELIEHHH<sup>71</sup>) และไอโซเลท SNK พบ 3 ตำแหน่งคือ 66M, 69H, และ 70R (<sup>62</sup>GSELMEMHRH<sup>71</sup>) มีข้อสังเกตจากการทดลองนี้ ว่าไอโซเลท SNK ทำให้ยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc แสดงอาการใบด่างแบบไม่รุนแรง ร่วมกับอาการใบบิดเป็นเกลียว (ภาพที่ 9x) โดยที่พบว่าลำดับกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 62-71 ของ ไอโซเลท SNK มีความแตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆ

#### 5.1.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อ CMV จาก phylogenetic tree

การวิเคราะห์ด้วยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน 2b สามารถแยกกลุ่มเชื้อ subgroup I ออกจาก subgroup II รวมทั้งแยก subgroup IA และ IB ออกจากกันได้ นอกจากนี้ยังสามารถแยก กลุ่มเชื้อ CMV จากประเทศไทยออกจากไอโซเลทอื่นที่พบในต่างประเทศได้ (ภาพที่ 21) กลุ่มเชื้อ CMV ที่พบในประเทศไทยนั้น แบ่งออกได้ 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มแรกประกอบด้วยเชื้อ CMV 9 ไอโซเลทที่แยกจากแดงกวาและแดงร้านจับกลุ่มกับไอโซเลท 30RS KPS10 และ SG44 ที่พบใน พริก กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท SNK จากแดงร้านจับกลุ่มใกล้ชิดกับไอโซเลท ML25 จากเมลอน

ตารางที่ 8 Accession number ในฐานข้อมูล GenBank ของยีน 2b CP และ 3' NTR ของเชื้อ CMV ที่แยกได้จากแตงกวา แตงร้านและพืชอื่นในการศึกษานี้

ไอโซเลข	GenBank accession number		
	ยีน 2b	ยีน CP	3' NTR
A168	FN 298512	FN 552542	FN 552603
A27	FN 552594	FN 552545	FN 552604
BK16	FN 552595	FN 552546	FN 552605
C113	FN 552596	FN 552544	FN 552606
CRI	FN 552597	FM 999065	FN 552607
HC53	FN 298510	FM 999063	FN 552608
HC56	FN 298511	FM 999062	FN 552609
PBR	FN 552599	FN 552543	FN 552610
SK211	FN 298513	FM 999064	FN 552611
SNK	FN 552598	FM 999066	FN 552612
30RS	FN 552601	AY60555 <sup>1/</sup>	FN 552614
KPS10	FN 552602	EF608461 <sup>1/</sup>	NA <sup>2/</sup>
ML25	FN 552600	FM 999067	FN 552613

หมายเหตุ <sup>1/</sup> มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล GenBank อยู่ก่อนแล้ว

<sup>2/</sup> NA: ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 9 เชื้อ *Cucumber mosaic virus* จากฐานข้อมูล GenBank ที่นำมาวิเคราะห์สายสัมพันธ์และสร้าง phylogenetic tree

ไอโซเลต	Subgroup	พืชอาศัย	แหล่งที่พบ	GenBank accession number		
				ยีน 2b	ยีน CP	3' NTR
Fny	IA	มันฝรั่ง	สหรัฐอเมริกา	D00355	D10538	D10538
O	IA	แตงกวา	ญี่ปุ่น	D10209	D00385	D00385
Pepo	IA	สควอช	ญี่ปุ่น	AB124835	AF103991	AF103991
Ri-8	IA	มะเขือเทศ	สเปน	AM183118	AM183119	AM183119
Rs	IA	แรดิช	อังกฤษ	AJ517801	AB290154	AB290154
KS44	IB	พริก	ไทย	NA	AJ810259	NA
SG15	IB	พริก	ไทย	NA	AY560556	NA
TR15	IB	แตงกวา	ไทย	NA	AJ810264	NA
Cb7	IB	มะเขือเทศ	จีน	DQ785470	EF216867	EF216867
SD	IB	ยาสูบ	จีน	D86330	AB008777	AB008777
Nt9	IB	มะเขือเทศ	ไต้หวัน	D28779	D28780	D28780
Tfn	IB	มะเขือเทศ	อิตาลี	Y16925	Y16926	Y16926
Tn	II	มะเขือเทศ	ญี่ปุ่น	AB176848	AB176847	AB176847
Q	II	พริก	ออสเตรเลีย	X00985	M21464	M21464

หมายเหตุ NA: ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 10 เปรูเซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน 2b ของ *Cucumber mosaic virus* 10 ไอโซเลทที่แยกจากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย

ไอโซเลท	← กรดอะมิโน →									
	A168	A27	BK16	C113	CRI	HC53	HC56	SNK	PBR	SK211
A168		99	97	100	99	99	100	87	99	100
A27	99		96	99	98	98	99	88	98	99
BK16	99	98		97	96	96	97	86	96	97
C113	100	99	99		99	99	100	87	99	100
CRI	99	98	98	99		98	99	86	98	99
HC53	100	98	99	99	99		99	86	100	99
HC56	100	99	99	100	99	100		87	99	100
SNK	90	90	90	90	90	90	90		86	87
PBR	99	98	98	99	100	99	99	90		99
SK211	100	99	99	100	99	100	100	90	99	

← นิวคลีโอไทด์ →

		20		40		
SD	ATGGAATTGA	ACGAAGGCGC	AATGACAAAC	GTCGAACTCC	AACTGGCTCG	50
A168	.....	.T..T..	.G.....	.....	.G.....	50
A27	.....	.T..T..	.G.....	.....	.....	50
BK16	.....	.T..T..	.G.....	.....	.G.....	50
C113	.....	.T..T..	.G.....	.....	.G.....	50
CRI	.....	.T..T..	.G.....	.....	.G.....	50
HC53	.....	.T..T..	.G.....	.....	.G.....	50
HC56	.....	.T..T..	.G.....	.....	.G.....	50
SNK	.....	.T..T..	.G.....	.....	.G.....	50
PBR	.....	.T..T..	.G.....	.....	.G.....	50
SK211	.....	.T..T..	.G.....	.....	.G.....	50
		60		80		100
SD	TATAGTGGAG	GCGAAGAGGC	AGAGACGAAG	GTCTCACAAG	CAGAATCGAC	100
A168	..GA.....	.T.G..A..	.A.....A	.....	.A.....	100
A27	..GA.....	.T.G..A..	.A.....A	.....	.A.....	100
BK16	..GA.....	.T.G..A..	.A.....A	.....	.A.....	100
C113	..GA.....	.T.G..A..	.A.....A	.....	.A.....	100
CRI	..GA.....	AT.G..A..	.A.....A	.....	.A.....	100
HC53	..GA.....	.T.G..A..	.A.....A	.....	.A.....	100
HC56	..GA.....	.T.G..A..	.A.....A	.....	.A.....	100
SNK	C..GA.....	.T.G..A..	.G.....A	.....	.AC.....	100
PBR	..GA.....	AT.G..A..	.A.....A	.....	.A.....	100
SK211	..GA.....	.T.G..A..	.A.....A	.....	.A.....	100
		120		140		
SD	GGGAACGAGG	TCACAAAAGT	CCCAGCGAGA	GGGCGCGTTC	AAATCTCAGG	150
A168	.....	.....	.....	.A.....	.A.....	150
A27	.....	.....	.....	.A.....	.A.....	150
BK16	.....	.T.....	.....	.A.....	.A.....	150
C113	.....	.....	.....	.A.....	.A.....	150
CRI	.....	.....	.....	.A.....	.A.....	150
HC53	.....	.....	.....	.A.....	.A.....	150
HC56	.....	.....	.....	.A.....	.A.....	150
SNK	.....	.....	.....	.A.....	.A.....	150
PBR	.....	.....	.....	.A.....	.A.....	150
SK211	.....	.....	.....	.A.....	.A.....	150
		160		180		200
SD	CTGTTCCGCT	TCCTACCATT	CTATCAAGTA	GATGGTTCGG	AACTGATAGA	200
A168	..A.....A	.TT...G..	T.....GA	.....	.....	200
A27	..A.....A	.TT...G..	T.....GA	.....	.....	200
BK16	..A.....A	.TT...G..	T.....GA	.....	.....	200
C113	..A.....A	.TT...G..	T.....GA	.....	.....	200
CRI	.....	.TT...G..	T.....GA	.....	.A.....	200
HC53	..A.....A	.TT...GC	T.....GA	.....	.....	200
HC56	..A.....A	.TT...G..	T.....GA	.....	.....	200
SNK	.....	.....	T.....	.....	.G.....	200
PBR	.....	.TT...G..	T.....GA	.....	.A.....	200
SK211	..A.....A	.TT...G..	T.....GA	.....	.....	200

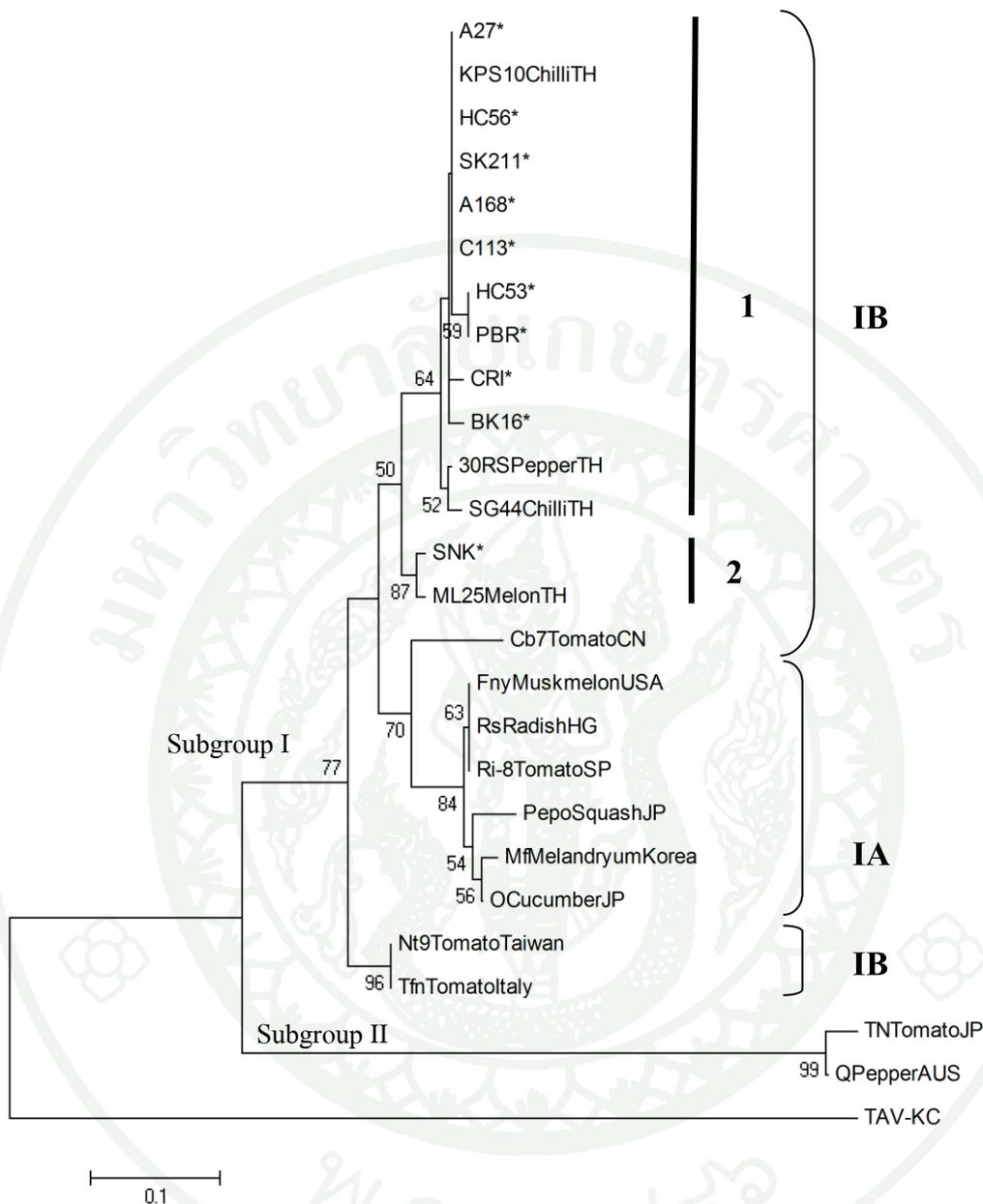
ภาพที่ 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 2b ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่ศึกษา เปรียบเทียบกับ ไอโซเลท SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5 (ชื่อไอโซเลทดูจากตารางที่ 8) จุด (.) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับไอโซเลท SD ตัวอักษร A, G, T, C ระบุนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากไอโซเลท SD

