

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การแยกเชื้อ จำแนกชนิด และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ
ไวรัสรูปท่อนยาวคดที่เป็นสาเหตุโรคนิวโมโตสของเสาวรสพันธุ์สีม่วง

Isolation, Identification and Partial Nucleotide Sequence of
a Flexuous Rod Virus Causing Yellow Spot Mosaic of Purple Passionfruit

โดย

นายสิทธิชัย บุญรอด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุ์วิศวกรรม)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สิทธิชัย บุญรอด 2553: การแยกเชื้อ จำแนกชนิด และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของไวรัสรูปท่อนยาวคดที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างจุดเหลืองของเสาวรสพันธุ์สีม่วง ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัย (พันธุ์วิศวกรรม) สาขาพันธุวิศวกรรม โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เข็มสมบัติ, Dr.Agr. 73 หน้า

เสาวรสรูปท่อนเสาวรสรูปท่อน (Passiflora edulis) ที่ปลูกในพื้นที่ส่งเสริมของโครงการหลวงจังหวัดเชียงใหม่ ประสบปัญหาการเป็นโรควูดดิเนส (woodiness) ที่เกิดจากไวรัส ทำให้ผลเสาวรสรเสียหายคุณภาพตกต่ำ จึงต้องมีการศึกษาจำแนกชนิดไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคและตรวจสอบต้นพันธุ์ให้ปราศจากโรคเสาวรสรที่เป็นโรคนี้แสดงอาการใบหนา แข็ง ใบด่างจุดเหลือง ต่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนและผลบิดเบี้ยวแคระแกร็น ศึกษาตัวอย่างเสาวรสรที่เป็นโรคนี้นับจำนวน 20 ต้นและแบ่งลักษณะอาการเป็น 2 กลุ่มได้แก่ อาการใบหนา แข็ง ด่างเหลือง ด่างจุดเหลือง และอาการต่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยวผิดปกติ แยกเชื้อไวรัสจากเสาวรสรโดยปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนใบ *Chenopodium quinoa* จากนั้นปลูกเชื้อจากแผลจุดแต่ละจุดลงบนเสาวรสรสีม่วงและเลือกต้นเสาวรสรเป็นโรคไอโซเลท SY2 ที่แสดงอาการใบด่างจุดเหลืองมาทำการจำแนกชนิดไวรัส ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลจากเสาวรสร SY2 ลงบนพืชทดสอบ พบอาการแผลจุดสีน้ำตาลและเส้นใบเหลืองบนถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*), ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis*), ถั่วขาว (*Bruguiera cylindrica*) และถั่วแขก (*Phaseolus vulgaris* cv. Yamashiro) ศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อภายในใบเสาวรสร SY2 ด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคไวรัสรูปท่อนยาวคดขนาดเฉลี่ย 11.3 x 642 นาโนเมตร และพบผลึกโปรตีน inclusion bodies แบบ pinwheel, tubular และ scroll อยู่ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ โคลนยีนบางส่วนของด้านปลาย 3' ของจีโนมขนาด 1,563 นิวคลีโอไทด์ซึ่งประกอบด้วยยีนอาร์เอ็นเอ โพลีเมอเรส (NIb) บางส่วนความยาว 630 นิวคลีโอไทด์ ยีน CP เต็มยีนขนาด 819 นิวคลีโอไทด์และส่วนที่ไม่แปลรหัสทางปลายสายด้าน 3' (3'UTR) บางส่วนความยาว 111 นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนของไวรัสในเสาวรสร SY2 กับไวรัสสาเหตุโรคของเสาวรสรและพืชอื่นอีก 22 ชนิดด้วยโปรแกรม clustalW พบว่าไวรัส SY2 เหมือนกับ *Telasma mosaic virus* (TeMV) ที่ระดับ 87% และพบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CP ที่มีความเฉพาะตัวของไอโซเลท SY2 บริเวณตำแหน่งที่ 18-35 สำหรับ นิวคลีโอไทด์ส่วนของ 3'UTR เหมือนกับ TeMV ที่ระดับ 81% ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree แบบ Neighbour joining method แสดงให้เห็นว่า ไวรัส SY2 จับคู่ใกล้ชิดกับ TeMV จากเวียตนามและเกาะกลุ่มอยู่กับ *Passionfruit woodiness virus* จากออสเตรเลีย (PWV-AUS), potyvirus ในไม้ดอกจากสหรัฐอเมริกาและถั่วจากจีนและแอฟริกาใต้ ไวรัสอีกกลุ่มหนึ่งที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันประกอบด้วย PWV จากไต้หวันและญี่ปุ่น, SMV และ potyvirus ที่พบในถั่วหลายชนิด ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าไวรัสในเสาวรสร SY2 เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดมากกับเชื้อ TeMV รวมทั้งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ PWV-AUS และเสนอให้ตั้งชื่อไวรัสชนิดนี้ว่า *Passionfruit woodiness potyvirus*- yellow spot strain (PWV-YS)

Sittichai Boonrawd 2010: Isolation, Identification and Partial Nucleotide Sequence of a Flexuous Rod Virus Causing Yellow Spot Mosaic of Purple Passionfruit. Master of Science (Genetic Engineering), Major Field: Genetic Engineering, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Pissawan Chiemsombat, Dr.Agr. 73 pages.

