วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

การสร้าง infectious clones และทดสอบความสามารถในการก่อโรคของไวรัสใบหงิกเหลืองพริก

Construction and pathogenicity test of the infectious clones of *Pepper Yellow Leaf Curl Thailand Virus*

ณัฐทนง บุพิ[1] และ รัชนี ฮงประยูร[1, 2, 3]*

Nattanong Bupi[1] and Ratchanee Hongprayoon[1, 2, 3]*

[1] *ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140*
[1] *Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140*
[2] *ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140*
[2] *Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140*
[3] *ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900*
[3] *Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO)/PERDO-CHE, Bangkok 10900, Thailand*

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการสร้าง Infectious clones ของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองพริกที่พบในประเทศไทย และศึกษาความสามารถในการก่อโรคของ Infectious clones ใช้เชื้อ *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCTHV) ไอโซเลท BRM103 เป็นต้นแบบในการออกแบบไพรเมอร์เพื่อสร้าง infectious clones โดยการโคลน DNA-A และ DNA-B fragments เข้าสู่ pRI101 binary vector ถ่ายฝาก recombinant plasmid เข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ผลจากการทดสอบความสามารถในการก่อโรคโดยใช้ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) และพริก (*Capsicum* spp.) เป็นพืชทดสอบด้วยวิธี Agroinoculation พบว่า พืชทั้งสองชนิดสามารถแสดงอาการใบหงิกเหลืองซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากเชื้อเบโกโมไวรัสได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ 100% และ 10% ตามลำดับ ซึ่งพบอาการของโรคเฉพาะในกรรมวิธีที่ปลูกเชื้อด้วย pRI101DNA-A ร่วมกับ pRI101DNA-B เท่านั้น ผลจากงานวิจัยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการถ่ายทอดเชื้อไวรัส PepYLCTHV นอกจากการใช้แมลงพาหะ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเชื้อไวรัสชนิดนี้และสามารถนำไปประยุกต์กับการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานโรคใบหงิกเหลืองพริกได้ต่อไป
คำสำคัญ; การปลูกเชื้อด้วยอะโกรแบคทีเรีย; เบโกโมไวรัส; โคลนก่อโรค; พริก; ยาสูบ

ABSTRACT: This research aims to produce infectious clones of virus causing pepper yellow leaf curl disease in Thailand and evaluate their pathogenicity in test plants. *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCTHV) isolate BRM103 was used as a template to design DNA-A and DNA-B specific primer pairs for construction of the infectious clones. DNA-A and DNA-B fragments were inserted into pRI101 binary vector and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Pathogenicity testing was conducted in tobacco (*Nicotiana benthamiana*) and pepper (*Capsicum* spp.) by Agroinoculation. The results showed that only co-inoculation of PepYLCTHV DNA-A and DNA-B could produce typical begomovirus symptoms; yellowing and leaf curling, at 100 and 10% infection, respectively. This outcome provides another alternative to the conventional insect transmission which benefits further study of this virus and can be applied for screening of PepYLCTHV-resistance plants in the breeding program as well.
Keyword; agroinoculation; begomovirus; infectious clone; chili; tobacco

* corresponding author: agrrat@ku.ac.th

Received: date; February 11, 2021 Accepted: date; August 17, 2021 Published: date; February 5, 2022

บทนำ

โรคไวรัสใบหงิกเหลืองพริกที่เกิดจากเชื้อ *Pepper yellow leaf curl virus* (PepYLCV) จัดอยู่ใน family *Geminiviridae* genus *Begomovirus* อนุภาคมีลักษณะเป็นรูปทรงกลมคู่ ขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 18X30 นาโนเมตร มีสารพันธุกรรมเป็นกรดนิวคลิอิกชนิดดีเอ็นเอวงกลมสายเดี่ยว (single stranded closed circular DNA) มีจีโนม 2 ประเภท คือ monopartite genome ที่มีสารพันธุกรรมหนึ่งโมเลกุลเรียกว่า DNA-A และ bipartite genome ที่มีสารพันธุกรรมสองโมเลกุล ได้แก่ DNA-A และ DNA-B ขนาดของดีเอ็นเอแต่ละวงประมาณ 2.5–2.6 kb (Zhang et al., 2001) โดย DNA-A สามารถจำลองสารพันธุกรรม (replicate) และสร้างไวรัสที่สมบูรณ์ (virions) แต่ไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังเซลล์อื่นของพืชอาศัย (host) ได้ จึงต้องอาศัย DNA-B ช่วยในการเคลื่อนที่ของไวรัสเพื่อเข้าทำลายพืชและทำให้พืชเป็นโรค การเข้าทำลายที่สมบูรณ์จึงจำเป็นต้องใช้ทั้ง 2 สองโมเลกุลร่วมกัน จีโนมทั้งสองชนิดมีบริเวณที่ไม่แปลรหัส (common region) ประมาณ 200 นิวคลีโอไทด์ และมีโครงสร้างที่เป็น stem-loop มีการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็น TAATATTAC (nonanucleotide) ที่บริเวณจุดเริ่มต้นของการจำลองสารพันธุกรรม (v-ori) จัดเป็นบริเวณอนุรักษ์ที่พบในไวรัสสกุลนี้ (Hanley-Bowdoin et al., 2000) สามารถถ่ายทอดได้โดยมีแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะ (Sulandari et al., 2007) มีรายงานการระบาดของเชื้อเบโกโมไวรัสที่ทำให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตพริกอย่างรุนแรงในหลายประเทศของทวีปเอเชีย เช่น บังกลาเทศ จีน อินเดีย อินโดนีเซีย ไทย และ เวียดนาม (Kenyon et al., 2014) สำหรับเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกสามารถเข้าทำลายตั้งแต่ระยะต้นกล้า ทำให้พริกแสดงอาการใบเหลืองและด่างเหลืองอย่างรุนแรง ดอกร่วง ผลมีสีซีด ขนาดเล็กลงและหงิกงอ ต้นแคระแกร็น ส่งผลให้คุณภาพของผลผลิตลดลงและอาจทำให้ผลผลิตเสียหายได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Kumar et al., 2006; Marte and Wetter, 1986) ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบเชื้อ PepYLCV เป็นครั้งแรกในพริกขี้หนู (*Capsicum annuum*) ที่แสดงอาการใบหงิกเหลือง ซึ่งต่อมาพบการระบาดของโรคนี้ในแหล่งปลูกพริกทั่วทุกภาคของประเทศไทยจำนวนมากกว่า 20 จังหวัดที่มีการสำรวจ โดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น จังหวัดกาฬสินธุ์ สกลนคร ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี ซึ่งทำความเสียหายต่อการปลูกพริกอย่างรุนแรงถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะกล้า โดยพริกแสดงอาการใบด่างหงิกเหลือง ต้นแคระแกร็น และผลผลิตลดลงถึง 80% (เครือพันธุ์ และวันเพ็ญ, 2545; พิสสวรรณ และบุณณดา, 2558: Phatsaman, 2017)

การปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อโรคใบหงิกเหลืองที่เกิดจากเชื้อไวรัส PepYLCV เป็นแนวทางสำคัญประการหนึ่งสำหรับการแก้ไขปัญหาของโรค เนื่องจากยังไม่มีสารเคมีกำจัดเชื้อไวรัสพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่การปลูกเชื้อไวรัสเพื่อทดสอบความต้านทานโรคเพื่อประเมินความรุนแรงของโรคในพริกสายพันธุ์ต่าง ๆ ต้องอาศัยการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยแมลงหวี่ขาวเป็นพาหะ ไม่สามารถถ่ายทอดโรคโดยวิธีกล และเชื้อเบโกโมไวรัสมีปริมาณน้อยในต้นพืช (Saxena and Tiwari, 2017) ซึ่งความสำเร็จในการถ่ายทอดขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น ชนิด (species) ของเชื้อไวรัสและแมลงหวี่ขาว ความจำเพาะกับของแมลงหวี่ขาวกับเชื้อไวรัส ปริมาณของเชื้อไวรัส เป็นต้น (Fiallo-Olivé et al., 2020) นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ขาวรวมทั้งกระบวนการถ่ายทอดเชื้อไวรัสก็มีความยุ่งยากมากกว่าการถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยวิธีกล งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการพัฒนาเทคนิคการปลูกเชื้อโดยวิธี Agroinoculation ด้วยการสร้าง infectious clone ของเชื้อไวรัสใบหงิกเลืองพริกและทดสอบความสามารถในการก่อโรคโดยใช้พริกและยาสูบเป็นพืชทดสอบ

วิธีการศึกษา

การสร้าง Infectious clone ของเชื้อไวรัสโรคใบหงิกเหลืองพริก (Infectious clones-BRM103)

ในการสร้าง infectious clone ของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองพริก ได้เลือกใช้เชื้อไวรัส PepYLCTHV ไอโซเลท BRM103 จากงานวิจัยของ ณัฐทนงและรัชนี (2563) เป็นต้นแบบ เนื่องจากได้จำแนกชนิดของเชื้อไวรัสดังกล่าวเรียบร้อยแล้ว โดยมีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi .nlm.nih.gov/genbank/) สำหรับ DNA-A และ DNA-B คือ accession no. MK946436 และ MK946435 ตามลำดับ

ออกแบบไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์ infectious clones โดยใช้โปรแกรม FastPCR (Kalendar et al., 2017) จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PepYLCTHV isolate BRM103 (infectious clones-BRM103) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ประกอบด้วยไพรเมอร์ 4 ชุด (**Table 1**)

Table 1 Primers designed for construction of PepYLCTHV Infectious clones

Target	Product size (bp)	Primer	Sequence (5'-3')
DNA-A Fragment AF1	1,100	AF1-F	TGACTGGTCAATCAGTGTCTCTC
		AF1-R	CTTGCATATTGACCACCTGTCAC
DNA-A Fragment AF2	1,700	AF2-F	GTGACAGGTGGTCAATATGCAAG
		AF2-R	GTTTTGATGTGGATACTTGGGGAC
DNA-B Fragment BF1	1,300	BF1-F	GGGTCGTTCACATAGCATTTAGC
		BF1-R	GCCTCAATCCACTGTATCAAGG
DNA-B Fragment BF2	1,500	BF2-F	CCTTGATACAGTGGATTGAGGC
		BF2-R	CGGCTACGATTATTCAGTGGG

ชุดที่ 1 สำหรับการสร้าง DNA A Fragment AF1 (DNA-AF1) มีตำแหน่ง ORI ด้านปลาย 5' 1 ตำแหน่ง, ยีน AV2, ยีน AV1 และด้านปลาย 3' ที่มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ซ้อนทับกับด้านปลาย 5' ของ Fragment AF2 (overlap-A) ความยาว 20 นิวคลีโอไทด์ รวมความยาวของ PCR product DNA-AF1 เท่ากับ 1,017 นิวคลีโอไทด์