		220		240	
SD	<b>GATGTACCAC</b>	<b>CATGTGAACA</b>	<b>TGGTGGGATT</b>	<b>GTCCGAGTCT</b>	<b>GAGGCCCTT</b> 250
A168	.....	..C.C..GTG	.....A...	.....	.....T...C 250
A27	...C.....	..C.C..GTG	.....A...	.....	.....T...C 250
BK16	.....	..C.C.GGTG	.....A...	.....	.....T...C 250
C113	.....	..C.C..GTG	.....A...	.....	.....T...C 250
CRI	.....	..C.C..GTG	.....A...	.....	.....T...C 250
HC53	.....	..C.C..GTG	.....A...	.....	.....T...C 250
HC56	.....	..C.C..GTG	.....A...	.....	.....T...C 250
SNK	...C...G.	..C.....G	...C.AA..C	C.....	.....T...C 250
PBR	.....	..C.C..GTG	.....A...	.....	.....T...C 250
SK211	.....	..C.C..GTG	.....A...	.....	.....T...C 250
		260		280	
SD	<b>GTTTTACGTT</b>	<b>GCCAGCGGAA</b>	<b>GAAGACCATG</b>	<b>ATTTTCGACGA</b>	<b>TACGGATTGG</b> 300
A168	.G.....	A.....	.....	.....T.....	C..A..... 300
A27	.G.....A..	A..G.....	.....	.....T.....	C..A..... 300
BK16	.G.....	A.....	.....	.....T.....	C..A..... 300
C113	.G.....	A.....	.....	.....T.....	C..A..... 300
CRI	.G.....	A.....	.....	.....T.....	C..A..... 300
HC53	.G.....	A.....	.....	.....T.....	C..A..... 300
HC56	.G.....	A.....	.....	.....T.....	C..A..... 300
SNK	.G.....	A..G.T.....	.....	.....T.....	..A..... 300
PBR	.G.....	A.....	.....	.....T.....	C..A..... 300
SK211	.G.....	A.....	.....	.....T.....	C..A..... 300
		320			
SD	<b>TTCGCTGGTA</b>	<b>ACGAGTGGGC</b>	<b>GGAAGGTCGT</b>	<b>TTCTGA</b>	336
A168	.....	.T..A.....	.....GCA	..T...	336
A27	.....	.T..A.....	.....GCG	..T...	336
BK16	.....	.T..T.....	.....GCG	..T...	336
C113	.....	.T..A.....	.....GCG	..T...	336
CRI	.....	.T..A.....	.....GCG	..T...	336
HC53	.....	.T..A.....	.....GCA	..T...	336
HC56	.....	.T..A.....	.....GCA	..T...	336
SNK	.....	.....	.....GCG	..T...	336
PBR	.....	.T..A.....	.....GCG	..T...	336
SK211	.....	.T..A.....	.....GCA	..T...	336

ภาพที่ 17 (ต่อ)

				20		NLS		NLS	40			
SD	MELNEGAMTN	VELQLARIVE	AKRQRRRSHK	QNR	RRER	GHKS	P	SERARSNLR	50			
A168	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	VR . . . . . K . . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	50			
A27	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	VR . . . . . K . . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	50			
BK16	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	VR . . . . . K . . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . Y . . . . .	. . . . .	50			
C113	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	VR . . . . . K . . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	50			
CRI	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	MR . . . . . K . . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	50			
HC53	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	VR . . . . . K . . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	50			
HC56	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	VR . . . . . K . . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	50			
SNK	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	V . . . . . R . . . . .	K . . . . .	T . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	50			
PBR	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	VR . . . . . K . . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	50			
SK211	. . . . . V . . . . . V . . . . .	. . . . . MM .	VR . . . . . K . . . . .	K . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	50			
		60			80				100			
SD	LFRFLPFYQV	DGSELIEMYH	HVNMVGLSES	EAPCFTLP	AE	EDHDFDDTDW	100					
A168	. . . . . I . . . . .	. . . . .	ASV . E . . . . .	R . . . . .	. . . . .	. . . . .	100					
A27	. . . . . I . . . . .	. . . . . H . . . . .	ASV . E . . . . .	R . . . . .	. . . . .	. . . . .	100					
BK16	. . . . . I . . . . .	. . . . .	AGV . E . . . . .	R . . . . .	. . . . .	. . . . .	100					
C113	. . . . . I . . . . .	. . . . .	ASV . E . . . . .	R . . . . .	. . . . .	. . . . .	100					
CRI	. . . . . I . . . . .	. . . . .	ASV . E . . . . .	R . . . . .	. . . . .	. . . . .	100					
HC53	. . . . . L . . . . . I . . . . .	. . . . .	ASV . E . . . . .	R . . . . .	. . . . .	. . . . .	100					
HC56	. . . . . I . . . . .	. . . . .	ASV . E . . . . .	R . . . . .	. . . . .	. . . . .	100					
SNK	. . . . . I . . . . .	. . . . . M . HR . . . . .	. . . . . VAKS . . . . .	RV . . . . .	V . . . . .	. . . . .	100					
PBR	. . . . . L . . . . . I . . . . .	. . . . .	ASV . E . . . . .	R . . . . .	. . . . .	. . . . .	100					
SK211	. . . . . I . . . . .	. . . . .	ASV . E . . . . .	R . . . . .	. . . . .	. . . . .	100					
		Silencing suppressor activity domain										
SD	FAGNEWAEGR	F	111									
A168	. . . . . A . . . . .	. . . . .	111									
A27	. . . . . A . . . . .	. . . . .	111									
BK16	. . . . . D . . . . . A . . . . .	. . . . .	111									
C113	. . . . . A . . . . .	. . . . .	111									
CRI	. . . . . A . . . . .	. . . . .	111									
HC53	. . . . . A . . . . .	. . . . .	111									
HC56	. . . . . A . . . . .	. . . . .	111									
SNK	. . . . . A . . . . .	. . . . .	111									
PBR	. . . . . A . . . . .	. . . . .	111									
SK211	. . . . . A . . . . .	. . . . .	111									

ภาพที่ 18 ลำดับกรดอะมิโนของยีน 2b ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่ศึกษา เปรียบเทียบกับ ไอโซเลท SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5 (ชื่อไอโซเลทดูจากตารางที่ 8) กรอบสี่เหลี่ยม แสดงโดเมนสำคัญของโปรตีนนี้คือ NLS: arginine-rich nuclear localization signal และ Silencing suppressor activity domain จุด (.) ระบุกรดอะมิโนที่เหมือนกับไอโซเลท SD ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ ระบุชนิดกรดอะมิโนที่แตกต่างจากไอโซเลท SD



ภาพที่ 19 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของยีน 2b แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย (ไอโซเลทที่มีเครื่องหมาย\*) กับ ไอโซเลทจากพืชอื่นในประเทศไทย และในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อ *Tomato aspermy virus* ไอโซเลท KC (TAV-KC) เป็น outgroup

## 5.2 ยีน CP

### 5.2.1 ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

ทุกไอโซเลทที่ศึกษามีขนาด 657 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 20) แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 218 เรซิดิวส์ จำนวนน้ำหนักรวมของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคได้ 24.7-24.12 กิโลดาลตัน ความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ระหว่าง 10 ไอโซเลทเฉลี่ยเท่ากับ 14 % โดยมีลักษณะที่เป็น base transition ระหว่างไอโซเลทต่าง ๆ ทั้ง A/G และ T/C รวมกันเท่ากับ 70% ส่วนลักษณะที่เป็น transversion รวมทั้งหาค่าสูงถึง 30% ซึ่งมากกว่าที่พบในกรณีของยีน 2b ไอโซเลทที่มีนิวคลีโอไทด์แตกต่างจากกลุ่มมากที่สุดได้แก่ SNK รองลงมาได้แก่ SK211, PBR และ C113 ตามลำดับ โดยที่ตำแหน่งที่มีความผันแปรแบบ transversion ได้แก่ช่วงนิวคลีโอไทด์ที่ 213-250, 277, 281, 361, 409, 411, 477, 533, 546, 555, 561, 609 และ 639 ทั้ง 4 ไอโซเลทนี้มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 91-95% ในขณะที่อีก 6 ไอโซเลทมีความคล้ายคลึงกันมากที่ระดับ 97-98% อย่างไรก็ตาม นิวคลีโอไทด์ที่พบว่าแตกต่างกันเหล่านี้ไม่ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโนในส่วนที่เป็นโดเมนสำคัญของโปรตีน CP เช่นที่ตำแหน่ง 129 proline (Pro) และ 162 alanine (Ala) ที่ทำให้เชื้อ CMV เกิดการถ่ายทอดได้ด้วยเปลือกอ่อนพาหะ (ภาพที่ 21)

จากการทำ multiple alignment ทั้ง 10 ไอโซเลทมีความคล้ายคลึงกันของนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 89%-99% และ 92%-100% ตามลำดับ โดยพบว่า ไอโซเลท SNK มีความแตกต่างจากไอโซเลทอื่นมากที่สุด (ตารางที่ 11) นอกจากนี้ยังมีความคล้ายคลึงกับ subgroup IB จากพืชอื่นที่ระดับ 91-100% และ 93-100% คล้ายคลึงกับ subgroup IA ที่ระดับ 89-95% และ 92-98% และคล้ายคลึงกับ subgroup II ที่ระดับ 73-77% และ 78-83% ตามลำดับ

ในการศึกษาด้านความผันแปรของนิวคลีโอไทด์โดย Schineider and Roossinck (2001) ก็พบว่าความผันแปรของนิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ CMV ส่วนใหญ่จะเป็นความผันแปรแบบ transition สูงถึง 74.56% และพบแบบ transversion เพียง 25.44% ส่วนที่แตกต่างกันกับการศึกษาครั้งนี้คือความผันแปรที่พบจะเป็นการเปลี่ยนแปลงเบสจาก G เป็น A มากที่สุดคือ 41 เบส จาก 114 เบส ในขณะที่ไอโซเลทจากแตงกวาที่ศึกษานี้มีความผันแปรของ T/C จำนวน 26 เบสใน 107 เบส ซึ่งมากกว่า A/G จำนวน 14 เบสใน 107 เบส

### 5.2.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์จาก Phylogenetic tree

การวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 22) ของยีน CP แบ่งเชื้อ CMV ออกได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย CMV จากแตงกวา (ไอโซเลท BK16, C113, A27, HC53, HC56, CRI และ A168) และพริกในประเทศไทย (ไอโซเลท SG15, KPS10, 30RS และ KS44) กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย CMV จากแตงกวาและแตงร้านจับกลุ่มอยู่กับ CMV จากต่างประเทศ โดยพบว่า ไอโซเลท PBR จากแตงร้านจับกลุ่มใกล้ชิดกับ ไอโซเลท TR15 จากแตงร้าน ไอโซเลท Cb7, Tfm และ Nt9 จากมะเขือเทศในต่างประเทศ ไอโซเลท SNK และ SK211 จากแตงร้าน กับ ML25 จากเมลอนในประเทศไทย และ SD จากยาสูบในต่างประเทศ

การวิเคราะห์ด้วยกรดอะมิโนแบ่ง CMV ออกได้ 2 กลุ่ม (ภาพที่ 23) กลุ่มแรกประกอบด้วย CMV จากแตงกวาและแตงร้าน (ไอโซเลท BK16, C113, A27, HC53, HC56, CRI และ A168) และพริกในประเทศไทย (ไอโซเลท SG15, KPS10, 30RS และ KS44) และยังพบว่า ไอโซเลท PBR จากแตงร้านจับกลุ่มใกล้ชิดกับ ไอโซเลท TR15 จากแตงร้าน ไอโซเลท Cb7 จากมะเขือเทศในต่างประเทศ กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท SNK และ SK211 จากแตงร้าน กับ ML25 จากเมลอนในประเทศไทย และ SD จากยาสูบ Tfm และ Nt9 จากมะเขือเทศ ในต่างประเทศ

Lin *et al.* (2003) รายงานว่ายีน CP ของ CMV ที่แยกจากพืชตระกูลแตงในมลรัฐแคลิฟอร์เนียมีความอนุรักษ์สูง โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกันที่ 97-98% และยีน 2b และ 3' NTR มีความผันแปรมากกว่ายีน CP แต่จากการศึกษาเชื้อ CMV จากแตงกวาในครั้งนี้พบว่ายีน CP มีความผันแปรที่เป็นแบบ transversion มากกว่ายีน 2b

ตารางที่ 11 เปรูเซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CP ของ *Cucumber mosaic virus* 10 ไอโซเลทที่แยกจากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย

ไอโซเลท	← กรดอะมิโน →									
	A168	A27	BK16	C113	CRI	HC53	HC56	SNK	PBR	SK211
A168		100	100	100	95	100	100	97	99	98
A27	99		100	100	95	100	100	96	98	98
BK16	98	98		100	95	100	100	97	99	98
C113	95	96	97		95	100	100	97	99	98
CRI	98	98	98	95		95	95	92	94	94
HC53	98	99	98	96	98		100	97	99	98
HC56	99	99	98	96	98	98		97	99	98
SNK	92	92	91	89	92	91	92		98	98
PBR	93	93	93	91	93	93	93	93		99
SK211	93	93	93	91	93	93	93	95	94	
	← นิวคลีโอไทด์ →									

		20		40	
SD	ATGGACAAAT	CTGAATCAAC	CAGTGCTGGT	CGTAACCGTC	GACGTCGTCC
A168	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....
A27	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....
BK16	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....
C113	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....
CRI	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....
HC53	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....
HC56	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....
SNK	.....	.....	.....	.....	.....
PBR	.....	.....	.....	.....C.....	.....
SK211	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....
	60		80		100
SD	GCGTCGTGGT	TCCCGCTCCG	CTTCCTCCTC	CGCGGATGCC	AACTTTAGAG
A168	.....C.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....CA.....
A27	.....C.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....CA.....
BK16	.....C.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....CA.....
C113	.....C.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....CA.....
CRI	.....C.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....CA.....
HC53	.....C.....	.....	.....	.....T.....	.....CA.....
HC56	.....C.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....CA.....
SNK	.....	.....	.....C.....	.....T.....	.....T.....G.....
PBR	.....C.....	.....	.....	.....T.....	.....T.....C.....
SK211	.....	.....	.....	.....T.....	.....T.....
	120		140		
SD	TCCTGTCGCA	GCAACTTTTCG	CGACTTAATA	AGACGTTGGC	AGCTGGTCGT
A168	.....	.....A.....G.....	.....	.....A.....	.....
A27	.....	.....A.....G.....	.....	.....A.....	.....A.....
BK16	.....	.....A.....G.....	.....C.....	.....A.....	.....
C113	.....	.....A.....G.....	.....C.....	.....A.....	.....
CRI	.....	.....A.....G.....	.....	.....A.....	.....
HC53	.....	.....A.....G.....	.....	.....A.....	.....
HC56	.....	.....A.....G.....	.....C.....	.....A.....	.....
SNK	.....T.....	.....G.....	.....C.....	.....A.....	.....
PBR	.....	.....G.....	.....	.....A.....	.....
SK211	.....	.....A.....G.....	.....C.....	.....A.....	.....
	160		180		200
SD	CCTACTATTA	ACCACCCAAC	CTTTGTGGGG	AGTGAACGTT	GTA AACCTGG
A168	.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
A27	.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
BK16	.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
C113	.....	.....	.....T.....	.....G.....C.....	.....C.....
CRI	.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
HC53	.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
HC56	.....	.....	.....T.....	.....G.....	.....
SNK	.....A.....C.....	.....	.....T.....	.....	.....
PBR	.....A.....	.....	.....T.....	.....C.....	.....
SK211	.....A.....C.....	.....	.....T.....	.....C.....	.....