Purple passionfruit (*Passiflora edulis*) No.2 which is widely grown in the Royal Project extension area in Chiangmai Province is severely affected by woodiness disease caused by a virus. The disease causes low yield and decreases the quality of the fruits. It is necessary to identify the causal virus and inspect mother plants in order to produce virus free stocks. Twenty diseased passionfruit plants investigated in this study showed two types of symptoms e.g. severe leaf blistering with yellow spot mosaic, and dark and light green mosaic leaf with distortion. The virus was isolated from infected leaves by mechanical inoculation on the assay plant, *Chenopodium quinoa* and *C. amaranticolor*. Chlorotic local lesions developed on inoculated *Chenopodium* leaves were singly transferred to passionfruit seedlings for virus propagation. The passionfruit plant developing yellow spot symptom was selected for further study and called SY2 isolate. Morphological and ultrastructural study, and partial nucleotide sequencing were performed for virus identification. Dip preparation of SY2 leaves revealed flexuous rod shaped particles with modal length of about 11.3 x 642 nm. Pinwheel, tubular and scroll inclusion bodies were readily detected in cytoplasm of the infected leaf cells. Host range of SY2 isolate included cowpea; *Vigna sinensis*, yard long bean; *Vigna sesquipedalis*, white bean; *Bruguiera cylindrica* and kidney bean; *Phaseolus vulgaris* cv. Yamashiro. A fragment of viral 3' proximal genomic RNA was amplified by using RT-PCR, cloned and sequenced. This fragment is 1,563 nucleotide (nt) long, comprising 630 nt of partial NIb gene, 819 nt of entire coat protein (CP) gene, and 111 nt of partial 3' untranslated (UTR) region. ClustalW analysis of amino acid sequence revealed that SY2 isolate belonged to a potyvirus member with 87% highest identity to *Telosma mosaic potyvirus* (TeMV), and contained a chain of 17 unique amino acid sequence at positions 18-35 of CP-N terminal. In addition, SY2 partial 3' UTR sequence was 81% identity to TeMV. Phylogenetic tree reconstructed by CP amino acid sequence showed pairing of SY2 isolate with TeMV in Vietnam, and formed a cluster with potyvirus species causing woodiness disease of passionfruit in Australia, ornamental potyviruses in America, and bean potyviruses in China and South Africa. The second cluster contained distinct passionfruit woodiness viruses from Taiwan, Japan, soybean mosaic virus, and several legumes potyviruses. From these results, SY2 potyvirus causing woodiness disease of purple passionfruit No.2 is considered to be a closed strain to TeMV and closed species to PWV-Aus. The name passionfruit woodiness virus yellow spot strain; PWV-YS is proposed.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ผศ. ดร. พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่ให้โอกาสในการทำงานวิจัยด้านไวรัสโรคพิษ และพันธุวิศวกรรม พร้อมทั้งให้ความรู้ คำแนะนำในการวิจัย ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ ด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณ ผศ. ดร. รัชนี ฮงประยูร และ รศ. ดร. สิริภัทร์ พราหมณีย์ กรรมการ เป็นอย่างสูงที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำในการวิจัย ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย และขอขอบคุณ ดร. ปาริชาติ เบรินส์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย เป็นอย่างสูง ที่ให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงที่สนับสนุนทุนวิจัยประจำปี 2549 -2551 พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือในการวิจัย การเก็บตัวอย่าง พร้อมทั้งให้กำลังใจในการศึกษา และการวิจัย ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อสุเพียบ คุณแม่ประนอม บุญรอด น้องแอร์ และน้องหนูย ครอบครั้ว ที่เสียสละสนับสนุนทุนด้านการศึกษา และให้กำลังใจเป็นอย่างดี ตลอดระยะเวลาการศึกษา

ความดีทั้งหลายแห่งวิทยานิพนธ์ ขอมอบแต่ บิดา-มารดา ครู อาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอน ประสิทธิ์ประสาทความรู้ และคำแนะนำที่ดีตลอดระยะเวลาการศึกษา

สิทธิชัย บุญรอด

เมษายน 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	18
ผลการทดลอง และวิจารณ์	26
สรุปผลการทดลอง	62
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	71
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	73

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	พืชทดสอบที่เกิดจากการปลูกเชื้อไวรัสจากเสาวรสม่วงด้วยวิธีกล	9
2	อาการที่เกิดจากการเข้าทำลายโดยเชื้อไวรัสจากเสาวรสม่วง	11
3	ผลการตรวจไวรัสในตัวอย่างใบเสาวรสที่แสดงอาการของโรคไวรัสด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อ <i>Passionfruit woodiness potyvirus</i> (PWV)	27
4	ลักษณะอาการบนพืชทดสอบ 8 ชนิดที่ปลูกเชื้อไวรัสจากเสาวรส SY2	39
5	ไวรัสที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบกับไวรัสจากเสาวรส SY2	49
6	การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Coat protein ของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างจุดเหลือง SY2 กับเชื้อ <i>Potyvirus</i> ชนิดอื่น	53
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 3' UTR ของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างจุดเหลือง SY2 เปรียบเทียบกับเชื้อ <i>Potyvirus</i> ชนิดอื่นที่เข้าทำลายเสาวรสและพืชชนิดอื่นอีก 12 ชนิด	57

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทดลองระดับโมเลกุลเพื่อศึกษาและจำแนกชนิดเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคใบด่างจุดเหลืองในเสาวรส	25
2	ลักษณะอาการของโรคไวรัสบนใบเสาวรสสีม่วง (<i>Passiflora edulis</i>)	28
3	อาการบนพืชอาศัยจากการปลูกเชื้อจากใบเสาวรสที่แสดงอาการ ใบหนาแข็งต่างเหลือง และต่างจุดเหลือง	29
4	อาการบนพืชอาศัยจากการปลูกเชื้อจากใบเสาวรสอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยว และผิดรูป	30
5	ลักษณะอนุภาคไวรัสจากใบเสาวรส SY2 เตรียมตัวอย่างแบบ Dip preparation	33
6	ลักษณะของผลึกโปรตีน (inclusion bodies) ที่พบในไซโทพลาสซึมของใบเสาวรส SY2 เตรียมตัวอย่างแบบ Ultratin sectioning	34
7	ลักษณะอาการบนพืชทดสอบจากการปลูกเชื้อเสาวรส SY2	37
8	อาการบนถั่วขาว (<i>Bruguiera cylindrica</i>) และถั่วพุ่ม (<i>Vigna sinensis</i>) ที่ได้รับการปลูกเชื้อจากเสาวรส SY2	38
9	เจลแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้การเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากเสาวรส SY2 เป็นต้นแบบ	40
10	เจลแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดเลือกโคลนของยีนจากเสาวรส SY2 ในพลาสมิดสายผสม	41
11	โครงสร้างยีนของไวรัสจากเสาวรส SY2	42