ชุดที่ 2 สำหรับสร้าง DNA A Fragment AF2 (DNA-AF2) มีด้านปลาย 5' มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ซ้อนทับกับด้านปลาย 3' ของ Fragment AF1 (overlap-A) ความยาว 20 นิวคลีโอไทด์, ยีน AC1, ยีน AC2, ยีน AC3, ยีน AC4 และจุด ORI ด้านปลาย 3' 1 ตำแหน่ง รวมความยาวของ PCR product DNA-AF2 เท่ากับ 2,024 นิวคลีโอไทด์

ชุดที่ 3 สำหรับสร้าง DNA B Fragment BF1 (DNA-BF1) มีจุด ORI ด้านปลาย 5' 1 ตำแหน่ง, ยีน BV1 และด้านปลาย 3' มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ซ้อนทับกับด้านปลาย 5' ของ Fragment BF2 (overlap-B) ความยาว 20 นิวคลีโอไทด์ รวมความยาวของ PCR product DNA-BF1เท่ากับ 1,610 นิวคลีโอไทด์

และ ชุดที่ 4 สำหรับสร้าง DNA B Fragment BF2 (DNA-BF2) ด้านปลาย 5' มีตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ซ้อนทับกับด้านปลาย 3' ของ Fragment BF1 (overlap-B) ความยาว 20 นิวคลีโอไทด์, ยีน BC1 และจุด ORI ด้านปลาย 3' 1 ตำแหน่ง รวมความยาวของ PCR product DNA-BF2 เท่ากับ 1,495 นิวคลีโอไทด์

กระบวนการ PCR ประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ pre–denaturation 95 ^{O}C นาน 2 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยาจำนวน 36 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย denaturation 95 ^{O}C นาน 30 วินาที annealing 55 ^{O}C นาน 30 วินาที และ extension 72 ^{O}C นาน 1 นาที 30 วินาที ขั้นตอนสุดท้ายคือ final extension 72 ^{O}C นาน 7 นาที หยุดปฏิกิริยาที่ 16 ^{O}C นาน 10 นาที ตรวจวิเคราะห์ PCR product โดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (LONZA, USA) เปรียบเทียบกับ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas, USA) ตัดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV สกัดชิ้น PCR product ออกจากเจลด้วย FavoPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit (Favorgen, Taiwan) ตามวิธีการของผู้ผลิต นำ PCR product ของ DNA-AF1 และ DNA-AF2 มาต่อกันโดยใช้ Gibson Assembly Cloning Master Mix (Gibson et al., 2009) ตามวิธีการของผู้ผลิต และดำเนินการเช่นเดียวกันสำหรับ DNA-BF1 และ DNA-BF2

การถ่ายฝาก (Infectious clones-BRM103) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404

นำชิ้นส่วนของ infectious clones-BRM103 ที่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกมาสอดแทรกเข้าสู่พลาสมิด pRI101 binary vector ตามวิธีการของ ณัฐทนง (2563) ตั้งชื่อว่า pRI101DNA-A และ pRI101DNA-B และถ่ายฝากเข้าสู่ *Agrobacterium tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ด้วยวิธีการ electroporation ตามคู่มือของ MicroPulser™ (Bio-Rad, USA) เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร 2xYT ที่มีสารปฏิชีวนะกานามัยซิน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มี recombinant plasmid มาตรวจหาชิ้นยีนด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการในเงื่อนไขเดียวกันกับการสังเคราะห์ Infectious

clones-BRM103 ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ตัดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV สกัด DNA-A fragment ออกจากเจลด้วย FavoPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit เพื่อตรวจสอบยืนยันลำดับนิวคลีโอไทด์ของ recombinant plasmid ที่ได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ทั้ง 4 ชุด ส่ง PCR product ของ DNA-AF1, DNA-AF2, DNA-BF1 และ DNA-BF2 ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Sanger sequencing method (Sanger and Coulson, 1975) กับบริษัท U2Bio (U2Bio, South Korea) และนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PepYLCTHV isolate BRM103 ด้วยโปรแกรม MEGA version X version 10.0.5 (http://www.megasoftware.net/)

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในพืชทดสอบโดยใช้ Infectious clones-BRM103

พัฒนาวิธีการปลูกเชื้อไวรัสโรคใบหงิกเหลืองพริกในพืชทดสอบโดยใช้ infectious clones-BRM103 ด้วยเทคนิค Agroinoculation ดัดแปลงจากวิธีการของ Koeda et al. (2017) โดยเลี้ยง *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มี pRI101DNA-A และ pRI101DNA-B recombinant plasmid ในอาหาร LB broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม acetosyringone ความเข้มข้น 100 mM (ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เขย่าต่อที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เซลล์แขวนลอยเชื้อที่มีค่า OD_{600} ประมาณ 1.2 จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ โดยใช้ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เทอาหารเลี้ยงเชื้อออกแล้วละลายตะกอนเซลล์โดยใช้บัฟเฟอร์ 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) (10 mM MES + 10 mM $MgCl_2$ + 100 mM acetosyringone) ปรับความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยให้ได้ค่า OD_{600} เท่ากับ 0.5 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