**ภาพที่ 20** ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่ศึกษา เปรียบเทียบกับ ไอโซเลท SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5 (ชื่อไอโซเลทดูจากตารางที่ 8)  
 จุด (.) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับไอโซเลท SD  
 ตัวอักษร A, G, T, C ระบุนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากไอโซเลท SD

		220		240	
SD	GTACACGTTT	TCATCTATTA	CCCTGAAGCC	ACCGAAAATA	GACCGCGGGT 250
A168	A . . . . .	A . C . . G . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . AAA . . T . . 250
A27	A . . . . .	A . C . . G . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . AAA . . . . 250
BK16	A . . . . .	A . C . . G . . . . .	. . . . .	. . . A . . . . .	. . . AAG . . T . . 250
C113	A . . . . .	A . C . . G . . . . .	. . . . .	. . . A . . . . .	C . . AAG . CC . 250
CRI	A . . . . .	A . C . . G . . . . .	. . . . .	. . . A . . . . .	. . . AAA . . T . . 250
HC53	A . . . . .	A . C . . G . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . TAAA . . T . . 250
HC56	A . . . . .	A . C . . G . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . AAA . . T . . 250
SNK	. . . . .	A . . . . . CG	. . . . . GA . . . . .	. . . . . G . . . . .	. . . . . T . . . . 250
PBR	A . . . . .	A . G . . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . . T . . . . 250
SK211	. . . . .	A . . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . T . . . . 250
		260		280	
SD	CTTATTATGG	TAAAAGGTTG	TTACTACCTG	ATTCAGTCAC	GGAATTCGAT 300
A168	. . . . .	C . . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	T . . G . . . . 300
A27	. . . . .	C . . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	T . . G . . . . 300
BK16	. . . . .	C . . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	T . . G . . . . 300
C113	. . . . .	C . . . . .	C . . . . C . . . .	. . . . .	T . . G . . . . 300
CRI	. C . . . . .	C . . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	T . . G . . . . 300
HC53	. . . . .	C . . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	T . . G . . . . 300
HC56	. . . . .	C . . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	T . . G . . . . 300
SNK	. . . . .	. . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . G . . . . 300
PBR	. . . . .	. . . . .	. . . . . G . . . . .	. . . . .	. . . G . . . . 300
SK211	. . . . .	. . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	A . . G . . . . 300
		320		340	
SD	AAGAAGCTTG	TTTCGCGCAT	TCAAATTCGA	GTTAATCCTT	TGCCGAAATT 350
A168	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 350
A27	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 350
BK16	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 350
C113	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 350
CRI	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 350
HC53	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 350
HC56	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 350
SNK	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 350
PBR	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . C . . . . .	. . . . . 350
SK211	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . . 350
		360		380	
SD	TGATTCTACC	GTGTGGGTGA	CGGTCCGTAA	AGTTCCTGCC	TCCTCGGACC 400
A168	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 400
A27	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 400
BK16	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 400
C113	. . . . .	C . . C . . C . .	. . . C . . A . .	. . . . .	. . . . . 400
CRI	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 400
HC53	. . . . .	. . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . . 400
HC56	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 400
SNK	C . . . . .	. . . . .	. . . A . . . . .	. . . . .	. . . . . T . . . . 400
PBR	. . . . .	. . . . .	. . . A . . G . .	. . . . .	. . . . . T . . . . 400
SK211	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . A . . . . .	. . . . .	. . . . . T . . . . 400
		420		440	
SD	TGTCCGTTGC	CGCCATCTCT	GCTATGTTTG	CGGACGGAGC	CTCACCGGTA 450
A168	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . . 450
A27	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . . 450
BK16	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . . 450
C113	. . . . . T . . . . .	. C . . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . . 450
CRI	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . . 450
HC53	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . . 450
HC56	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . . 450
SNK	. A . . . . .	. . . . .	. . . . . C . . . . .	. . . . .	. . . . . 450
PBR	. A . . . . .	. . . . . T . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . 450
SK211	. A . . . . . A . . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . .	. . . . . A . . . . 450

ภาพที่ 20 (ต่อ)

		460		480		500	
SD	<b>CTGGTTTATC</b>	<b>AGTATGCTGC</b>	<b>ATCCGGAGTC</b>	<b>CAAGCCAACA</b>	<b>ATAAATTGTT</b>	500	
A168	.....	.....C.....	.....T.C.T.....	.....C.....	.....C.....	500	
A27	.....	.....C.....	.....T.C.T.....	.....C.....	.....C.....	500	
BK16	.....	.....	.....T.T.T.....	.....	.....C.....	500	
C113	.....	.....	.....T.T.T.....	.....	.....C.....	500	
CRI	.....	.....	.....T.C.T.....	.....	.....C.....	500	
HC53	.....	.....	.....T.C.T.....	.....	.....C.....	500	
HC56	.....	.....C.....	.....T.C.T.....	.....	.....C.....	500	
SNK	.....	.....CA.C.....	.....T.....	.....	.....C.....	500	
PBR	.....G.....	.....C.....	.....C.T.....	.....	.....C.....	500	
SK211	.....	.....C.....	.....	.....	.....	500	
		520		540			
SD	<b>GTATGATCTT</b>	<b>TCGGCGATGC</b>	<b>GCGCTGATAT</b>	<b>TGGCGACATG</b>	<b>CGAAAGTACG</b>	550	
A168	.....	.....A.T.....	.....T.....	.....A.....	.....	550	
A27	.....	.....A.T.....	.....T.....	.....A.....	.....	550	
BK16	.....C.....	.....A.T.....	.....T.T.....	.....A.....	.....	550	
C113	.....C.....	.....A.T.....	.....CT.T.....	.....A.....C.....	.....	550	
CRI	.....	.....A.T.....	.....T.....	.....A.....	.....	550	
HC53	.....	.....A.T.....	.....T.....	.....A.....	.....	550	
HC56	.....	.....A.T.....	.....C.....	.....T.....	.....A.....	550	
SNK	.....	.....	.....T.....	.....T.....	.....	550	
PBR	.....	.....A.....	.....T.....	.....C.T.....	.....A.....	550	
SK211	.....	.....	.....T.....	.....T.....	.....T.....	550	
		560		580		600	
SD	<b>CCGTTCTCGT</b>	<b>GTATTCAAAA</b>	<b>GACGATGCTC</b>	<b>TCGAGACGGA</b>	<b>TGAGTTAGTA</b>	600	
A168	.....G.....	.....	.....G.....	.....C..AC.....	.....	600	
A27	.....G.....	.....	.....G.....	.....C.....	.....	600	
BK16	.....G.....	.....	.....G.....	.....C.....	.....	600	
C113	.....G.....	.....G.....	.....G.G.G.....	.....C.....	.....	600	
CRI	.....G.....	.....	.....G.T.....	.....AC.....G	.....	600	
HC53	.....T.G.....	.....	.....G.....	.....AC.....	.....	600	
HC56	.....G.....	.....	.....G.....	.....C.....	.....	600	
SNK	.....	.....	.....A.T.....	.....C.....	.....	600	
PBR	.....C.....	.....	.....G.....	.....C..C.G.....	.....	600	
SK211	.....	.....	.....A.....	.....C.....	.....	600	
		620		640			
SD	<b>CTTCATGTCG</b>	<b>ACATTGAGCA</b>	<b>CCAACGCATT</b>	<b>CCCACGTCTG</b>	<b>GGGTGCTCCC</b>	650	
A168	.....G.....	.....	.....	.....C.....	.....	650	
A27	.....T.....	.....	.....	.....	.....	650	
BK16	.....T.....	.....	.....	.....	.....	650	
C113	.....T.....	.....	.....	.....	.....	650	
CRI	.....	.....C.....	.....	.....C.....	.....	650	
HC53	.....T.....	.....	.....	.....T.....	.....	650	
HC56	.....T.....	.....	.....	.....C.....	.....	650	
SNK	.....C.....	.....	.....T.....	.....A.....	.....	650	
PBR	.....	.....	.....T.....	.....A.C.....	.....	650	
SK211	.....	.....	.....	.....A.....	.....	650	
SD	<b>AGTTTGA</b>	657					
A168	.....	657					
A27	.....C.....	657					
BK16	.....	657					
C113	.....C.....	657					
CRI	.....C.....	657					
HC53	.....C.....	657					
HC56	.....C.....	657					
SNK	.....C.....	657					
PBR	.....C.....	657					
SK211	.....C.....	657					

ภาพที่ 20 (ต่อ)

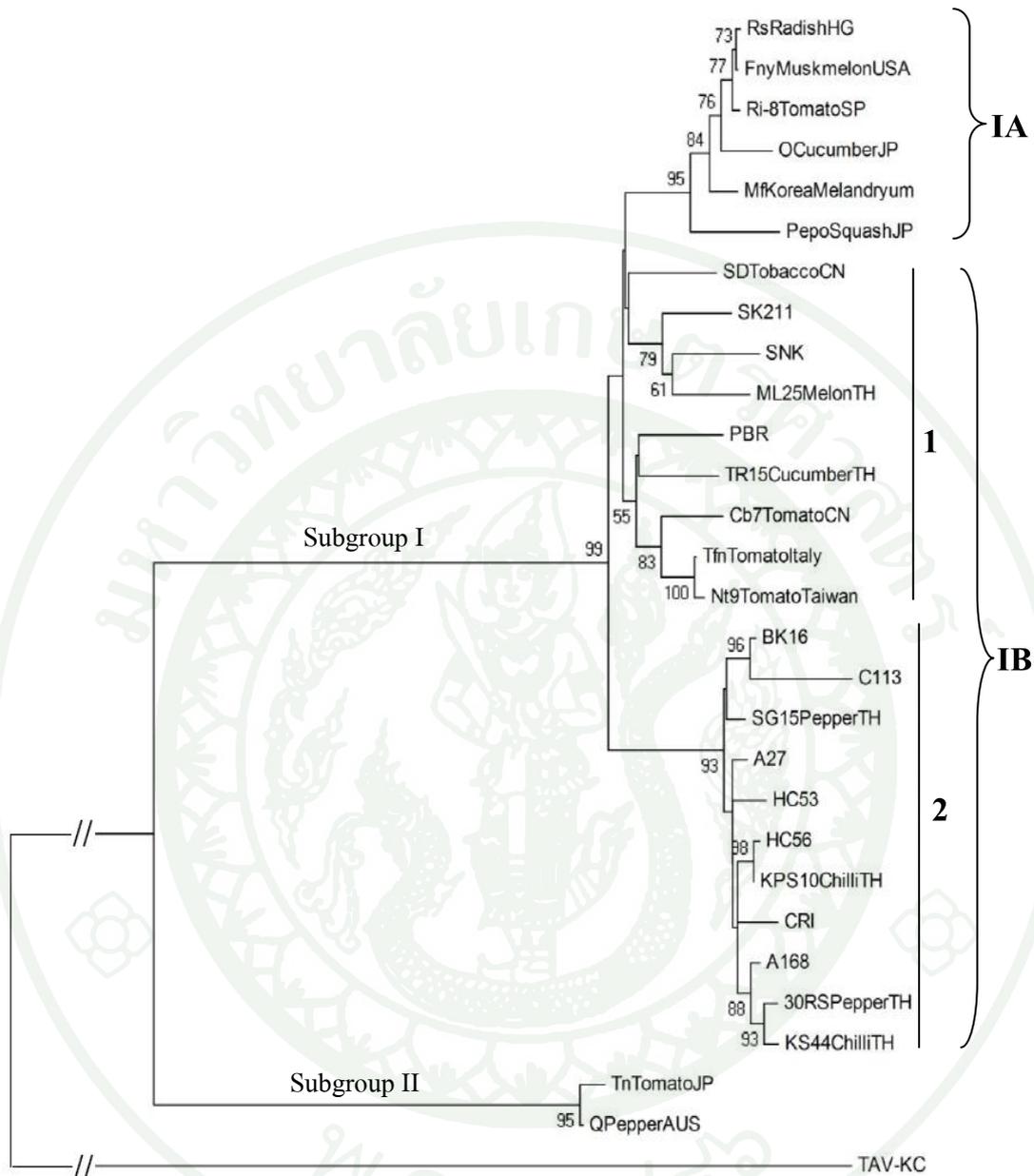
Conserved arginine rich motif

SD	MDKSEST	SAG	RNNRRRR	PRRG	SRSASS	SADA	NFRVLS	QQLS	RLNKT	LAAGR	50
A168	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	50
A27	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T	50
BK16	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	50
C113	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	50
CRI	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	50
HC53	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	50
HC56	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	50
SNK	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	50
PBR	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	50
SK211	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	50
SD	PTINHPT	FVVG	SERCKP	GYTF	SSITLK	PKPKI	DRGSYY	GKRL	LLPDSV	TEFD	100
A168	.	.	.	.	T	.	.	K	.	.	100
A27	.	.	.	.	T	.	.	K	.	.	100
BK16	.	.	.	.	T	.	.	K	.	.	100
C113	.	.	.	.	T	.	.	HKA	.	.	100
CRI	.	.	.	.	T	.	.	K	.	.	100
HC53	.	.	.	.	T	.	.	K	.	.	100
HC56	.	.	.	.	T	.	.	K	.	.	100
SNK	.	.	.	.	T	A	R	.	.	.	100
PBR	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	100
SK211	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	100
SD	KKLVSR	IQIR	VNPLPK	FDST	VWVTVR	KVPA	SSDLSV	AAIS	AMFADG	ASPV	150
A168	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	150
A27	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	150
BK16	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	150
C113	.	.	.	.	LRA	A	.	SP	.	.	150
CRI	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	150
HC53	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	150
HC56	.	.	.	.	.	.	.	S	.	.	150
SNK	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	150
PBR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	150
SK211	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	150
SD	LVIYQYA	AASGV	QANNKLL	YDL	SAMRAD	IGDM	RKYAVL	LVYSK	DDALET	DELV	200
A168	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	200
A27	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	200
BK16	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	200
C113	.	.	.	.	.	V	A	N	.	E	200
CRI	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	200
HC53	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	200
HC56	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	200
SNK	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	200
PBR	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	200
SK211	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	200
SD	LHVDIEH	QRI	PTSGV	LPV							218
A168	.	.	.	.							218
A27	.	.	.	.							218
BK16	.	.	.	.							218
C113	.	.	.	.							218
CRI	.	.	.	.							218
HC53	.	.	.	.							218
HC56	.	.	.	.							218
SNK	.	.	.	.							218
PBR	.	.	.	.							218
SK211	.	.	.	.							218