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนบริเวณ C-terminal ของยีน NIB ของเสาวรส ใบต่างจุดเหลือง SY2	44
13	ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนบริเวณยีน Coat protein	45
14	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 3'UTR	46
15	ลำดับกรดอะมิโนของ Coat protein ของเชื้อ <i>Potyvirus</i> 22 ชนิด ที่มีรายงานว่าพบ ในเสาวรสและพืชอาศัยอื่นเปรียบเทียบกับไวรัสเสาวรส SY2 วิเคราะห์แบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW	50
16	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' UTR ของเชื้อ <i>Potyvirus</i> 12 ชนิด ที่มีรายงานว่าเข้า ทำลายในเสาวรสและพืชอาศัยอื่นเปรียบเทียบกับเสาวรส SY2 นำมาวิเคราะห์ แบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW	55
17	แผนภาพแบบต้นไม้ (Neighbor joining phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ ของเสาวรส SY2 กับไวรัสในเสาวรส และพืชอาศัยอื่นโดยวิเคราะห์จากลำดับ กรดอะมิโนของ Coat protein ของไวรัสด้วยโปรแกรม MEGA 4.0	59
18	แผนภาพแบบต้นไม้ (Neighbor joining phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ ของเสาวรส SY2 กับไวรัสในเสาวรส และพืชอาศัยอื่นโดยวิเคราะห์จากลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' UTR ของเชื้อ <i>Potyvirus</i> 12 ชนิด ที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0	60

การแยกเชื้อ จำแนกชนิด และลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของ
ไวรัสรูปท่อนยาวคดที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างจุดเหลืองของเสาวรสพันธุ์สีม่วง

**Isolation, Identification and Partial Nucleotide Sequence of a Flexuous Rod
Virus Causing Yellow Spot Mosaic of Purple Passionfruit**

คำนำ

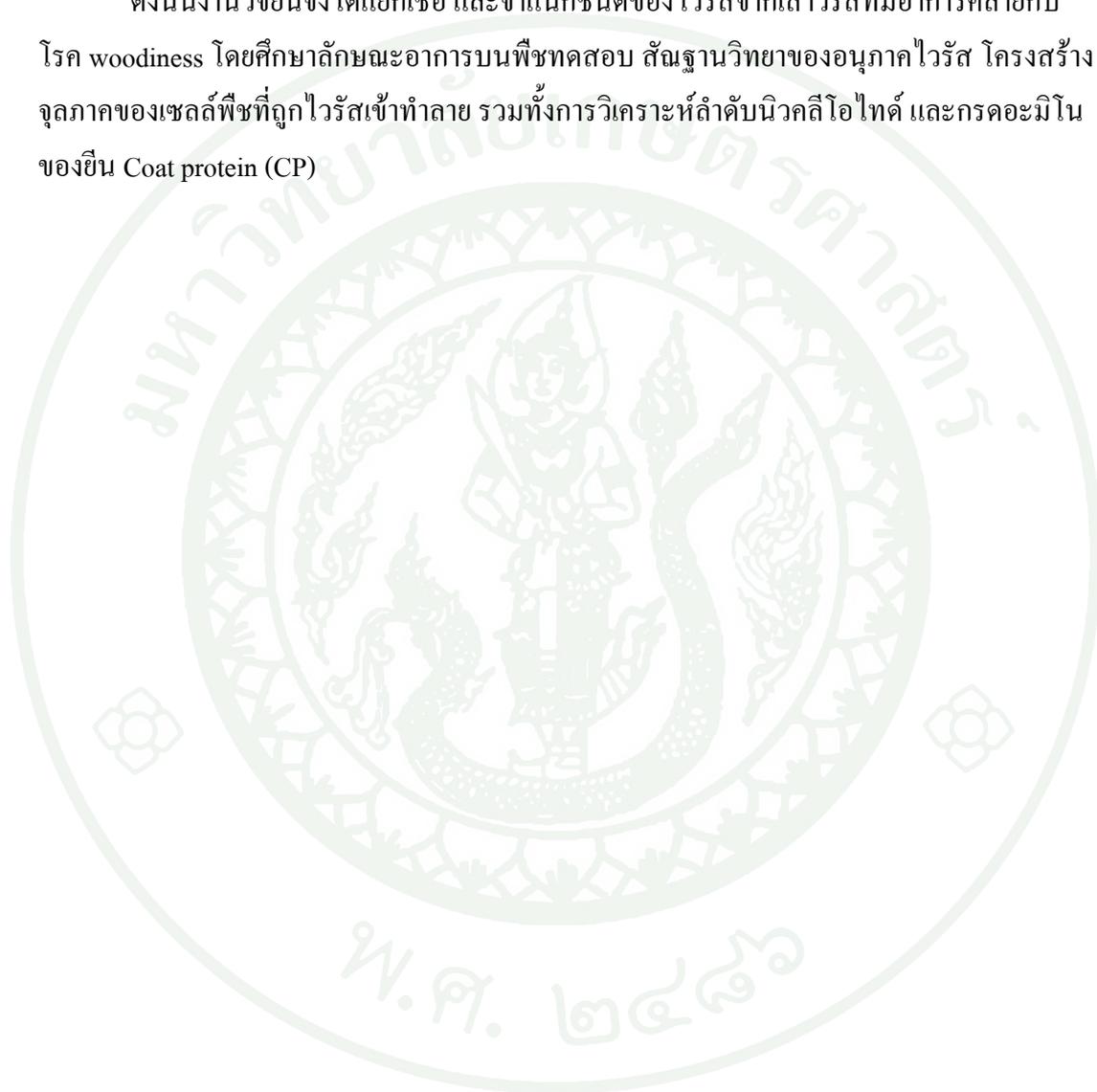
โรคของเสาวรสที่เกิดจากไวรัสพบแพร่ระบาดในหลายพื้นที่ที่มีการปลูกเสาวรส มีรายงานพบโรคนี้ครั้งแรกในปี 1890 ทางเหนือของประเทศออสเตรเลียและต่อมาพบในประเทศ บราซิล ในจีเรีย อาฟริกา ไต้หวัน อินเดีย ญี่ปุ่น อิตาลี เกนยา มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ ในประเทศบราซิลซึ่งเป็นแหล่งปลูกเสาวรสที่สำคัญมีรายงานว่าโรค woodiness ทำให้ผลผลิตลดลง และไม่มีคุณภาพ (Nascimento *et al.*, 2006) โรค woodiness ทำให้ผลเสาวรสมีรูปร่างผิดปกติ เปลือกบาง และแคะแกระ็น นอกจากนี้พบอาการจุดวงแหวนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-8 มิลลิเมตร ที่บริเวณเปลือกแต่ไม่พบที่ใบและอาการใบด่างเหลืองแบบ mottle หรือ mosaic เส้นใบใส อาจมีจุดเหลืองขนาด 2-3 มิลลิเมตรทั้งบนใบยอด และใบล่าง โดยมากจะพบอาการใบร่วงช่วงฤดูร้อน ส่วนฤดูหนาวอาการจะชัดเจนรุนแรงขึ้น (Manicom, 2003)

เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายเสาวรสแล้วทำให้เกิดโรค woodiness ได้แก่ เชื้อ *Passionfruit woodiness virus* (PWV) อนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคด มีขนาด 12 x 750 นาโนเมตร Teakle และคณะ (1963) รายงานว่าเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV) เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดอาการใบด่าง mottle และใบบิดเบี้ยว Taylor และ Kimble (1964) พบอาการเส้นใบใสบนเสาวรส Manicom (2003) พบว่ามีเชื้อ *Potyvirus* บางชนิดเข้าทำลายเสาวรสได้แก่ *Passionfruit mottle virus* (PaMV), *Sri Lankan mottle virus* (SLPMoV), *Passionfruit ringspot virus* (PFRSV), *South African passiflora virus* (SAPV), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) และ *East Asian Passiflora virus* (EAPV) (Iwai *et al.*, 2006)

เสาวรสเป็นผลไม้ที่มีความต้องการสูงกว่าผลผลิตที่สามารถผลิตได้เนื่องจากปัญหาการเกิดโรคไวรัสระบาดในต้นแม่พันธุ์ และพบว่าต้นแม่พันธุ์ที่ขยายพันธุ์ในขณะนี้แสดงอาการของโรคไวรัสเป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของโรคทั่วไปในแปลงปลูกของเกษตรกร ซึ่งเกิดจากการตัดแต่ง

กึ่งการเสียบกึ่ง และการระบาคของแมลงพาหะเช่น เพลี้ยอ่อนพบระบาคทุกฤดู แต่จะพบมากในช่วงฤดูแล้ง (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2530) นอกจากนี้ยังพบอาการเป็นโรคอื่นๆที่เกิดจากการเข้าทำลายของไวรัส (ตารางที่ 2)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้แยกเชื้อ และจำแนกชนิดของไวรัสจากเสาวรสที่มีอาการคล้ายกับโรค woodiness โดยศึกษาลักษณะอาการบนพืชทดสอบ สันฐานวิทยาของอนุภาคไวรัส โครงสร้างจุลภาคของเซลล์พืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของโปรตีน Coat protein (CP)



วัตถุประสงค์

1. แยกเชื้อ และศึกษาสมบัติบางประการของไวรัสรูปท่อนยาวคดจากเสาวรสที่เป็นโรค woodiness
2. จำแนกชนิด และศึกษาสายสัมพันธ์ของไวรัสที่ศึกษากับเชื้อไวรัสชนิดอื่นด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโน



การตรวจเอกสาร

1. เสาวรส (Passionfruit)

เสาวรส หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า กระทกรกฝรั่งเป็นไม้ผลที่อยู่ในตระกูล *Passifloraceae* มีถิ่นกำเนิดในเขตร้อน แถบพื้นที่สูงในอเมริกาใต้ เป็นไม้ผลประเภทเถาเลื้อยมีอายุหลายปี ลักษณะดอกเป็นดอกเดี่ยวสมบูรณ์เพศ ผลเสาวรสเป็นผลเดี่ยวสามารถเก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุ 50-70 วันหลังติดผล เสาวรสแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ เสาวรสชนิดผลสีม่วง (*Passiflora edulis* Forma *edulis* Sims.) และชนิดผลสีเหลือง (*P. edulis* Forma *flavicarpa* Deneger) (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2530)

ประเทศไทยได้นำเสาวรสเข้ามาปลูกครั้งแรกในปี พ.ศ. 2498 โดยเป็นพันธุ์สีม่วง แหล่งปลูกที่สำคัญ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย น่าน และเพชรบูรณ์ เสาวรสพันธุ์รับประทานสดเป็นที่นิยมปลูกมากเนื่องจากมีรสชาติดีและเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค เสาวรสรับประทานสดที่มีมูลนิธิโครงการหลวงคัดเลือกและส่งเสริมให้เกษตรกรปลูกเป็นการค้ามี 2 พันธุ์ คือ เสาวรสรับประทานสดสีม่วงเบอร์ 1 และเบอร์ 2 ปัจจุบันประเทศไทยสามารถผลิตเสาวรสพันธุ์สีม่วงรับประทานสดได้ประมาณ 500 ตันต่อปี ราคา กิโลกรัมละ 28-58 บาท ขึ้นอยู่กับขนาด และคุณภาพ ราคาที่เกษตรกรได้รับประมาณ 17-28 บาทต่อกิโลกรัม ซึ่งจะสามารถสร้างรายได้ไม่น้อยกว่า 17,500 บาทต่อไร่ต่อปี (กองพัฒนาเกษตรที่สูง, 2545)

2. ไวรัสรูปท่อนยาวคดที่ก่อให้เกิดโรคในเสาวรส

2.1 *Passionfruit woodiness virus* (PWV)

พบครั้งแรกในประเทศออสเตรเลีย (McKnight, 1953) อนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคดขนาด 12 x 750 นาโนเมตร สารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวจำแนกอยู่ในจีนัส (Genus) *Potyvirus* วงศ์ (Family) *Potyviridae* เข้าทำลายพืชได้ 46 สปีชีส์ใน 6 แฟมิลี (Edwardson and Christie, 1991) ถ่ายทอดได้ด้วยวิธีกลโดยการทาน้ำคั้นจากใบพืชที่เป็นโรค (mechanical inoculation) และการทาบกิ่ง (grafting) (Yeh and Chu, 1996) ตลอดจนการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii*) ในแบบ non-persistent (Chagas *et al.*, 1981) เสาวรสที่ถูกเชื้อ PWV เข้าทำลายจะแสดงอาการใบด่าง (mosaic) ใบเสียรูปทรง (distortion) เนื้อใบบุค (rugosity) การเจริญเติบโตของต้นลดลง ผลบิดเบี้ยว และมีเปลือกหนาแข็งจึงเรียกว่าโรค woodiness (Nascimento *et al.*, 2006)