บรรจุเซลล์แขวนลอย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 ที่มี pRI101DNA-A และ pRI101DNA-B recombinant plasmid ที่ถูกชักนำและกระตุ้นให้เกิดการถ่ายยีนโดยการเติม acetosyringone แล้ว ในหลอดฉีดยาที่ไม่มีเข็ม (needless syringe) ขนาด 3 มิลลิลิตร ทำการฉีดอัด (infiltrate) เข้าใต้ใบล่างสุดของต้นพืชจำนวน 2 ใบ ใบละ 1 มิลลิลิตร โดยแบ่งฉีดอัด 4 จุดต่อใบ และแบ่งการทดลองเป็น 4 กรรมวิธี โดยปลูกเชื้อด้วย infectious clones ดังนี้ 1) pRI101DNA-A 2) pRI101DNA-B 3) pRI101DNA-A ร่วมกับ pRI101DNA-B และ 4) pRI101 ที่ไม่มี insert ซึ่งใช้เป็นกรรมวิธีควบคุม

ใช้พืชทดสอบอายุ 45 วันหลังจากการเพาะเมล็ด ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) ทั้งหมด 25 ซ้ำต่อกรรมวิธี และพริกพันธุ์การค้า (*Capsicum* spp.) ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พริก Super-hot พริกมันบางช้าง พริกมันดำ TVRC 365 พริกขี้หนูผลใหญ่ TVRC 758 พริกกระเหรี่ยงยาว และพริกขี้หนูเทวี 60 สายพันธุ์ละ 10 ซ้ำต่อกรรมวิธี เลี้ยงพืชทดสอบในห้องปลอดแมลง (ณัฐทนง, 2563) ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส และมีช่วงเวลาให้แสงเพื่อการสังเคราะห์แสง 12 ชั่วโมง บันทึกลักษณะอาการที่เกิดขึ้น ตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ชุดไพรเมอร์ทั้ง 4 ชุด ตามวิธีการในเงื่อนไขเดียวกันกับการสังเคราะห์ infectious clones-BRM103 และบันทึกผลเป็นระยะเวลา 30 วันหลังการปลูกเชื้อ

การตรวจสอบดีเอ็นเอของ Infectious clones เชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกด้วยเทคนิค PCR

ตรวจสอบดีเอ็นเอของ infectious clones-BRM103 ในพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบและพริก ด้วยวิธีการ direct-PCR โดยใช้ DirectUP™ PCR Kit (Biotech rabbit, Germany) ตามวิธีการของผู้ผลิต และใช้กระบวนการ PCR เช่นเดียวกับตามเงื่อนไขเดียวกันกับการสังเคราะห์ infectious clones-BRM103 ตรวจสอบดีเอ็นเอทุกต้นพืชทดสอบในทุกกรรมวิธี นำไปวิเคราะห์ขนาดของดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ตามวิธีการข้างต้น และบันทึกผลการตรวจสอบดีเอ็นเอของ infectious clones ในพืชทดสอบที่ระยะเวลา 30 วันหลังการปลูกเชื้อ

การตรวจสอบอนุภาคไวรัสที่ได้จาก Infectious clones เชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริก

การตรวจหาอนุภาคไวรัสในยาสูบที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย infectious clones-BRM103 โดยสุ่มตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่างต่อกรรมวิธี เตรียมตัวอย่างแบบ Dip preparation ดัดแปลงตามวิธีการของ Arneodo et al. (2005) จากนั้นตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) (JEM-1230, JEOL, Japan) ณ ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง หน่วยอนุรักษ์และพัฒนาทรัพยากรชีวภาพ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

ผลการทดลอง

การสร้าง Infectious clone ของเชื้อไวรัสโรคใบหงิกเหลืองพริก (Infectious clones-BRM103)

การสร้าง infectious clones-BRM103 ของเชื้อ PepYLCTHV โดยโคลนเข้าสู่พลาสมิด pRI101 มีความสมบูรณ์ตามแผนการสร้าง (**Figure 1**) และเมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์เพื่อยืนยันความถูกต้องโดยใช้ไพรเมอร์ 4 ชุด และส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์อีกครั้ง พบว่า PCR product มีขนาดเท่ากับดีเอ็นเอเป้าหมาย ได้แก่ DNA-AF1, DNA-AF2, DNA-BF1 และ DNA-BF2 โดยมีความยาวเท่ากับ 1,017 2,024 1,610 และ 1,495 นิวคลีโอไทด์ ตามลำดับ (**Figure 2**) และมีความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 100% เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PepYLCTHV isolate BRM103 ด้วยโปรแกรม MEGA version X version 10.0.5 (http://www.megasoftware.net/)