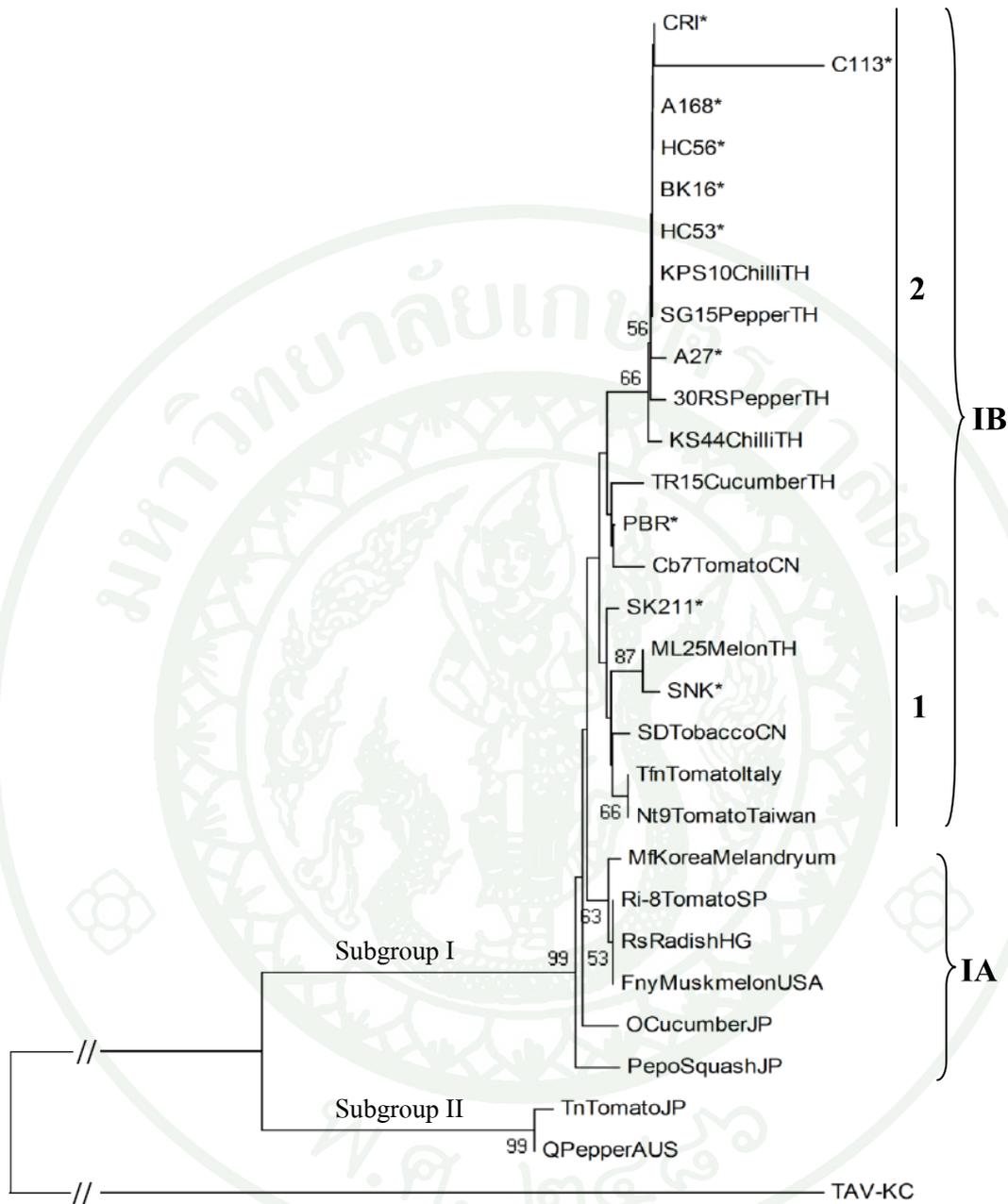
ภาพที่ 21 ลำดับกรดอะมิโนของยีน CP ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่ศึกษา เปรียบเทียบกับ ไอโซเลต SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5 (ชื่อไอโซเลตดูจากตารางที่ 8) กรอบสี่เหลี่ยม แสดง Conserved arginine rich motif, 129: กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 129, 162: กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 162 และ BH-BI loop จุด (.) ระบุกรดอะมิโนที่เหมือนกับไอโซเลต SD ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ ระบุชนิดกรดอะมิโนที่แตกต่างจากไอโซเลต SD

การศึกษาคั้งนี้ที่พบว่า CMV ที่แยกได้จากแตงกวาในประเทศไทยนั้นมีความผันแปรของจีโนมน้อยและจับกลุ่มใกล้เคียงกัน อีกทั้งใกล้เคียงกับบางไอโซเลทจากพริกในประเทศไทยด้วย แสดงให้เห็นว่าพืชอาศัยอาจไม่ใช่ปัจจัยหลักที่มีผลต่อความผันแปรทางพันธุกรรมของ CMV ในเขตเพาะปลูกพืชที่อยู่ใกล้กัน แต่จะพบความหลากหลายมากขึ้นในเขตเพาะปลูกที่แตกต่างกันในระดับระหว่างประเทศ

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน CP ในคั้งนี้ พบว่าเชื้อ CMV ทั้ง 10 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแตงกวาในประเทศไทยจัดอยู่ใน subgroup IB เช่นเดียวกับไอโซเลทอื่นจากพืชอื่นของไทยที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ ทั้งนี้ตามรายงานของ Roossinck *et al.* (1999) ระบุว่าเชื้อ CMV ส่วนมากที่พบในแถบเอเชียแปซิฟิกจัดอยู่ใน subgroup IB แม้ว่าในทวีปเอเชียมีรายงานการพบ CMV ใน subgroup อื่นเพิ่มมากขึ้น เช่น subgroup IA ได้แก่ CMV-D8 จากผักกาดหัว ประเทศญี่ปุ่น (Takeshita and Takanami, 1997) CMV-Pf จากพริก ประเทศเกาหลี (Kim *et al.*, 2005) 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) แต่ยังไม่พบ subgroup เหล่านี้ในประเทศไทย



ภาพที่ 22 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย (ไอโซเลทที่มีเครื่องหมาย\*) กับ ไอโซเลทจากพืชอื่นในประเทศไทย และในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อ *Tomato aspermy virus* ไอโซเลท KC (TAV-KC) เป็น outgroup



ภาพที่ 23 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย (ไอโซเลทที่มีเครื่องหมาย\*) กับไอโซเลทจากพืชอื่นในประเทศไทยและในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อ *Tomato aspermy virus* ไอโซเลท KC (TAV-KC) เป็น outgroup

### 5.3 บริเวณ 3' NTR

#### 5.3.1 จำนวนและลำดับนิวคลีโอไทด์

แต่ละไอโซเลทมีจำนวนต่างกันเล็กน้อย คือ ไอโซเลท A168, A27, CRI, HC53, HC56 และ PBR มีขนาด 278 นิวคลีโอไทด์ ไอโซเลท BK16, C113 และ SNK มีขนาด 279 นิวคลีโอไทด์ ส่วนไอโซเลท SK211 มีขนาด 280 นิวคลีโอไทด์ (ภาพที่ 24) นอกจากนี้ยังพบบริเวณอนุรักษ์ขนาด 40 นิวคลีโอไทด์ (McGarvey *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2005) คือ 5'- GAACGGGUGU UCCAUCCAGCUUACGGCUAAAUGGUCAGU -3' ในทุกไอโซเลท

#### 5.3.2 multiple alignment

ส่วน 3' NTR ของทุกไอโซเลทมีระดับความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ อยู่ในช่วง 91%-100% (ตารางที่ 12) คล้ายคลึงกับ subgroup IB และ subgroup IA จากพืชอื่นที่ระดับ 87-98% และ 86-93% ตามลำดับ แต่คล้ายคลึงกับ subgroup II ที่ระดับต่ำ 61-66%

#### 5.3.3 การวิเคราะห์ Phylogenetic tree

ลำดับนิวคลีโอไทด์จากส่วน 3' NTR จัดแบ่ง CMV ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรก ได้แก่ ไอโซเลท BK16, A168, HC53, HC56 และ CRI จากแคว้นกัวกับไอโซเลท 30RS จากพริกในประเทศไทย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท SK211, PBR, SNK, C113 และ A27 จากแคว้นกัวกับไอโซเลท ML25 จากเมลอน เชื้อ CMV จากไทยทุกไอโซเลทแยกกลุ่มออกจากไอโซเลท Tfm NT9 Fny และ Pepo ที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 25)

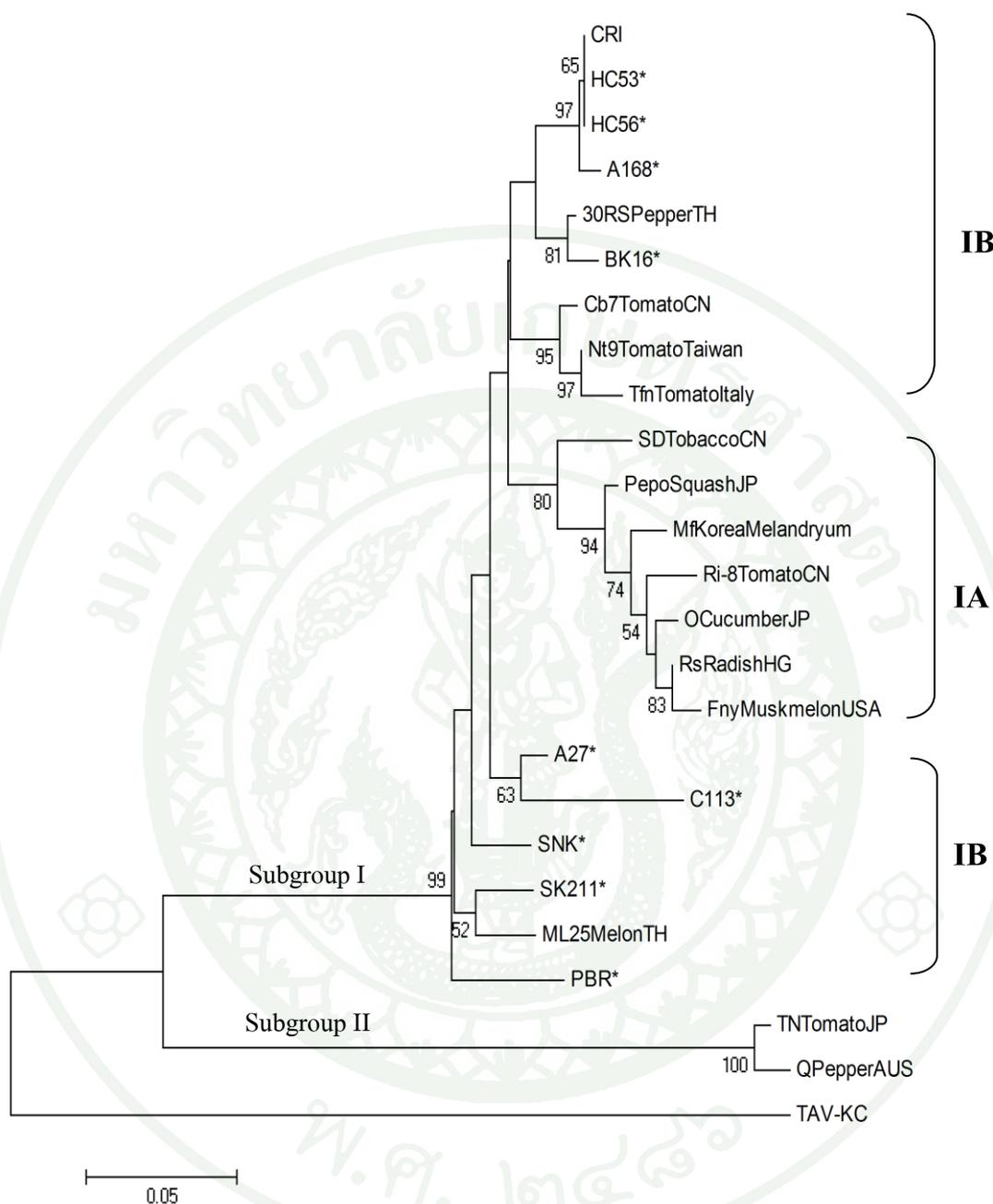
ลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ 3' NTR นั้นมีความอนุรักษ์สูงใน RNA ของเชื้อ CMV สายพันธุ์เดียวกัน แต่มีความผันแปรในเชื้อไวรัสต่างสายพันธุ์ Roossinck (2001) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าบริเวณ 3' NTR ของไอโซเลท CRI, HC53 และ HC56 เหมือนกัน 100% จึงควรจัดเป็นกลุ่มสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกันมากที่สุดที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งอาจจะรวมทั้งไอโซเลท A168 ด้วย