ภายในเซลล์ใบเสาวรสที่เป็น โรคพบผลึกโปรตีนลักษณะเป็น pinweel inclusion bodies อยู่ในไซโตพลาสซึมซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของไวรัสในจีนัส *Potyvirus* (Yeh and Chu, 1996) เชื้อ PWV ที่พบระบาดในเสาวรสมีหลายสายพันธุ์ (strain) ในประเทศออสเตรเลียพบ 7 สายพันธุ์ คือ PWV-K, PWV-M (mild), PWV-S (severe), PWV-TB (tip blight), PWV-299, PWV-CL1 และ PWV-SD1 ประเทศญี่ปุ่นพบ 2 สายพันธุ์ คือ PWV-AO และ PWV-IB ประเทศไต้หวันพบ 1 สายพันธุ์ คือ PWV-Taiwan ประเทศบราซิลพบ 5 สายพันธุ์ คือ PWV-F101, PWV-F144, PWV-M2, PWV-MB และ PWV-SP (Nascimento *et al.*, 2006)

2.2 Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)

พบครั้งแรกที่ประเทศอิตาลีบนถั่วพุ่ม (*Vigna unguiculata*) (Lovisolo and Conti, 1966) ต่อมาพบในประเทศบราซิลโดย Nascimento และคณะ (2006) พบเสาวรสที่ถูกเชื้อ CABMV เข้าทำลายแสดงอาการใบเหลืองอย่างรุนแรง (severe leaf chlorosis) เชื้อ CABMV ถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* ในแบบ non-persistent และด้วยวิธีกล (mechanical inoculation) ในประเทศโมร็อกโก และแอฟริกาใต้ พบว่าเชื้อ CABMV ทำให้เสาวรสเกิดอาการ woodiness เช่นเดียวกับที่เกิดจากเชื้อ PWV ใบด่าง ผลแข็งแกระ เสียรูปทรง และพบว่าเมื่อเชื้อ CABMV และ PWV เข้าทำลายร่วมกันทำให้เกิดอาการรุนแรงมากขึ้น (Trevisan and Mendes, 2006) และผลการศึกษาลำดับกรด อะมิโนของยีนห่อหุ้มอนุภาคของ CABMV และ PWV พบว่ามีความคล้ายคลึงกัน 85 เปอร์เซ็นต์ (Santana *et al.*, 1999) เชื้อ CABMV ที่พบแล้วมี 6 ไอโซเลทได้แก่ CABMV-Br (Brazil) พบในถั่วลิสงแต่ไม่พบเข้าทำลายในเสาวรส CABMV-SAP (South Africa) พบในเสาวรส CABMV-Z CABMV-MON (Zimbabwe) CABMV-IB (Ivory coast) และ CABMV-Mor (Morocco) รวมทั้งพบในยาสูบ (*N. clevelandii*) (Nascimento *et al.*, 2006)

2.3 East Asian Passiflora Virus (EAPV)

พบในประเทศญี่ปุ่น และไต้หวัน (Iwai *et al.*, 2006) ได้แก่ ไอโซเลท PWV-AO (Amami-O-shima Isolate) PWV-IB (Ibuski-kagoshima isolate) และ PWV-Taiwan ก่อให้เกิดอาการ woodiness ในเสาวรสปันธ์ Ruby star (RS) และ Summer queen (SQ) ซึ่งเป็นลูกผสมระหว่างพันธุ์สีม่วงกับพันธุ์สีทอง (*Purple passion fruit P. edulis x P. edulis f. flavicarpa*) เมื่อผลสุกแก่จะมีผิวสีชมพูและม่วงแดงตามลำดับ อาการบนเสาวรสที่เป็นโรคได้แก่ ใบไหม้ เส้นใบบุด และใบย่น อาการเนื่องจากไวรัส EAPV มีความแตกต่างจากอาการที่เกิดจากเชื้อ PWV ทั้งสายพันธุ์จาก

ประเทศออสเตรเลีย และบราซิล ส่วนเชื้อ PWV-IB ทำให้เสาวรพันธุ์สีม่วงเกิดการแผลจุด และอาการ woodiness บนผล (Iwai *et al.*, 1997) เชื้อ EAPV-AO และ EAPV-IB เข้าทำลายพืช ในจีนัส *Passiflora* ได้หลายสปีชีส์ยกเว้น *P. suberosa* นอกจากนี้ยังพบว่า EAPV-IB ไม่เข้าทำลาย *C. amaranticolor* และ *C. quinoa* พืชทดสอบสำหรับ EAPV-AO และ -IB คือ ถั่วแขก (Suginashi Edogawa, SE) ซึ่งจะเกิดอาการแผลจุดเฉพาะแห่งภายใน 4-7 วัน หลังจากปลูกเชื้อ ส่วนพันธุ์ Rico23 มีอาการเส้นใบไหม้ และใบปลูดหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 20 วัน (Iwai *et al.*, 2006)

ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ EAPV-IB และ-AO มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 83 เปอร์เซ็นต์ (Iwai *et al.*, 1997) ในขณะที่เชื้อ EAPV-AO คล้ายกับ EAPV-Taiwan ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ EAPV ทั้ง 3 ไอโซเลทคล้ายคลึงกับ PWV และ CABMV ในระดับต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์โดยใกล้ชิดกับเชื้อ *Bean common mosaic virus* (BCMV) มากกว่าเชื้ออื่นจึงแยกออกเป็นกลุ่มต่างหากจาก PWV และ CABMV (Van Regenmortel and Dubs, 1993)

2.4 *Srilankan passionfruit mottle virus* (SLPMoV)

Dassanayake และ Hicks (1992) พบการเข้าทำลายของเชื้อ SLPMoV ในเสาวรสีทอง (*P. edulis f. flavicarpa*) ในประเทศศรีลังกาโดยพืชแสดงอาการใบด่าง (mottle) ใบย่น และบิดเบี้ยว นอกจากนี้พบอาการใบมีจุดเหลือง และผลมีจุดสีเขียว (Manicom, 2003) เชื้อเข้าทำลายพืชได้ 23 สปีชีส์ใน 5 แฟมิลี *P. foetida* เป็นพืชอาศัยเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสเพื่อเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ และพบอาการแผลจุดเฉพาะแห่งบน *C. amaranticolor* อนุภาคของไวรัสมีรูปร่างเป็นท่อนยาวคดขนาด 841 นาโนเมตร มีขนาด ds-RNA 7.0×10^6 คาลตัน จากการศึกษายภายในเซลล์เสาวรสีที่เป็นโรคพบผลึกโปรตีนแบบ pinwheel และ tubular ถ่ายทอดโรคได้โดยอาศัยเพลี้ยอ่อน *Myzus persicae*, *Aphis spiraecola*, *A. gossypii* และ *A. cruccivora* เป็นพาหะ เชื้อ SLPMoV มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับ PWV, *Passionfruit ringspot virus*, *Potato virus Y*, *Watermelon mosaic virus 2*