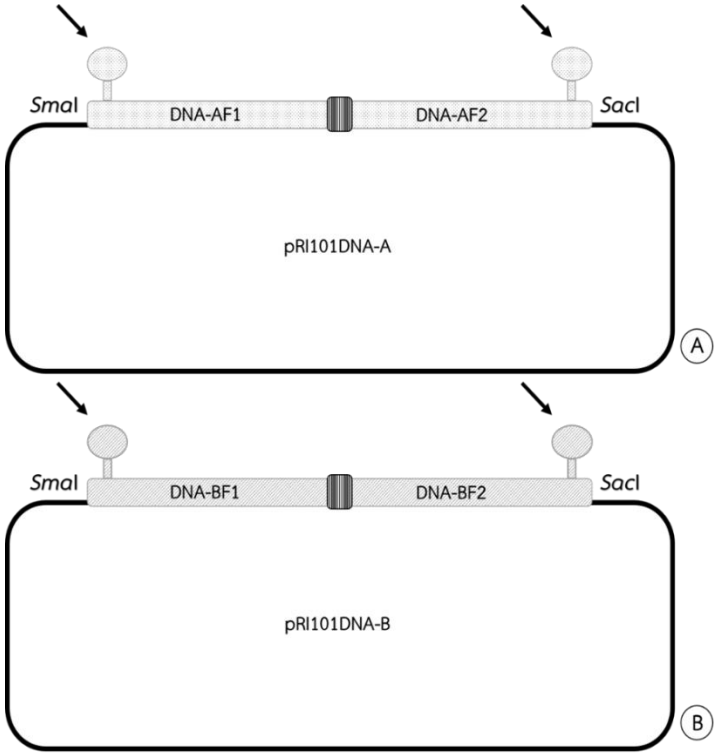

Figure 1 Construction strategy of the infectious clones-BRM103 comprising pRI101DNA-A (A) and pRI101DNA-B (B) showing viral inserts for DNA-A fragment (DNA-AF1 and DNA-AF2) and DNA-B fragment (DNA-BF1 and DNA-BF2) with conserved stem-loops (black arrows) in both plasmids. Overlapped sequences are indicated by dense rectangles

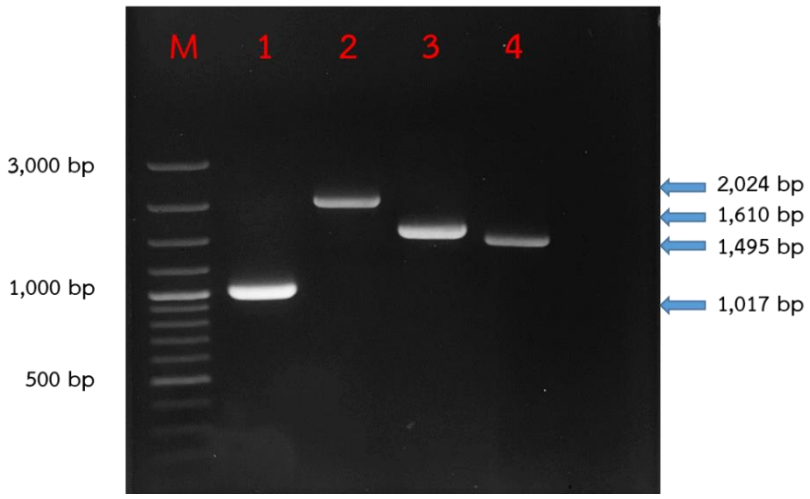

Figure 2 Electrophoretic analysis to verify the infectious clones-BRM103 using PCR technique with 4 designed primer pairs. Lane 1-4 are DNA-AF1, DNA-AF2, DNA-BF1, and DNA-BF2, respectively compared to 100 bp plus DNA Ladder (M)

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคในพืชทดสอบโดยใช้ Infectious clones-BRM103

การทดสอบความสามารถในการก่อโรคของ infectious clones-BRM103 โดยใช้ยาสูบเป็นพืชทดสอบ เนื่องจากอยู่ในวงศ์ *Solanaceae* เช่นเดียวกับพริกและมะเขือเทศ และมีการใช้เป็นพืชทดสอบอย่างแพร่หลายในทางไวรัสวิทยาของพืช (Bally et al., 2015; Goodin et al., 2008) ผลการทดลองพบว่า ยาสูบในกรรมวิธีที่ 3 ซึ่งปลูกเชื้อด้วย pRI101DNA-A ร่วมกับ pRI101DNA-B แสดงลักษณะอาการของโรคทุกต้น (100 %) (**Table 2**) โดยเริ่มแสดงอาการประมาณ 7 วันหลังจากการปลูกเชื้อ พบใบยอดมีอาการใบหงิก (leaf curl) ลดรูป (leaf distortion) และเห็นได้ชัดเจนประมาณวันที่ 12 ซึ่งมีอาการเพิ่มขึ้นบนใบที่แตกมาใหม่ ได้แก่ ใบหงิกและเหลืองเล็กน้อย (yellowing) โดยพบอาการใบหงิก ลดรูปรุนแรงทั่วทั้งต้น หลังจากปลูกเชื้อไปแล้ว 30 วัน (**Figure 3**) แต่ไม่พบอาการผิดปกติในกรรมวิธีอื่น