ตารางที่ 12 เปรูเซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' NTR ของ  
*Cucumber mosaic virus 10* ไอโซเลตที่แยกจากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทย

ไอโซเลต	A168	A27	BK16	C113	CRI	HC53	HC56	SNK	PBR	SK211
A168										
A27	95									
BK16	95	94								
C113	92	95	92							
CRI	99	95	96	93						
HC53	99	95	96	93	100					
HC56	99	95	96	93	100	100				
SNK	94	96	94	92	94	94	94			
PBR	92	94	91	90	92	92	92	94		
SK211	94	95	91	91	94	94	94	94	93	

		20		40	
SD	CTCCCAGTTT	GAATCCGTGT	TTCCC-AGAA	CCCTCCCTCC	AGTTTTCTGA 49
A168	.....C.	..T.....	..T.....	..G.....	.....T 48
A27	.....C.	..T.....	..TT.C.G.	..T.....	.....G.....T 48
BK16	.....C.	..CT.....	..T.....	..G.....	.....T 48
C113	.....C.	..T.....	..TT.C.G.	..T.....	.....G.....T 48
CRI	.....C.	..T.....	..T.....	.....	.....G.....T 48
HC53	.....C.	..T.....	..T.....	.....	.....G.....T 48
HC56	.....C.	..T.....	..T.....	.....	.....G.....T 48
SNK	.....C.	..CT.....	..T.C...	..T.....C..	GA.....T 49
PBR	.....C.	..C.....	..TT.C...	.....	TA.....T 48
SK211	.....C.	..T.....	..T.CG...	.....	.....T 50
	60		80		100
SD	GGCGGGAGCT	GAGTTGGCAG	TTTTGCTACA	AACTGTCTGA	AGTCACTAAA 99
A168	.....	.....	..G.....T.	.....AC.....	.....98
A27	.....	.....	..G.....T.	.....C.....	.....98
BK16	.....	.....	..T.....	.....AC.....	.....98
C113	.....	.....	..T.....	..GG.....T.	.....AC.G.....98
CRI	.....	.....	..T.....	.....AC.....	.....98
HC53	.....	.....	..T.....	.....AC.....	.....98
HC56	.....	.....	..T.....	.....AC.....	.....98
SNK	.....	.....	..T.....	.....G.....T.	.....AC.....98
PBR	.....	.....	..T.....	.....G.....T.	.....C.....99
SK211	.....	.....	..T.....	.....A.....CT.	.....C.....98
					100
			Conserved nucleotide sequence		
SD	CGCTTTGCGG	TGAACGGGT	GTCCATCCAG	CTTACGGCTA	AAATGGTC-A 148
A168	.....	.....	.....	.....	.....147
A27	.....C.	.....	.....	.....	.....147
BK16	.....C.	.....	.....	.....	.....C.....148
C113	.....C.	.....	.....	.....	.....G.....AG.....148
CRI	.....	.....	.....	.....	.....147
HC53	.....	.....	.....	.....	.....147
HC56	.....	.....	.....	.....	.....147
SNK	.....	.....	.....	.....	.....148
PBR	.....C.	.....	.....	.....	.....147
SK211	.....	.....	.....	.....	.....149
	160		180		200
SD	GTTCGTGGAGA	AATCCACGCC	AGCGGACTTA	CAAGTCTCTG	AGGCACCTTT 198
A168	.....	.....	..TA.....	.....	.....TG.....197
A27	.....	.....T.....	..A.....	.....G.....	.....TG.....197
BK16	.....	.....	..TA.....	.....	.....TG.....198
C113	TCG.....	.....GGG.....	..TA.....	.....	.....TG.....198
CRI	.....	.....	..TA.....	.....	.....TG.....197
HC53	.....	.....	..TA.....	.....	.....TG.....197
HC56	.....	.....	..TA.....	.....	.....TG.....197
SNK	.....	.....	..A.....	.....	.....TG.....C.....198
PBR	.....A.....	.....T.....	..G.GA.....	.....	.....TG.....197
SK211	.....	.....G.....	..TA.....	.....	.....TG.....199

ภาพที่ 24 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 3' NTR ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่ศึกษา เปรียบเทียบกับไอโซเลท SD ที่เป็นเชื้อใน subgroup IB แยกได้จากยาสูบ ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม CLC Main Workbench version 5.5 (เชื้อไอโซเลทดูจากตารางที่ 8) กรอบสี่เหลี่ยม แสดง Conserved nucleotide sequence จุด (.) ระบุนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกับไอโซเลท SD ตัวอักษร A, G, T, C ระบุนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างจากไอโซเลท SD

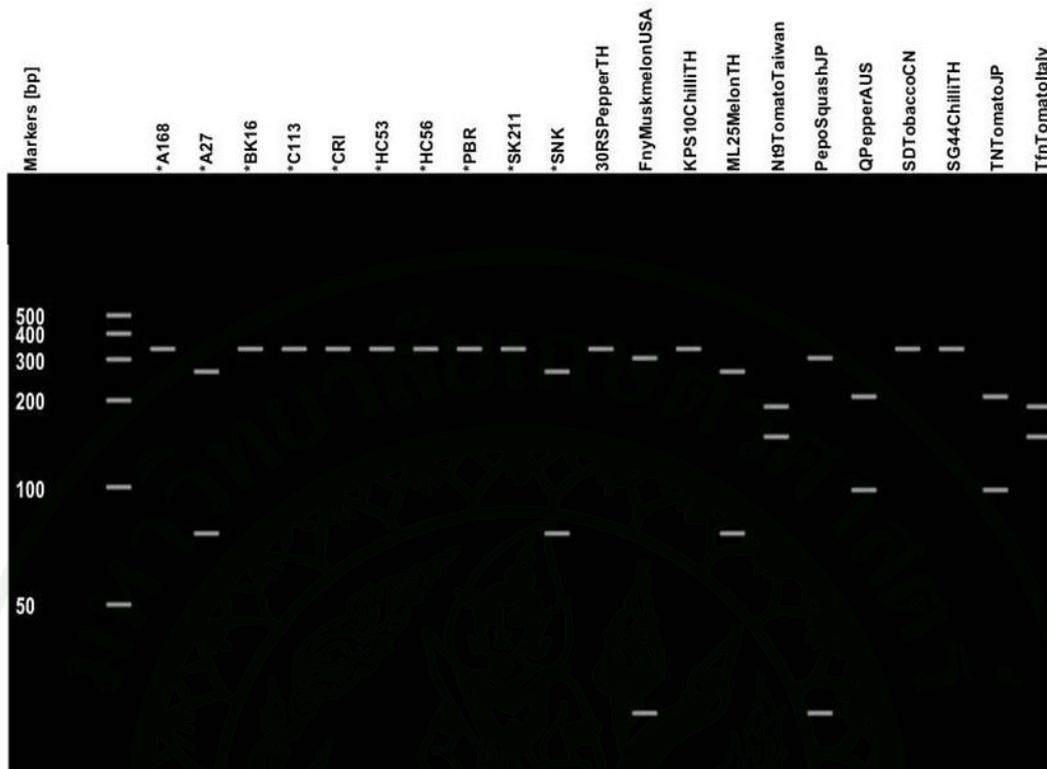


ภาพที่ 25 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 3' NTR แสดง ความสัมพันธ์ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านใน ประเทศไทย (ไอโซเลทที่มีเครื่องหมาย\*) กับไอโซเลทจากพืชอื่นในประเทศไทย และในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อ *Tomato aspermy virus* ไอโซเลท KC (TAV-KC) เป็น outgroup

## 7. การใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ virtual PCR-RFLP เพื่อระบุความหลากหลายทางพันธุกรรม

### 7.1 ยีน 2b

จากการย่อยดีเอ็นเอของยีน CP ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *AluI* *DdeI* *EcoRI* *HaeIII* *HapII* *SatI* และ *TasI* พบว่าแบบแผน RFLP จากการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HaeIII* สามารถแยกเชื้อ CMV subgroup I และ II ออกจากกันได้ และ *SatI* สามารถแยก CMV subgroup IA และ IB ออกจากกันได้ ส่วนเอ็นไซม์ *HapII* ให้แบบแผน RFLP 7 แบบ (ภาพที่ 26) แต่แยกเฉพาะไอโซเลท A27 SNK และ ML25 ออกจากไอโซเลทอื่นๆ เท่านั้น จึงยังไม่สามารถใช้เทคนิคนี้กับยีน 2b ในการระบุความหลากหลายหรือความแตกต่างของเชื้อ CMV แต่ละไอโซเลท



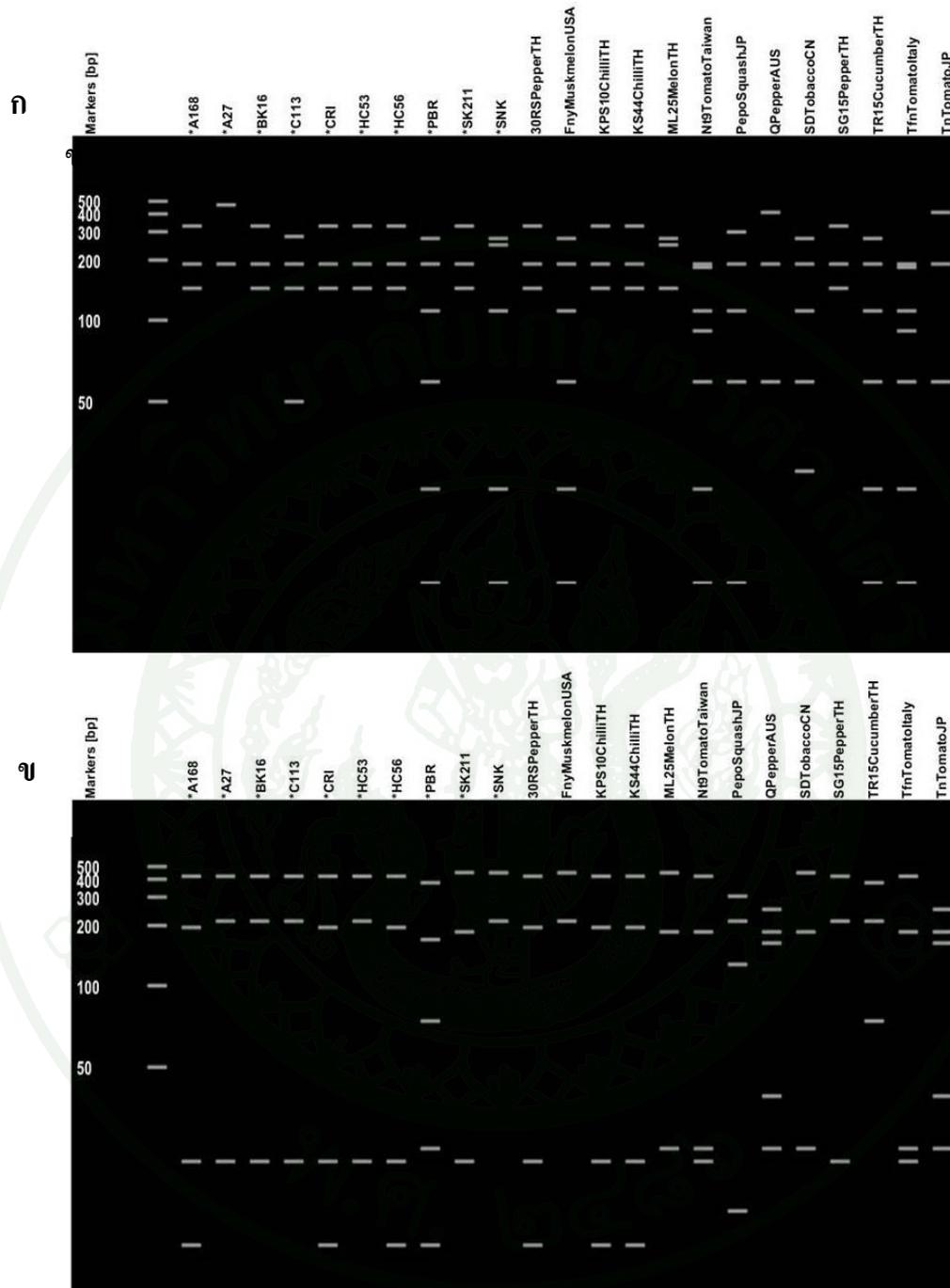
ภาพที่ 26 แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอจากยีน 2b ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) 10 ไอโซเลทจากแตงกวาและแตงร้านเปรียบเทียบกับ CMV ที่พบในพืชอื่นในประเทศไทย และต่างประเทศ วิเคราะห์แบบ virtual PCR-RFLP ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *HapII* โดยใช้โปรแกรม CLC main workbench 5.5