2.5 *Passionfruit chlorosis virus* (PFCV)

Baker และ Jones (2006) พบอาการใบด่างเหลืองอย่างรุนแรงบนเสาวรสี (*P. incense*) ในมลรัฐฟลอริดา ประเทศสหรัฐอเมริกา เมื่อทำการศึกษาโครงสร้างจุลภาคภายในเซลล์พืชที่เป็นโรคพบผลึกโปรตีนแบบ cylindrical inclusion อยู่ภายในไซโทพลาสซึมซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นเชื้อใน

จีโนม *Potyvirus* จากการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP พบว่า *Passionfruit chlorosis virus* คล้ายกับเชื้อในจีโนม *Potyvirus* 3 ชนิด คือ *Bean common mosaic necrotic virus serotype A* (BCMNV), *Bean common mosaic virus* (BCMV) และ *Soybean mosaic virus* (SMV) ที่ระดับความคล้ายคลึงกัน 73, 87 และ 69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณยีน NIB มีความคล้ายกับ SMV ที่ระดับ 78 เปอร์เซ็นต์ เชื้อนี้ไม่มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา กับ BCMV, BCMNV, PCV, PWV และ *Passionfruit mottle virus* (PaMV) แต่ผลการทดลองจาก SDS-immunodiffusion test พบว่าทำปฏิกิริยาต่อซีรัมของ *Peanut stripe virus* ซึ่งเป็น serotype B ในกลุ่มของ BCMV ผลการศึกษานิคของพืชอาศัยพบอาการใบด่างชนิดบน *C. quinoa* แต่ไม่เข้าทำลายพืชในตระกูล *Leguminosae* และยาสูบ *N. benthamiana* จากผลการศึกษานิคของพืชทดสอบปฏิกิริยาซีรัมวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์จึงให้ชื่อเชื้อชนิดนี้ว่า *Passionfruit chlorosis virus* (Baker and Jone, 2006)

2.6 *Passionfruit crinkle virus* (PCV)

Chang และคณะ (1996) พบอาการใบย่นในเสาวรสาสายพันธุ์ Tainung เบอร์ 1 ในประเทศไต้หวัน ซึ่งจากการศึกษาอาการบนพืชทดสอบพบว่ามีความแตกต่างจากเชื้อ PaMV และ PWV เชื้อ PCV จัดอยู่ในจีโนม *Potyvirus* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การถ่ายทอดโรคที่ต้องอาศัยเพลี้ยอ่อน และผลึกโปรตีนแบบ cylindrical inclusion ที่พบในเซลล์พืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย เชื้อ PCV เข้าทำลายพืชในตระกูล *Passifloraceae*, *Chenopodiaceae*, *Leguminosae*, *Solanaceae* และ *Amaranthaceae* แต่ไม่พบการเข้าทำลายพืชในตระกูล *Cucurbitaceae* อาการที่พบบนพืชทดสอบได้แก่ ใบด่าง (mottle) และใบย่นบน *P. edulis*, *P. edulis* x *P. edulis* f. *flavicarpa*, *P. suberosa* และ *P. wormingii* บน *C. quinoa* พบอาการใบด่างแบบไม่รุนแรง และบน *C. amaranticolor* พบอาการจุดแผลเฉพาะแห่ง ในพืชตระกูลถั่ว *Phaseolus vulgaris* พันธุ์ Sutter Pink และพันธุ์ Dubbele witte พบอาการใบด่าง บน *Cassia accidentalis* และ *N. benthamiana* พบอาการใบด่าง เมื่อใช้กล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope ตรวจดูภายในเซลล์พบการสะสมของ bundle-shaped cylindrical inclusion ภายในบริเวณไซโทพลาสซึมคล้ายกับที่พบกับเชื้อ PaMV จากการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ พบโปรตีนห่อหุ้ม CP มีขนาด 35 กิโลดาลตัน และจากการสกัด cylindrical inclusions พบผลึกโปรตีนขนาด 79 กิโลดาลตัน ในขณะที่ CP ของเชื้อ PaMV และ PWV มีขนาด 37 และ 36 กิโลดาลตันตามลำดับ ส่วน cylindrical inclusions ของ PaMV และ PCV มีขนาด 79 และ 76 กิโลดาลตันตามลำดับ PCV ไม่มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับ PWV, PaMV และ *Peanut stripe potyvirus* (PStV) (Chang *et al.*, 1996)

2.7 *Passionfruit mottle virus (PaMV)*

Chang (1992) พบ PaMV ในเสาวรสสายพันธุ์ Tainung เบอร์ 1 จากประเทศไต้หวัน เสาวรสแสดงอาการใบด่าง (mottle) ไม่รุนแรงซึ่งแตกต่างจากอาการที่เกิดจาก PWV ที่เป็นแบบ mosaic อย่างรุนแรงบนใบและบนผล PaMV มีอนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคดขนาด 13 x 736 นาโนเมตร และพบผลึกโปรตีนเป็นแบบ bundle-shaped inclusions น้ำหนักโมเลกุล 79 กิโลดาลตัน อยู่ในไซโทพลาสซึมซึ่งนี้ไม่มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับ PWV, BCMV, *Blackeye cowpea mosaic virus* (BICMV), *Watermelon mosaic virus 2* (WMV) และ *Soybean mosaic virus* (SMV) การถ่ายทอดโรคอาศัยเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) เป็นพาหะ เมื่อเปรียบเทียบอาการบนพืชทดสอบระหว่างเชื้อ PaMV และ PWV พบว่ามีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 1)

2.8 *Passionfruit chlorotic spot virus (PCSV)*

Parella และ Castellano (2002) พบอาการจุดเหลือง (chlorotic spot) และใบด่าง (mottle) บนเสาวรส (*P. caerulea*) ในประเทศอิตาลี ถ่ายทอดโรคได้ด้วยวิธีกลโดยทาน้ำคั้นจากใบพืชที่เป็นโรค เชื้อไวรัสมีอนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคดขนาดประมาณ 750 นาโนเมตร มีพีชอาศัยอยู่ในพีชจำพวกไม้พุ่ม (herbaceous) และเสาวรส (*Passiflora*) ซึ่งนี้มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับ *Bean yellow mosaic virus* (ByMV)