สำหรับการทดลองที่ใช้พริกเป็นพืชทดสอบจำนวน 6 พันธุ์ พบว่า มีเพียงพริกกะเหรี่ยงยาวเท่านั้นที่แสดงอาการของโรค ซึ่งเกิดขึ้นเฉพาะในกรรมวิธีที่ 3 ที่ปลูกเชื้อด้วย pRI101DNA-A ร่วมกับ pRI101DNA-B ซึ่งเริ่มแสดงอาการประมาณวันที่ 14 หลังจากการปลูกเชื้อ ใบยอดที่แตกใหม่มีอาการใบหงิก (leaf curl) ในขั้นต้น ต่อมาอีก 2-3 วัน มีอาการลดรูป (leaf distortion) ร่วมด้วย โดยเห็นลักษณะดังกล่าวชัดเจนประมาณ 17 วันหลังการปลูกเชื้อ ต่อมาใบพริกแสดงอาการเหลือง (yellowing) ใบที่แตกมาใหม่มีอาการเพิ่มขึ้นและพบอาการใบหงิกเหลืองทั่วทั้งต้นประมาณ 30 วันหลังการปลูกเชื้อ (**Figure 4**) โดยพบทั้งหมดจำนวน 1 ต้น จาก 10 ต้นที่ทำการทดสอบ คิดเป็น 10 % ของจำนวนพืชทดสอบทั้งหมดในกรรมวิธีนี้ ส่วนกรรมวิธีอื่นไม่พบลักษณะอาการผิดปกติ (**Table 2**) และไม่พบผลผลิตดีเอ็นเอเมื่อตรวจสอบด้วยวิธี PCR และใช้ไพรเมอร์ทั้ง 4 ชุด (**Table 1**)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า infectious clones-BRM103 ที่สร้างขึ้นในงานวิจัยนี้สามารถก่อโรคกับพืชทดสอบทั้งสองชนิด แต่เปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคในพริกยังต่ำ คือ 10 % เมื่อเทียบกับยาสูบที่สามารถถ่ายทอดโรคได้ถึง 100 % ทั้งนี้ เนื่องจากรายงานการสร้าง infectious clone ของเชื้อชนิดนี้มีน้อยมากและยังไม่พบรายงานในประเทศไทย แต่จากการศึกษาของ Koeda et al. (2018) ที่รายงานการปลูกเชื้อโดยใช้ infectious clones ของเชื้อ *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus* (PepYLCIV) เพื่อทดสอบความสามารถในการก่อโรคด้วยเทคนิค Agroinoculation โดยใช้ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ GV2260 และ EHA105 เป็นพาหะ ในยาสูบ (*N. benthamiana*) และพริก (*C. annuum*) พบว่ายาสูบ (*N. benthamiana*) สามารถแสดงอาการของโรคได้ใน 2 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การก่อโรคอยู่ที่ 100 % และในพริก (*C. annuum*) เฉพาะสายพันธุ์ No.218 สามารถแสดงอาการได้ 5-6 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ โดยมีเปอร์เซ็นต์การก่อโรคอยู่ที่ 55-75 % จะเห็นได้ว่าการเลือกใช้สายพันธุ์ของพริกและสายพันธุ์ *A. tumefaciens* มีผลต่อการแสดงออกของลักษณะอาการของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริก ปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับการสร้าง infectious clone การปลูกเชื้อ

ด้วยเทคนิค Agroinoculation รวมทั้งข้อมูลการแสดงออกทางพันธุกรรมของพริกที่มีผลต่อการปลูกเชื้อไวรัสชนิดนี้มีน้อยมาก โดยเฉพาะยังไม่พบรายงานการสร้าง infectious clone ของ PepYLCTHV มาก่อนในประเทศไทย จึงควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกจากแหล่งต่าง ๆ สายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* สายพันธุ์พริกที่ต้องการใช้ทดสอบการเกิดโรค และปรับปรุงวิธีการปลูกเชื้อด้วยเทคนิค Agroinoculation เพื่อความสำเร็จในการปลูกเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นควรมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น ความหลากหลายของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกจากแหล่งต่าง ๆ สายพันธุ์ของ *A. tumefaciens* ที่ใช้เป็นพาหะ สายพันธุ์พริกที่ต้องการใช้ทดสอบการเกิดโรค สภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการถ่ายทอดเชื้อ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อยอดสำหรับเชื้อไวรัสชนิดนี้และเบโกโมไวรัสชนิดอื่นต่อไป เนื่องจากเชื้อเบโกโมไวรัสจัดเป็นไวรัสกลุ่มใหญ่ที่มีส่วนสำคัญต่อการทำความเสียหายกับพืชผักเศรษฐกิจที่มีรายงานในปัจจุบันในประเทศไทย (Charoenvilaisiri et al., 2020)

Table 2 Results of Agroinoculation on *Nicotiana benthamiana* and BIRD CHILI (*Capsicum* spp.) with Infectious clones-BRM103 confirmed by PCR technique using 4 primer sets

Treatments		No. of plants tested	PCR product		Symptoms
			DNA-A	DNA-B	
N. benthamiana	pRI101	10	0/10*	0/10	No symptom
	pRI101DNA-A	45	0/45	-	No symptom
	pRI101DNA-B	45	-	0/45	No symptom
	pRI101DNA-A + pRI101DNA-B	45	45/45	45/45	leaf curl, yellowing
BIRD CHILI (*Capsicum* spp.)	pRI101	10	0/10	0/10	No symptom
	pRI101DNA-A	10	0/10	-	No symptom
	pRI101DNA-B	10	-	0/10	No symptom
	pRI101DNA-A + pRI101DNA-B	10	1/10	1/10	leaf curl, yellowing

*Number of infected plants / total plant inoculated

Figure 3 Symptoms observed on *Nicotiana benthamiana* agroinoculated at 30 days after inoculation with infectious clones-BRM103. Yellow leaf curl symptoms observed only in the treatment of pRI101DNA-A+pRI1010DNA-B (C) compared to no symptom on pRI101DNA-A (A), pRI1010DNA-B (B) and control treatment (D)