## 7.2 ยีน CP

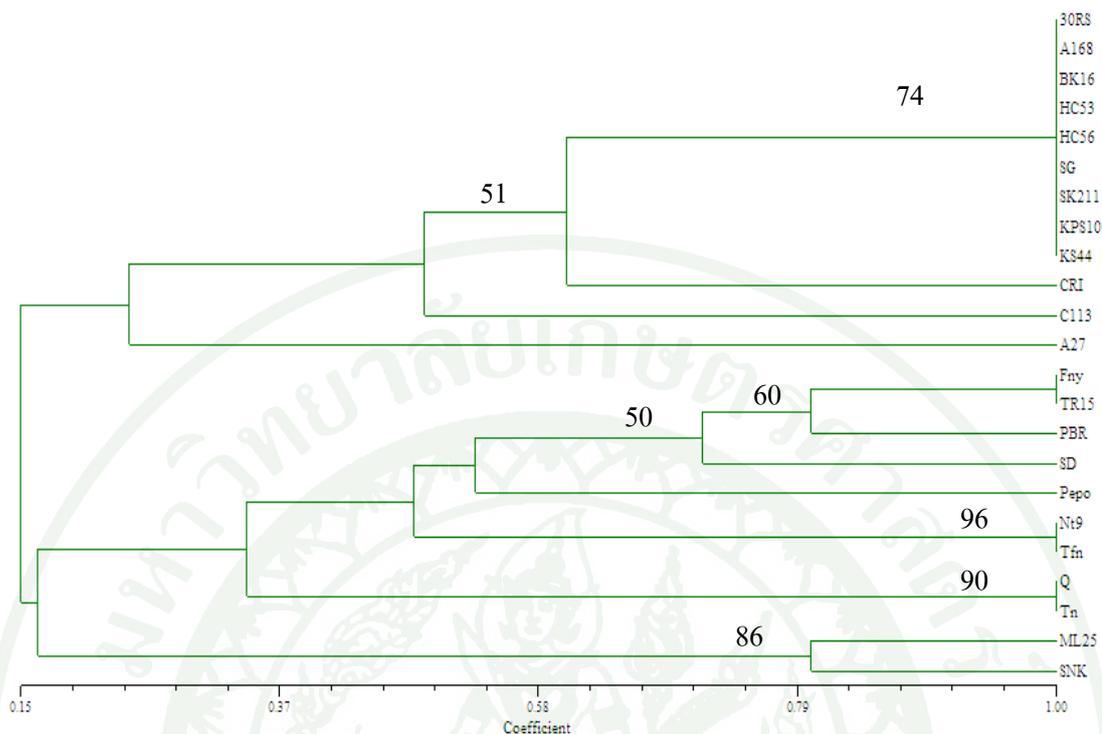
จากการย่อยดีเอ็นเอของยีน CP ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *AluI* *DdeI* *EcoRI* *HapII* *SatI* และ *TasI* พบว่าการย่อยด้วย *EcoRI* สามารถแยกเชื้อ CMV subgroup I และ II ออกจากกันได้ การย่อยด้วย *SatI* พบแบบแผน RFLP 10 แบบ และแยกความหลากหลายได้มากกว่าเอนไซม์อื่นๆ (ภาพที่ 27ก) ส่วนการย่อยด้วย *HapII* ให้แบบแผน RFLP 10 แบบ แต่ให้ความหลากหลายน้อยกว่าการตัดด้วย *SatI* (ภาพที่ 27ข)

ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.2e พบว่าเชื้อ CMV ไอโซเลต A168 BK16 HC53 HC56 SK211 CRI C113 และ A27 จับกลุ่มอยู่กับไอโซเลตจากพริกที่พบในประเทศไทยและแยกออกมาจากไอโซเลตที่พบในต่างประเทศ ส่วนไอโซเลต PBR และ SNK จับกลุ่มอยู่กับ CMV ที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 28) ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ของยีน CP ด้วยแบบแผน RFLP นี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์

การศึกษาในครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นว่า เทคนิค PCR-RFLP เป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าจะนำมาใช้แยกความแตกต่างของ CMV ในระดับ subgroup และระหว่างไอโซเลตในกรณีที่ไม่ต้องการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เช่นเดียวกับรายงานของ Parrella and Sorrentino (2009) ซึ่งใช้เทคนิค *in silico* RFLP ศึกษาจาก CMV ไอโซเลต Ny, Y, C, O M, Nt9 PAE1, WL และ Q พบว่ายีน CP เป็นส่วนที่เหมาะสมที่จะใช้ระบุ subgroup และแสดงความแตกต่างของเชื้อ CMV แต่ละ ไอโซเลต



ภาพที่ 27 แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอจากยีน CP ของเชื้อ *Cucurbit mosaic virus* (CMV) 10 ไอโซเลทจากแตงกวาและแตงร้านเปรียบเทียบกับเชื้อ CMV ที่พบในพืชอื่นในประเทศไทย และต่างประเทศ วิเคราะห์แบบ virtual PCR-RFLP ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *SatI* (ก) และ *HapII* (ข) โดยใช้โปรแกรม CLC mainworkbench 5.5

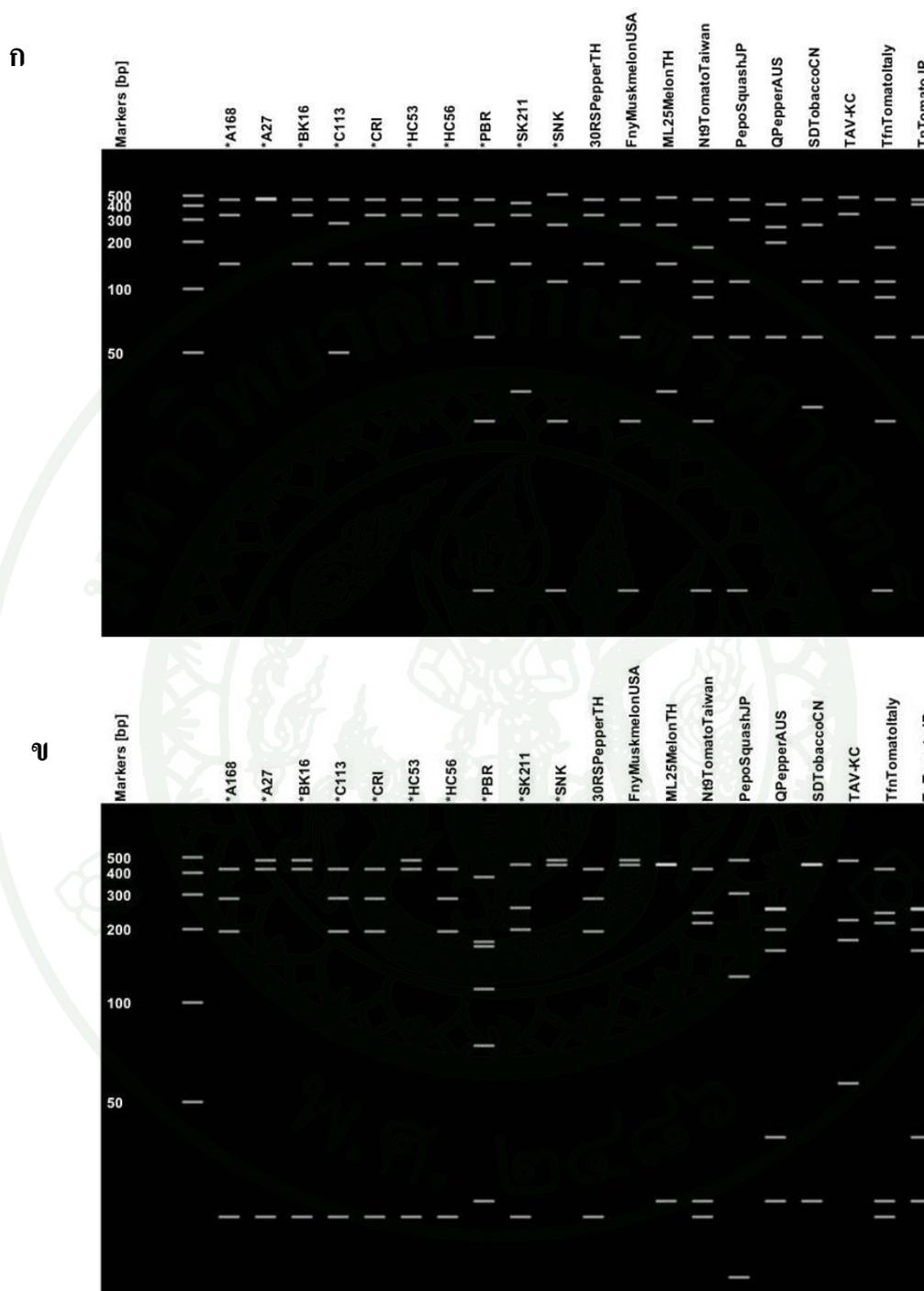


ภาพที่ 28 Phylogenetic tree จากแบบแผน RFLP ของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) ที่แยกได้จากแตงกวาและแตงร้านกับเชื้อ CMV จากพืชอื่นในประเทศไทยและต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYSpc version 2.2e ใช้ค่า bootstrap จาก 1000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50%

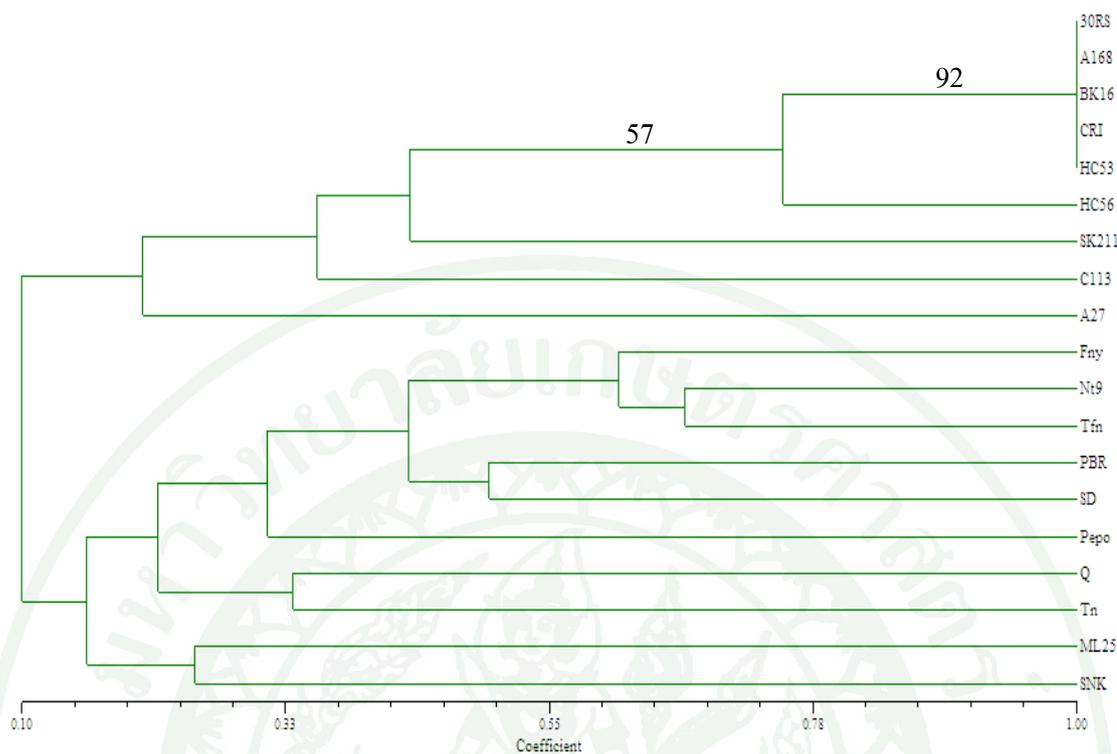
### 7.3 ยีน CP ต่อเข้ากับ 3' NTR

การย่อยดีเอ็นเอของยีน CP ที่เชื่อมต่อกับส่วนปลาย 3' NTR ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะจำนวน 6 ชนิด ได้แก่ *AluI* *DdeI* *EcoRI* *HapII* *SatI* และ *TasI* พบว่า *SatI* และ *HapII* ให้แบบแผน RFLP ที่แตกต่างกัน 10 แบบ แต่ *SatI* ให้ความหลากหลายของไอโซเลทมากกว่าเอ็นไซม์อื่นที่นำมาใช้ (ภาพที่ 29) และให้ผลเหมือนกับการใช้แบบแผน RFLP ของยีน CP

ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่าไอโซเลท A168 BK16 HC53 CRI และ HC56 ใกล้เคียงกับ 30RS จากพริก และแยกกลุ่มจากไอโซเลท SK211 C113 และ A27 ส่วนไอโซเลท PBR และ SNK ของไทยจับกลุ่มกับ CMV ที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 30) แบบแผน RFLP ของนิวคลีโอไทด์จากยีน CP จนสุดปลาย 3' NTR ของ RNA 3 จึงไม่เหมาะสมสำหรับการแยกความแตกต่างระหว่างไอโซเลทของเชื้อ CMV ที่นำมาศึกษา



ภาพที่ 29 แบบแผนการย่อยดีเอ็นเอส่วนของยีน CP ต่อกับปลาย 3' NTR ของเชื้อ *Cucurbit mosaic virus* (CMV) 10 ไอโซเลทจากแตงกวาและแตงร้านเปรียบเทียบกับเชื้อ CMV ที่พบในพืชอื่นในประเทศไทย และต่างประเทศ วิเคราะห์แบบ virtual PCR-RFLP ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *SatI* (ก) และ *HapII* (ข) โดยใช้โปรแกรม CLC mainworkbench 5.5



**ภาพที่ 30** Phylogenetic tree จากแบบแผน RFLP ของยีน CP ต่อเข้ากับ 3' NTR แสดง ความสัมพันธ์ ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) ที่แยกได้จากแตงกวาและ แตงร้านกับเชื้อ CMV จากพืชอื่นในประเทศไทยและต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วย โปรแกรม NTSYSpc version 2.2e ใช้ค่า bootstrap จาก 1000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50%