ตารางที่ 1 อาการบนพืชทดสอบที่เกิดจากการปลูกเชื้อ *Passionfruit mottle virus* (PaMV) และ *Passionfruit woodiness virus* (PWV) ด้วยวิธีกล

พืชทดสอบ	ลักษณะอาการบนพืชทดสอบที่เกิดจากเชื้อ	
	PaMV	PWV
ตระกูล Passifloraceae		
<i>P. edulis</i>	m, TB	m
<i>P. edulis f. flavicarpa</i>	CS, M	M, TB
<i>P. edulis</i> x <i>P. edulis f. flavicarpa</i>	m, mF	M, R, wf
<i>P. suberosa</i>	m	m
<i>P. warmigii</i>	m	m
<i>P. coccinea</i>	SLI	SLI
<i>P. foetida</i>	m	yw
ตระกูล Chenopodiaceae		
<i>C. quinoa</i>	CL	CL
<i>C. amaranticolor</i>	CL	CL
ตระกูล Leguminosae		
<i>P. vulgaris</i> cv. <i>Sutter Pink</i>	NL, M	NL
<i>P. vulgaris</i> cv. <i>Dubbele Witte</i>	NL, M	NL
<i>P. vulgaris</i> cv. <i>Black Turtle</i>	NL	LI
<i>Vigna unguiculata</i> subsp. <i>Unguiculata</i>	-	CL, SLI
<i>V. angularis</i>	m	-
<i>Cassia occidentalis</i>	m	-
ตระกูล Solanaceae		
<i>N. benthamiana</i>	M	m

m = mottling, TB = tip blight, CS = chlorotic spotting, M = mosaic, mF = mottling fruit,

R = rugose, wf = woody fruit, SLI = symptomless infection, yw = yellow wilting,

CL = chlorotic lesion, NL = necrotic lesion, LI = Lethal infection, - = no infection

ที่มา : ดัดแปลงจาก Chang (1992)

2.9 *Passionfruit ringspot potyvirus* (PFSV)

พบครั้งแรกในเสาวรสพันธุ์สีม่วง (*P. edulis f. flavicarpa*) ในประเทศ Ivory Coast (De Wijs, 1974) ลักษณะอาการที่พบได้แก่ อาการใบด่าง (mottle) ใบเสียรูป และมีจุดเหลือง การถ่ายทอดโรคอาศัยเพลี้ยอ่อน (*Aphis gossypii*, *A. spiraecola*) แบบ non-persistent และถ่ายทอดได้จากการทาน้ำคั้นใบพืช อาการที่เกิดขึ้นบน *Phaseolus vulgaris* คือ แผลจุดไหม้สีน้ำตาล และเส้นใบไหม้ อนุภาคไวรัสเป็นรูปท่อนมีความยาว 810 นาโนเมตร กว้าง 15 นาโนเมตร โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเกาะกันเป็นแบบเฮลิคซ์ (helix) ไม่มีเยื่อหุ้ม เชื้อนี้ไม่มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับเชื้อ PWV (Kitajima *et al.*, 2003)

2.10 *Soybean mosaic virus* (SMV)

Benschler และคณะ (1996) พบการเข้าทำลายของ SMV ในเสาวรสม (*P. edulis*, *P. ligularis* และ *P. quadrangularis*) ในประเทศโคลัมเบีย ต้นที่เป็นโรคมมีอาการใบด่างอย่างรุนแรง และใบร่วงทั้งต้น นอกจากนี้ในเสาวรสพันธุ์สีม่วง (*P. edulis*) พบอาการผลด่าง จำแนกเชื้อได้ 2 ไอโซเลท คือ Col-22 และ GR ซึ่งแยกความแตกต่างกันจากลักษณะอาการบนพืชทดสอบ การถ่ายทอดโรคอาศัยเพลี้ยอ่อน (*Aphis gossypii*) เป็นพาหะ ไม่พบการถ่ายทอดโรคทางเมล็ด เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของ CP มีความเหมือนกับเชื้อ SMV 98 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้มีการใช้เทคนิค Dot-blot hybridization โดยใช้ DNA complementary บริเวณ 3' non coding region ของเชื้อ SMV เป็น probe ในการตรวจสอบโรคได้

2.11 *Telosma mosaic virus* (TeMV)

Ha และคณะ (2008) รายงานการจำแนกเชื้อ TeMV ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Potyvirus* เข้าทำลายพืช และวัชพืชในประเทศเวียดนาม พืชที่เป็นโรคแสดงอาการใบย่น ใบด่างแบบ mottle แบบ mosaic และแคระแกร็น เชื้อไวรัสมีสารพันธุกรรมเป็นอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวมีจีโนมทั้งหมด 9,689 นิวคลีโอไทด์ Coat protein มีกรดอะมิโนจำนวน 272 เรซิดิวซ์ มีลำดับกรดอะมิโน DAG ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพการถ่ายทอดเชื้อด้วยเพลี้ยอ่อน บริเวณ cleavage site ระหว่างยีน NIB และ CP พบลำดับกรดอะมิโนเป็น V-S-L-Q/S

ตารางที่ 2 อาการของเสาวรสที่เกิดจากการเข้าทำลายโดยเชื้อไวรัส

อาการ	ชนิดของไวรัสที่เข้าทำลาย
Mottle	PFRV, PFMV, MrMV
Mosaic	PFYMV, PFRV, MrMV-FL, SMV
Woodiness	PFRV, PFMV, PFVVCV
Distortion	PFRV, Purple granadilla mosaic virus, SMV
Rolling leaves	PFMV, PFYMV
Vein-clearing	Purple granadilla mosaic virus, PFVVCV
Stunting	PFRV, Purple granadilla mosaic virus, PFVVCV
Necrotic spotting	PFGSV, MrMV-FL

MrMV = *Maracuja mosaic virus* MrMV-FL = *Maracuja mosaic virus florida strain*

PFGSV = *Passionfruit green spot virus* PFMV = *Passionfruit mottle virus*

PFRV = *Passionfruit ringspot virus* PFVVCV = *Passionfruit vein clearing virus*

PFYMV = *Passionfruit yellow mosaic virus* SMV = *Soybean mosaic virus*

ที่มา: Naqui (2004)