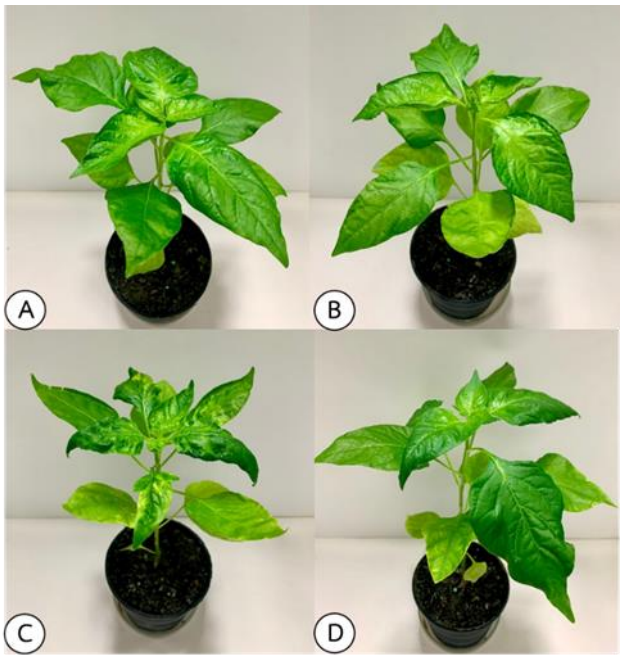

Figure 4 Symptoms observed on BIRD CHILI (*Capsicum* spp.) at 30 days after inoculation with the infectious clones-BRM103. Yellow leaf curl symptoms observed only in the treatment of pRI101DNA-A+pRI1010DNA-B (C) compared to no symptom on pRI101DNA-A (A), pRI1010DNA-B (B) and control treatment (D)

การตรวจสอบอนุภาคไวรัสในพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเชื้อจาก Infectious clones-BRM103

การตรวจอนุภาคไวรัสในยาสูบที่ได้รับการปลูกเชื้อด้วย infectious clones-BRM103 โดยใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคเบโกโมไวรัสที่สมบูรณ์ซึ่งมีลักษณะเป็นอนุภาคคู่ (geminated particles) แต่ละอนุภาคเป็นรูปทรงกลมหลาย

เหลี่ยม (icosahedra) ขนาดประมาณ 22x40 นาโนเมตร ในตัวอย่างใบยาสูบจากกรรมวิธีที่ 3 ที่ได้รับการปลูกเชื้อ pRI101DNA-A ร่วมกับ pRI101DNA-B เท่านั้น (**Figure 5**)

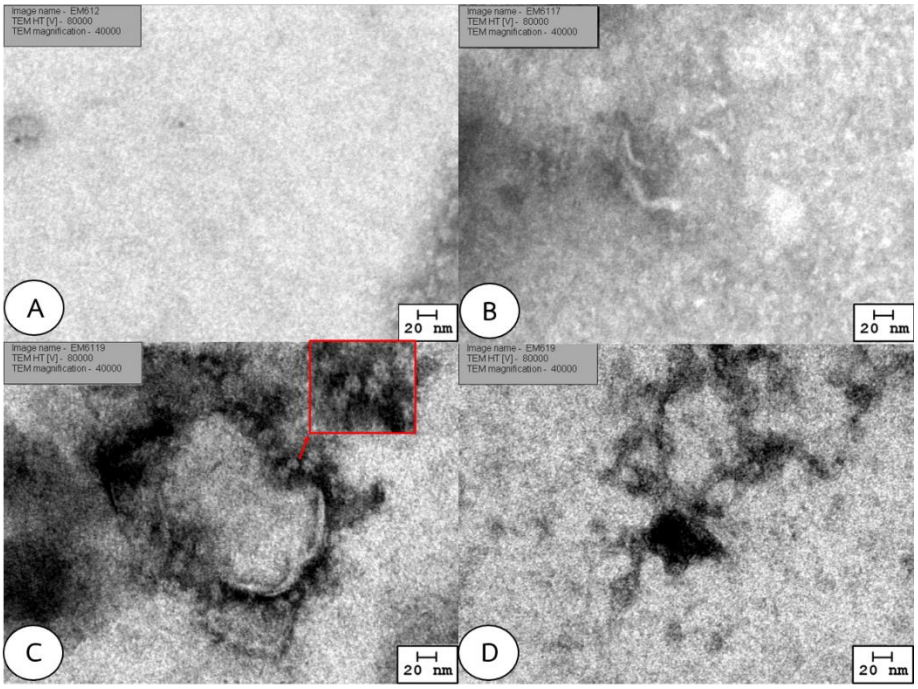

Figure 5 Transmission Electron Microscopy for detection of virus particles in *Nicotiana benthamiana* agroinoculated with the infectious clones-BRM103, 30 days after inoculation. Geminate particles are observed only in the treatment of pRI101DNA-A+pRI1010DNA-B (C) compared to the negative results in the treatments with pRI101DNA-A (A), pRI1010DNA-B (B) and control (D).

สรุป

งานวิจัยนี้รายงานความสำเร็จในการสร้าง infectious clones ของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกโดยใช้ PepYLCTHV ไอโซเลท BRM103 เป็นแหล่งของยีน โดยเพิ่มปริมาณยีน DNA-A และ DNA-B ด้วยเทคนิค PCR และใช้ไพรเมอร์ที่ออกแบบในงานวิจัยนี้ โคลนยีนดังกล่าวเข้าสู่พลาสมิด pRI1010 และถ่ายฝากเข้าสู่แบคทีเรีย *A. tumefaciens* สายพันธุ์ LBA4404 รวมทั้งการพัฒนาเทคนิคการปลูกเชื้อด้วยวิธี Agroinoculation การทดสอบความสามารถในการก่อโรคกับพืชอาศัย 2 ชนิด ได้แก่ ยาสูบ (*N. benthamiana*) และพริกพันธุ์การค้า (*Capsicum* spp.) รวม 5 สายพันธุ์ ได้แก่ พริก Super-hot พริกมันบางช้าง พริกมันดำ TVRC 365 พริกขี้หนูผลใหญ่ TVRC 758 พริกกระเหรี่ยงยาว และพริกขี้หนูเทวี 60 ผลการทดสอบพบเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคในยาสูบและพริกเท่ากับ 100% และ 10 % ตามลำดับ โดยมีเพียงพริกกะเหรี่ยงยาวเท่านั้นที่ติดโรค และพบว่าพืชที่แสดงอาการจะเกิดกับพืชที่ปลูกเชื้อด้วย pRI101DNA-A ร่วมกับ pRI101DNA-B เท่านั้น งานวิจัยนี้ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นของการผลิต infectious clone ของเชื้อ PepYLCTHV ที่เข้าทำลายพริก แต่ยังต้องปรับปรุงวิธีการเพื่อให้มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดโรคไปยังพริกได้สูงขึ้น