## สรุป

### 1. การแยกเชื้อ CMV จากแตงกวา และลักษณะสำคัญของเชื้อ

เก็บตัวอย่างแตงกวาที่แสดงอาการใบด่างจากแปลงปลูก 11 จังหวัด รวม 2,250 ตัวอย่าง และตรวจหาเชื้อ CMV ด้วยเทคนิค PTA-indirect ELISA พบเชื้อ 2 ตัวอย่างในใบแตงกวาจากจังหวัดนครปฐม และ 2 ตัวอย่างจากแตงร้าน (แตงกวาผลใหญ่) จากจังหวัดเพชรบุรีและสระแก้ว อาการของโรคที่พบได้แก่อาการใบด่างแบบไม่ชัดเจน หรือไม่แสดงอาการ ทั้งนี้ตรวจไม่พบเชื้อ CMV ในใบแตงกวาที่แสดงอาการใบด่างอย่างชัดเจน ใบเสี้ยวรูป เส้นใบใส และลำต้นแคระแกร็น แยกเชื้อ CMV จากทั้ง 4 ตัวอย่างให้เป็นสายพันธุ์เดี่ยวได้ 4 ไอโซเลท ได้แก่ HC53, HC56 จากแตงกวา และ PBR, SK211 จากแตงร้าน กับอีก 6 ไอโซเลทที่ได้รับความอนุเคราะห์ซึ่งนำมาแยกเป็นสายพันธุ์เดี่ยวเช่นเดียวกัน ได้แก่ A168, A27, BK, C113, CRI, SNK รวมเป็น 10 ไอโซเลทที่ใช้ในการศึกษา

แยกเชื้อ CMV ให้บริสุทธิ์ได้ปริมาณเชื้อ 0.340 – 1.680 มก. จากใบยาสูบ 50 กรัม อนุภาคเชื้อไวรัสเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีลักษณะเป็นรูปทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 24-28 นาโนเมตร ภายในอนุภาคพบอาร์เอ็นเอ 4 โมเลกุล และทุกไอโซเลทมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคประมาณ 26 กิโลดาลตัน

ศึกษาการเพิ่มปริมาณและแพร่กระจายของเชื้อ CMV ไอโซเลท SK211 ในใบยาสูบ *N. tabacum* พันธุ์ Xanthi-nc ด้วยเทคนิค tissue print immunoblot assay พบว่าในช่วงวันที่ 4-5 หลังปลูกเชื้อ CMV เริ่มเคลื่อนย้ายจากใบที่ได้รับการปลูกเชื้อไปยังใบบนที่อยู่ถัดขึ้นไป โดยเข้าสู่เส้นใบ class I และ class II จากนั้นจึงแพร่กระจายไปยังเนื้อใบและทั่วแผ่นใบในช่วงวันที่ 6-13 เมื่อตรวจวัดปริมาณเชื้อด้วยเทคนิค ELISA พบเชื้อมีการเพิ่มปริมาณมากในช่วง 4-7 วันหลังปลูกเชื้อ และลดลงเล็กน้อยในระยะต่อมา ก่อนเพิ่มปริมาณมากขึ้นอีกในช่วงวันที่ 8-13

### 2. การศึกษาความหลากหลายทางชีววิทยา

ปลูกเชื้อ CMV 10 ไอโซเลทจากแตงกวาด้วยวิธีกลบนบนพืชทดสอบ 13 ชนิด แต่ลักษณะอาการบนพืชอาศัยเหล่านี้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของแต่ละไอโซเลทที่ศึกษา โดย

พบว่า *C. amaranticolor* ถั่วเขียว และถั่วพุ่มเป็นพืชอาศัยแบบที่แสดงอาการเฉพาะแห่งเป็นแผลจุดขนาดเล็กสีเหลือง หรือสีน้ำตาลบนใบที่ได้รับการปลูกเชื้อคล้ายคลึงกันทุกไอโซเลท สำหรับพืชอาศัยที่แสดงอาการแบบแพร่กระจายทั่วต้น ได้แก่ แตงกวา มะเขือเทศ พริก ลำโพง โทงเทง และยาสูบ ไม่มีอาการแตกต่างกันที่เด่นชัด ส่วนเมลอน แตงโม และแคนตาลูปไม่แสดงอาการของโรค และตรวจไม่พบเชื้อ CMV ทุกไอโซเลท

ศึกษาการตอบสนองของพริกพันธุ์หัวเรือต่อเชื้อ CMV 10 ไอโซเลท พบว่าพริกแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบเสียรูปทรงคล้ายกันทุกไอโซเลท แม้จะมีระดับความรุนแรงของอาการต่างกันไป แต่ไม่สามารถใช้ระบุเพื่อแยกแต่ละไอโซเลท ไอโซเลท SK211 และ A168 มีปริมาณเชื้อในใบพริกสูงที่สุดและต่ำที่สุดตามลำดับ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ CMV ในใบพืชกับระดับความรุนแรงของอาการ CMV ที่นำมาศึกษามีอัตราการก่อโรคในพริกอยู่ในช่วง 10-70 %

เปรียบเทียบการตอบสนองของมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 ต่อเชื้อ CMV 10 ไอโซเลท แต่ไม่พบความแตกต่างเด่นชัดระหว่างไอโซเลท เมื่อได้รับการปลูกเชื้อ มะเขือเทศแสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน เสียรูปทรงและลดรูป ระดับความรุนแรงของอาการมีความแตกต่างกัน แต่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อ CMV ในใบพืชกับระดับความรุนแรงของอาการ อัตราการก่อโรคอยู่ในช่วง 10-100 % และพบว่าปริมาณเชื้อ CMV ในมะเขือเทศมีมากกว่าในพริก

### 3. การศึกษาความหลากหลายของรหัสพันธุกรรม

เชื้อ CMV ทุกไอโซเลทที่แยกจากแตงกวาในไทยรวมทั้งจากพืชอื่นจัดอยู่ใน subgroup IB ยีน 2b ของ CMV ทั้ง 10 ไอโซเลทมีขนาด 336 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 111 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 13 กิโลดาลตัน ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรด อะมิโนมีความคล้ายคลึงกัน 89%-100% และ 85%-100% ตามลำดับ ยีน CP ของทุกไอโซเลทมีขนาด 657 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสเป็นโปรตีนได้ 218 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 24 กิโลดาลตัน ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกัน 89%-99% และ 92%-100% ตามลำดับ โดยที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP มีความผันแปรมากกว่ายีน 2b จีโนมบริเวณ 3' NTR ของแต่ละไอโซเลท มีขนาดแตกต่างกันเล็กน้อยในช่วง 278-280 นิวคลีโอไทด์ และมีความคล้ายคลึงกัน 91%-100% โดยที่ไอโซเลท CRI HC53 HC56 และ A168 มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 99-100% จึงจัดเป็นสายพันธุ์

ที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด

ผลจาก multiple alignment และการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของเชื้อ CMV ทั้ง 10 ไอโซเลต ด้วย phylogenetic tree ของยีน 2b ยีน CP และ 3' NTR มีความสอดคล้องกันทั้งหมด โดยพบว่าเชื้อ CMV ที่แยกได้จากแตงกวาและพืชชนิดอื่นในประเทศไทยจับกลุ่มกันอยู่ใน subgroup IB และแยกกลุ่มออกจาก CMV ที่พบในต่างประเทศ CMV จากแตงกวาและพริกส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมาก ส่วนไอโซเลตที่ได้จากแตงร้านและเมลอนแยกกลุ่มย่อยออกมา มีความใกล้เคียงกับ CMV subgroup II ทั้งนี้ไม่พบความเชื่อมโยงของความผันแปรบนยีนที่ศึกษากับแหล่งที่พบเชื้อ CMV จากพืชต่าง ๆ ในประเทศไทย

แบบแผน PCR-RFLP ของยีน CP ที่ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *SacI* และ *HapII* ร่วมกันสามารถนำมาใช้ระบุความหลากหลายของเชื้อ CMV จากที่ศึกษาได้ และให้ผลการวิเคราะห์ สายสัมพันธ์ระหว่างไอโซเลตต่าง ๆ ด้วย phylogenetic tree ที่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่าเชื้อ CMV ที่ได้จากแตงกวาและแตงร้านในประเทศไทยจับกลุ่มอยู่กับ CMV จากพริกที่พบในประเทศไทยและแยกออกมาจากเชื้อ CMV ที่พบในต่างประเทศยกเว้น ไอโซเลต PBR และ SNK จับกลุ่มอยู่กับ CMV ที่พบในต่างประเทศ ส่วนยีน 2b และ 3' NTR ไม่ให้แบบแผน RFLP ที่จะนำมาใช้แยกความแตกต่างของไอโซเลตที่ศึกษา

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

เคโรอิพันธุ์ กิตติปกรณ์, Chiyoi Noda, นวลจันทร์ ดีมา และ สุวรรณ กัดพันธุ์. 2536. การศึกษาเกี่ยวกับไวรัสของพริกและการคัดเลือกพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อไวรัสบางชนิด. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31. กรุงเทพฯ. น. 31-340.

\_\_\_\_\_ และ วันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมัน. โรคมิมพ์ชุมนุมการเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

ธีระ สุตะบุตร. 2538. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟีนนี่พับลิชชิง, กรุงเทพฯ.

มณีนรัตน์ คุณาพิทักษ์ธรรม. 2547. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีสำหรับการวินิจฉัยเชื้อไวรัสใบด่างแดง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

\_\_\_\_\_ และ รัชณี สงประยูร. 2547. ความผันแปรของลักษณะอาการบนพืชอาศัยที่เกิดจากเชื้อไวรัสใบด่างแดงในประเทศไทย. ว. วิทย. กษ. 35: 207-214.

ยุทธ ทนโม๊ะ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2551. โรคไวรัสในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. สัมมนาวิชาการวิทยาศาสตร์เกษตร. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

วันเพ็ญ ศรีทองชัย และ นวลจันทร์ ดีมา. 2522. การทำเชื้อบริสุทธิ์ของโรคใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศ. รายงานผลการค้นคว้าวิจัยประจำปี 2523. กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร. น. 50-53.

สุจินต์ ภัทรภูวดล วาริรัตน์ สมประทุม รัชดาภรณ์ เขียวหวาน กรุง สีตะชนี และสิริกุล ะสี. 2551. การคัดเลือกพันธุ์พริกต้านทานต่อโรคไวรัสใบด่างแดงและใบด่างประของพริก. ว. วิทย. กษ. 39 (30) (พิเศษ): 376-379.

สุพัฒน์ อรรถธรรม อัญญา บุญชด และเจษฎาพร พิทักษ์สุธิพงษ์. 2548. การประเมินความเสียหายของผลผลิตมะเขือเทศที่ถูกเชื้อไวรัสใบด่างแดงเข้าทำลาย. **ว. วิทย.เกษตร.** 36: 337-341.

Agrios , G. N., 2005. **Plant Pathology**. 5<sup>th</sup> Ed. Academic Press, Inc. New York.

Ali , A., H. Li, W.L. Schneider, D.J. Sherman, S. Gray, D. Smith, and M.J. Roossinck. 2006. Analysis of genetic bottlenecks during horizontal transmission of *Cucumber mosaic virus*. **J. Virol.** 80: 8345-8350.

Aramburu, J., L. Galipienso and C. Lopez. 2007. Reappearance of Cucumber mosaic virus Isolates Belonging to Subgroup IB in Tomato Plants in North-eastern Spain. **J. Phytopathol.** 155: 513-518.

Balci, E. 2005. Genetic characterization of *Cucumber mosaic virus* (CMV) resistance in tomato and pepper. Thesis for master degree. Izmir Institute of Technology, Turkey

Bashir, N.S., M.R. Kalhor, S.N. Zarghani. 2006. Detection, differentiation and phylogenetic analysis of *Cucumber mosaic virus* isolates from cucurbits in the northwest region of Iran. **Virus Genes** 32: 277-288.

Blanchard, C.L., P.M. Boyce and B.J. Anderson. 1996. *Cucumber Mosaic Virus* RNA 5 is a mixed population derived from the conserved 3'-terminal regions of genomic RNAs 2 and 3. **Virology** 217: 598-601.

Blackman, L.M., P. Boevink, S.S. Cruz, P. Palukaitis, and K. J. Oparka. 1998. The movement protein of *Cucumber mosaic virus* traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana clevelandii*. **The Plant Cell** 10: 525-537.

Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs and L. Watson. 1996. **Viruses of Plants**. UK at the University Press, Cambridge.

- Chen, Y., Chen, J., Zhang, H., Tang, X. and Du, Z. 2007. Molecular evidence and sequence analysis of a natural reassortant between *Cucumber mosaic virus* subgroup IA and II strains. **Virus Genes** 35: 405-413.
- Chengguo, D., W. Chunhan and G. Huishan. 2008. Delayed resistance to *Cucumber mosaic virus* mediated by 3' UTR-derived hairpin RNA. **Chinese Sci. Bull.** 53: 3301-3310.
- Chiemsombat, P. and K. Kittipakorn. 1996. Determination of isolates of CMV and CVMV and screening of pepper cultivars for virus resistance. **Collaborative vegetable research in southeast asia: Proceedings of the AVNET II final workshop.** 451 pp.
- Choi, G.S., J.H. Kim, J.S. Kim and J.K. Choi. 2004. Characterization of *Cucumber mosaic virus* isolated from water chickweed (*Stellaria aquatica*). **Plant Pathol.** 20: 131-134.
- Cillo, F. 1994. Lethal necrosis, fruit necrosis and top stunting: Molecular biological aspects of three *Cucumber mosaic virus* induced disease of processing tomatoes in Italy. **Acta Hort.** 376: 369-376.
- Ding, S.W., W. X. Li and R. H. Symons. 1995. A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long-distance virus movement. **EMBO J.** 14: 5762-5772.
- Doolittle, S. P. 1916. A new infectious mosaic disease of cucumber. **Phytopathology** 6: 145-147.
- Finnegan, E.J. and M.A. Matzke. 2003. The small RNA world. **J. Cell. Sci.** 116: 4689-4693.
- Fletcher, J.D., A.C. Russell and R.C. Butler. 1999. Seed-borne *Cucumber mosaic virus* in New Zealand lentil crops: yield effects and disease incidence. **New Zeal J Crop Hort Sci** abst.