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนทุนวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ตามยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562 และขอขอบคุณศูนย์

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ในการสนับสนุนห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่จำเป็นในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และวันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมัน. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

ณัฐทนง บุพิ. 2563. การสร้างโคลนก่อโรคและความสามารถในการก่อโรคของไวรัสใบหงิกเหลืองพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ณัฐทนง บุพิ และรัชนี ฮงประยูร. 2563. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองพริกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. แก่นเกษตร. 48(5): 954-965.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ และบุณณดา ศรีคำผึ้ง. 2558. ความแตกต่างทางพันธุกรรมของเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศและพริกและการถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหวี่ขาว. น. 28-29. ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 12 อารักขาพืชเพื่ออาหารปลอดภัย เสริมสร้างเศรษฐกิจไทยให้ยั่งยืน 20-22 ตุลาคม 2558. โรงแรมดุสิต ไอส์แลนด์ รีสอร์ท, เชียงราย.

Arneodo, J., S.D. Breuil, S. Lenardon, and L. Conci. 2005. Brief note natural infection of *Viola cornuta* (Violaceae) with *Cucumber mosaic virus*, subgroup I. Biocell. 29(2): 205-207.

Bally, J., K. Nakasugi, F. Jia, H. Jung, S.Y. Ho, M. Wong, C.M. Paul, F. Naim, C.C. Wood, R.N. Crowhurst, and R.P. Hellens. 2015. The extremophile *Nicotiana benthamiana* has traded viral defence for early vigour. Nature Plants. 1(11): 15165.

Charoenvilaisiri, S., C. Seepiban, N. Phironrit, B. Phuangrat, K. Yoohat, R. Deeto, O. Chatchawankanphanich, and O. Gajanandana. 2020. Occurrence and distribution of begomoviruses infecting tomatoes, peppers and cucurbits in Thailand. Crop Protection. 127: 104948.

Fiallo-Olivé, E., L-L Pan, S.-S. Liu, and J. Navas-Castillo. 2020. Transmission of begomoviruses and other whitefly-borne viruses: dependence on the vector species. Phytopathology. 110: 10-17.

Gibson, D.G., L. Young, R. Y. Chuang, J.C. Venter, C.A. Hutchison, and H.O. Smith. 2009. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nature methods. 6(5): 343-345.

Goodin, M.M., D. Zaitlin, R.A. Naidu, and S.A. Lommel. 2008. *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant–pathogen interactions. Molecular plant-microbe interactions. 21(8): 1015-1026.

Hanley-Bowdoin, L., S. B. Settlage, B.M. Orozco, S. Nagar, and D. Robertson. 2000. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 35(2): 105-140.

Kalendar, R., B. Khasssenov, Y. Ramankulov, O. Samuilova, and K. I. Ivanov. 2017. FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. Genomics. 109(3-4): 312-319.

Kenyon, L., S. Kumar, W.-S. Tsai, and J.A. Hughes. 2014. Chapter Six - Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. Advances in Virus Research. 90: 297-354.

Koeda, S., K. Homma, Y. Tanaka, E. Kesumawati, S. Zakaria, and S. Kanzaki. 2017. Highly efficient agroinoculation method for tomato plants with *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus*. The Horticulture Journal. 86(4): 479-486.

Koeda, S., K. Homma, Y. Tanaka, D. Onizaki, E. Kesumawati, S. Zakaria, and S. Kanzaki. 2018. Inoculation of capsicums with *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus* by combining agroinoculation and grafting. The Horticulture Journal. 87(3): 364-371.

Kumar, S., S. Kumar, M. Singh, A.K. Singh, and M. Rai. 2006. Identification of host plant resistant to pepper leaf curl virus in chilli (*Capsicum* species). Scientia horticulturae. 110: 359-361.

Marte, M., and C. Wetter. 1986. Occurrence of pepper mild mottle virus in pepper cultivars from Italy and Spain. Journal of Plant Diseases and Protection. 93(1): 37-43.

Phatsaman, T. 2017. Epidemiology of pepper viruses in Thailand and development of diagnostic techniques for related tobamoviruses. Ph.D. Thesis, Graduate School Kasetsart University, Thailand.

Sanger, F., and A. R. Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of molecular biology. 94(3): 441-448.

Saxena, S., and A. K. Tiwari. 2017. Begomoviruses: Occurrence and management in Asia and Africa. Springer, Singapore.

Sulandari, S., S. H. Hidayat, R. Suseno, J. Harjosudarmo, and S. Sosromarsono. 2007. Transmission of pepper yellow leaf curl virus by the insect vector Bemisia tabaci Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae). Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences. 13(1): 10-17.

Zhang, W., N. H. Olson, T. S. Baker, L. Faulkner, M. Agbandje-McKenna, M. I. Boulton, and R. McKenna. 2001. Structure of the Maize streak virus geminate particle. Virology. 279(2): 471-477.