- Francki, R.I.B., J.W. Randles, T.C. Chambers and S.B. Wilson. 1966. Some properties of purified *Cucumber mosaic virus* (Q strain). **Virology** 28: 729–741.
- 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.
- Gallitelli, D. 2000. The ecology of *Cucumber mosaic virus* and sustainable agriculture. **Virus Res.** 7: 9-21.
- Garcia-Arenal, F., F. Escriu, M.A. Aranda, J.L. Alonso-Prados, J.M. Malpica and A. Fraile. 2000. Molecular epidemiology of *Cucumber mosaic virus* and its satellite RNA. **Virus Res.** 71: 1-8.
- Gillaspie, J.G., M.R. Hajimorad, S.A. Ghabrial. 1997. Characterization of a seed borne strain of *Cucumber mosaic virus* from cowpea. **Agricultural Reserve Service.**
- Goto K., T. Kobori, Y. Kosaka, T. Natsuaki and C. Masuta. 2007. Characterization of silencing suppressor 2b of *Cucumber mosaic virus* based on examination of its small RNA-binding abilities. **Plant Cell Physiol.** 48: 1050–1060.
- Haq, Q.M.R., B.P. Singh and K.M. Srivastava. 1996. Biological, serological and molecular characterization of a *Cucumber mosaic virus* isolate from India. **Plant Pathol.** 45: 823-828.
- Jorda, C., A. Alfaro, M.A. Aranda, E. Moriones and F. Garcia-Arenal. 1992. Epidemic of *Cucumber mosaic virus* plus satellite RNA in tomatoes in Eastern Spain. **Plant Dis.** 76: 363-366.
- Kim, C. H. and P. Palukaitis. 1997. The plant defense response to *Cucumber mosaic virus* in cowpea is elicited by the viral polymerase gene and affects virus accumulation in single cells. **EMBO J.** 16: 4060-4068.

- 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 Kprea. **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.
- Kim S.J., S. J. Lee, B.D. Kim, K.H. Paek. 2004. Satellite-RNA-mediated resistance to *Cucumber mosaic virus* in transgenic plants of hot pepper (*Capsicum annuum* cv. Golden Tower). **Plant Cell Rep.** 16: 825-830.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- Lee, J.A., S.K. Choi, J.Y. Yoon, J.S. Hong, K.H. Ryu, S.Y. Lee and J.K. Choi. 2007. Variation in pathogenicity of lily isolates of *Cucumber mosaic virus*. **Plant Pathol. J.** 23: 251-259.
- Lin, H.X., L. Rubio, A.B. Smythe and B.W. Falk. 2004. Molecular population genetic of *Cucumber mosaic virus* in California: evidence for founder effects and reassortment. **J. Virol.** 78: 6666-6675.
- Liu, S., X. He, G. Park, C. Josefsson and K.L. Perry. 2002. A conserved capsid protein surface domain of *Cucumber mosaic virus* is essential for aphid vector transmission. **J. Virol.** 76: 9750-9762.
- Lot, H., J. Marrou, J.B. Quiot and C. Esvan. 1972. Contribution a l etude du virus de la mosaique du cocombre (CMV). Methode depurification rapide du virus. **Ann Phytopath.** 4: 25-38.
- MacDiarmid, R. 2005. RNA silencing in productive virus infection. **Ann. Rev. Phytopathol.** 14: 523-544.

- Masuta, C., Y. Seshimo, M. Mukohara, H.J. Jung, S. Ueda, K.H. Ryu and J.K. Choi. 2002. Evolutionary characterization of two lily isolates of *Cucumber mosaic virus* isolated in Japan and Korea. **J. Gen. Plant Pathol.** 68: 163-166.
- McGarvey, P., M. Tousignant, L. Geletka, F. Cellini and J. M. Kaper. 1995. The complete sequence of a *Cucumber mosaic virus* from Ixora that is deficient in the replication of satellite RNAs. **J. Gen. Virol.** 76: 2257-2270.
- Murphy, J. F. and K. L. Bowen. 2006. Synergistic Disease in Pepper Caused by the Mixed Infection of *Cucumber mosaic virus* and *Pepper mottle virus*. **Phytopathology** 96: 240-247
- Moury, B. 2004. Differential selection of genes of *Cucumber mosaic virus* subgroups. **Mol. Biol. Evol.** 21: 1602-1611.
- Palukaitis, P., Roossinck, M., Dietzgen, R.G., Francki, R.I.B., 2003. Cucumber mosaic virus. **Adv. Virus Res.** 281-348.
- Parrella, G. and D. Sorrentino. 2009. Identification of a *Cucumber mosaic virus* isolate from *Passiflora edulis* in Southern Italy and validation of subgroup identification by in silico restriction fragment length polymorphism. **J. phytopathol.** 157: 762-767.
- Perry, K., L. Zhang and P. Palukaitis. 1998. Amino acid changes in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. **Virology** 242: 204-210.
- Peden, K.W.C. and R.H. Symons. 1973. *Cucumber mosaic virus* contains a functionally divided genome. **Virology** 53: 487-492.

- Porta, C., J. C. Devergne, L. Cardin, J.P. Briand and M. H. V. Van Regenmortel. 1989. Serotype specificity of monoclonal antibodies to *cucumber mosaic virus*. **Arch. Virol** 104: 271-285.
- Praveen, S., S. K. Mangrauthia, P. Singh and A. K. Mishra. 2008. Behavior of RNAi suppressor protein 2b of Cucumber mosaic virus in planta in presence and absence of virus. **Virus Genes** 37: 96–102.
- Roberts, A.G., S. S. Cruz, L.M. Roberts, D.A.M. Prior, R. Turgeon and K.J. Oparka. 1997. Phloem unloading in sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. **The Plant Cell** 9: 1381-1396.
- Roossinck, M.J. 2001. *Cucumber mosaic virus*, a model for RNA virus evolution. **Mol. Plant Pathol.** 2: 59-63.
- \_\_\_\_\_. 2002. Evolutionary history of *Cucumber mosaic virus* deduced by phylogenetic analyses. **J. Virol.** 76: 3382-3387.
- \_\_\_\_\_, Zhang, L., Hellward, K., 1999. Rearrangements in the 5' non-translated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. **J. Virol.** 73: 6752–6758.
- Ryu, K.H., C.H. Kim and P. Palukaitis. 1998. The coat protein of *Cucumber mosaic virus* is a host range determinant for infection of Maize. **MPMI.** 11: 351-357.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular Cloning : A Laboratory Manual.** 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2,344 pp.

- Shi, B.J., P. Palukaitis, and R. Symons. 2002. Differential virulence by strains of *Cucumber mosaic virus* is mediated by the 2b gene. **Mol. Plant Microbe In.** 15: 947–955.
- Shintaku, M.H., L. Zhang and P. Palukaitis. 1992. A single amino acid substitution in the coat protein of *Cucumber mosaic virus* induces chlorosis in tobacco. **The plant Cell** 4: 751-757.
- Shubin, W. 1995. Evaluation on pepper for resistance to the Thai -Strain of CMV. Asian Regional Center-AVRDC.
- Smith, T.J., E. Chase, T. Schmidt and K.L. Perry. 2000. The structure of *Cucumber mosaic virus* and comparison to *Cowpea chlorotic mottle virus*. **J. Virol.** 74: 7578–7586.
- Srivastava, A. and S.K. Raj. 2004. High molecular similarity among Indian isolates of *Cucumber mosaic virus* suggests a common origin. **Curr. Sci. India.** 87: 1126-1131.
- Stoimenova, E., G. Marinova and I. Garcia-Luque. 2005. Influence of virus concentration on expression of *cucumber mosaic virus* resistance in pepper. **Biotechnol. & Biotechnol. Eq.** 36-41
- Sulistyowati, E., N. Mitter, S. Bastiaan-Net. M. J. Roossinck and R. G. Dietzgen. 2004. Host range, symptom expression and RNA3 sequence analyses of six Australian strains of *Cucumber mosaic virus*. **Australas. Plant Path.** 33: 505-512.
- Takeshita, M. and Y. Takanami. 1997. Complete nucleotide sequences of RNA3s of *Cucumber mosaic virus* KM and D8 strains. **J. Fac. Agric. Kyushu Univ.** 42: 27-32.

- Tamura K., Dudley J., Nei M. and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**. 24: 1596-1599.
- Varma, A.B., K. Giri. 1998. **Virus disease of cucurbits in India**. In: Cucurbits. Nayar NM, More. TA (eds). Oxford and IBH Publishing Co. Pvt. Ltd, New Delhi. 225–245.
- Verma, N., Mahinghara B K., Ram R. and Zaidi A A. 2006, Coat protein sequence shows that *Cucumber mosaic virus* isolate from geraniums (*Pelargonium* spp.) belong to subgroup II. **J. Biosci.** 31: 47-54.
- Wahyuni, W.S., R.G. Dietzgen, K. Hanada and R.I.B. Francki. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II of *Cucumber mosaic virus*. **Plant Pathol.** 41: 282-297.
- Wang, H.L. and D. Gonsalves. 1999. Utilization of monoclonal and polyclonal antibodies to monitor the protecting and challenging strains of zucchini yellow mosaic virus in cross protection. **Plant Pathol. Bull.** 8: 111 – 116.
- Waterhouse, P.M. and M.J.W. Webb. 1968. Virus in plant apical meristem. **J. Gen. Virol.** 3: 311-313.
- Wong S.M., S.S.C. Thio, M.H. Shintaku and P. Palukaitis. 1999. The rate of cell-to-cell movement in squash of *Cucumber mosaic virus* is affected by sequences of the capsid protein. **MPMI.** 32: 628-632.
- Wood, K.R. and D.J. Barbara. 1971. Virus multiplication and peroxidase activity in leaves of cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivars systemically infected with the W strain of *Cucumber mosaic virus*. **Physiol. Pl. Path.** 1: 73-81.

Ye, J., J. Qu, J. F. Zhang, Y. F. Geng and R. X. Fang. 2009. A critical domain of the *Cucumber mosaic virus* 2b protein for RNA silencing suppressor activity. **FEBS Lett.** 583: 101–106.





ภาคผนวก

### 1. 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 ที่ใช้ปลูกเชื้อไวรัส CMV ด้วยวิธีกล

0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 31.2 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 71.7 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

เตรียม 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรจากสารละลาย

0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 39 มิลลิลิตร

0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 61 มิลลิลิตร

### 2. CTAB extraction buffer

2 % CTAB (hexadecyltrimethylammoniumbromid) 10 กรัม

2 % PVP (polyvinylpyrrolidone 40 K 29-32) 10 กรัม

100 mM Tris-HCl, pH 8.0 (conc. 1M) 50 มิลลิลิตร

25 mM EDTA (conc. 0.5M) 25 มิลลิลิตร

2 M NaCl 58.57 กรัม

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

### 3. SSTE buffer

1 M NaCl 11.7 กรัม

0.5 % SDS (conc. 10%) 10 มิลลิลิตร

10 mM Tris-HCl, pH 8.0 (conc. 1M) 2 มิลลิลิตร

1mM EDTA (conc. 0.5M) 400 ไมโครลิตร

ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตร

#### 4. Phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4

NaCl	8.0	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2.9	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	กรัม
KCl	0.2	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

#### 5. Carbonate coating buffer; pH 9.6

NaHCO <sub>3</sub>	2.93	กรัม
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 9.6 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

#### 6. Substrate buffer, pH 9.8

Diethanolamine	97	มิลลิลิตร
Sodium azide	0.2	กรัม
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้ได้ 9.8 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บแช่เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด

#### 7. Washing buffer (PBST) 1X

PBS	1000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

**8. Tris buffer saline (TBS), pH 7.4**

Tris-base	6.05	กรัม
NaCl	8.76	กรัม
NaN <sub>3</sub>	0.10	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.4 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

**9. Washing buffer (TBST)**

TBS	1,000	มิลลิลิตร
Tween-20	0.5	มิลลิลิตร

**10. Reaction mixed substrate สำหรับ Tissue print immunoblot assay**

น้ำกลั่น	8	มิลลิลิตร
Nitro blue tetrazolium salt (NBT)	1	มิลลิลิตร
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)	1	มิลลิลิตร

**11. 2X SDS-PAGE sample buffer**

0.2 M Tris, pH 6.8	6.25	มิลลิลิตร
10% SDS	40	มิลลิลิตร
0.02% Bromophenol blue	0.02	กรัม
16% Glycerol	16	มิลลิลิตร
5% 2-Mercapto ethanol	5	มิลลิลิตร

ละลายเข้าด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

**12. 5X SDS-PAGE running buffer**

Tris base	15.1	กรัม
Glycine	94	กรัม
10% (w/v) SDS	50	มิลลิลิตร

ละลายเข้าด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

**13. Protein staining solution**

0.2% Coomassie brilliant blue R250	2	กรัม
45% Methanol	450	มิลลิลิตร
45% Distilled water	450	มิลลิลิตร
10% Gracial acetic acid	100	มิลลิลิตร

ละลายเข้าด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

**14. Destaining solution**

25% Methanol	250	มิลลิลิตร
68% Distilled water	680	มิลลิลิตร
7% Gracial acetic acid	70	มิลลิลิตร

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นายภูวนารถ มณีโชติ  
เกิดวันที่ 27 สิงหาคม 2525  
สถานที่เกิด อำเภอเวียงป่าเป้า จังหวัดเชียงราย  
ประวัติการศึกษา วท.บ. (เกษตรศาสตร์) มหาวิทยาลัยแม่โจ้  
สถานที่ทำงานปัจจุบัน -  
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ งานวิจัยเรื่องการตรวจสอบหาเชื้อ *Potato mop-top virus* ในหัวมันฝรั่งนำเข้าจากต่างประเทศ  
ทุนที่เคยได้รับ ได้รับทุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (2550)