3. การจำแนกชนิดไวรัสสาเหตุโรคนในเสาวรส

3.1 พืชอาศัย

De Wijs (1974) ศึกษาเชื้อ *Passionfruit ringspot virus* ที่เข้าทำลายเสาวรสสีม่วงในประเทศ Ivory Coast พบว่าพืชที่เหมาะสมในการจำแนกเชื้อได้แก่ เสาวรส (*P. foetida*) ซึ่งพบอาการเส้นใบเหลืองหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 4-7 วัน จากนั้นมีอาการใบด่าง mottle ส่วนบนผลไม่พบอาการเป็นโรค ใน *P. edulis* แสดงอาการเส้นใบเหลือง ใบด่างแบบ mottle เนื้อใบหยาบ และเหมาะสำหรับเป็นพืชอาศัยในการเก็บรักษาเชื้อ สำหรับพืชบางชนิดในตระกูล Passifloraceae (*Adenia lobata*) พบอาการใบด่างแพร่กระจายทั่วต้น เหมาะสำหรับการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ บน *C. amaranticolor* เกิดแผลจุดบนใบที่ปลูกเชื้อ ส่วน *C. quinoa* ไม่พบอาการเป็นโรค สำหรับ French

bean (*P. vulgaris*) พบอาการแผลจุดบนใบที่ปลูกเชื้อจากนั้นจะแสดงอาการเส้นใบใส (vein clearing) และเส้นใบไหม้

Shukla และคณะ (1988) ได้ศึกษาอาการของเชื้อ PWV-TB, PWV-S และPWV-M บนถั่ว *P. vulgaris* cv. Cheokee Wax พบว่าแสดงอาการแตกต่างกัน คือ PWV-TB ทำให้เกิดอาการแผลจุดไหม้บนใบที่ปลูกเชื้อ ส่วน PWV-S ทำให้เกิดอาการแผลจุด ใบด่างแบบ mottle และใบบิดเบี้ยว และ PWV-M ทำให้เกิดอาการแผลจุดทั่วทั้งต้น ดังนั้นการจำแนกเชื้อ PWV ทั้ง 3 ชนิดจึงใช้ถั่ว (*P. vulgaris* cv. Cheokee Wax)

Chang (1992) ศึกษาอาการของโรคบนพืชทดสอบระหว่างเชื้อ PaMV และ PWV โดยใช้ น้ำคั้นจากใบเสาวรสปันธ์ TN-1 ที่เป็นโรคพบอาการเป็นโรคคิงนี่ บน *N. benthamiana* พบอาการใบด่างแบบ mosaic จากเชื้อ PaMV และใบด่างแบบ mottle จากเชื้อ PWV บนถั่ว Azuki (*V. angularis* wild) และ *Cassia occidentalis* L. พบอาการใบด่างแบบ mottle จากเชื้อ PaMV เท่านั้น ส่วนเชื้อ PWV ไม่ก่อโรคบน blackeye cowpea นอกจากนี้พบอาการแผลจุดบนใบที่ปลูกเชื้อ PWV บน *P. vulgaris* cv. sutter และ dubbele witte พบอาการใบด่างแบบ mosaic ทั้งต้นจากเชื้อ PaMV และอาการแผลจุดเฉพาะแห่งบนใบที่ปลูกเชื้อจาก PWV บนพันธุ์ black turtle พบอาการแผลจุดไหม้จากเชื้อ PaMV และอาการใบด่างแบบ mosaic ทั่วต้น จากอาการเป็นโรคบนพืชทดสอบ ทั้งหมดสามารถจำแนกเชื้อ PaMV แยกออกจากเชื้อ PWV ได้

Chang และคณะ (1996) ศึกษาอาการเป็นโรคบนพืชทดสอบจากเสาวรสปันธ์ TN-1 ที่ปลูกเชื้อ PCV, PWV, PaMV และ PFSV พบอาการใบด่างเหลืองบน soybean และ blackeye cowpea จากเชื้อ PCV และไม่พบอาการเป็นโรคจากเชื้อ PFSV ส่วน *Glycine max* (L.) Merr แสดงอาการใบด่างแบบ mottle จากเชื้อ PCV แต่ไม่พบอาการเป็นโรคจากเชื้อ PWV และ PaMV

Benschler และคณะ (1996) ศึกษาอาการบนพืชอาศัยจากการปลูกเชื้อ SMV ด้วยน้ำคั้นจากเสาวรสที่แสดงอาการใบด่างแบบ mosaic อย่างรุนแรงทั่วทั้งต้นในประเทศโคลัมเบีย โดยศึกษา ไอโซเลท Col-22 และ Col-GR พบอาการใบไหม้บนถั่ว BT1 (*P. vulgaris* cv. Black turtle 1) และบนถั่ว BT2 (*P. vulgaris* cv. Black turtle 2) แสดงอาการใบด่างแบบ mosaic ทั่วทั้งต้นเหมือนกับเชื้อ SMV 76/6 ซึ่งเป็น positive control อาการบนพืชอาศัยจากการปลูกเชื้อ PWV-K พบว่าบนถั่ว BT1 ไม่เป็นโรค ส่วนบนถั่ว BT2 แสดงอาการเหมือนกับไอโซเลท Col-22 และ Col-GR ดังนั้นจึงสามารถจำแนกเชื้อทั้งสองไอโซเลทได้เป็นเชื้อ SMV และแยกจากเชื้อ PWV-K ด้วยถั่ว BT1

Iwai และคณะ (2006) แยกเชื้อ PWV-IB และ PWV-AO ในเสาวรสีม่วงที่แสดงอาการอาการใบด่าง mosaic ใบหงิก และเส้นใบจุด ใบย่น พบว่าบนคีนโนโปเดียมทั้ง *C. quinoa* และ *C. amaranticolor* เกิดแผลจุดจาก PWV-AO เท่านั้น ส่วน *N. benthamiana* *N. glutinosa* และ *N. tabacum* ไม่พบอาการเป็นโรค ดังนั้นสามารถใช้คีนโนโปเดียมจำแนกเชื้อ PWV-AO ได้และการแยกเชื้อ PWV-IB ใช้ *P. vulgaris* cv. Carnaval หรือ Romano ได้เนื่องจากแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่งบริเวณใบที่ปลูกเชื้อ ในขณะที่เชื้อ PWV-AO ไม่เกิดอาการของโรค

Nascimento และคณะ (2006) ศึกษาตัวอย่างเชื้อ *Potyvirus* 14 ไอโซเลท ที่เข้าทำลายในเสาวรสีเหลืองในประเทศบราซิลโดยใช้ *P. vulgaris* Preto153 ในการแยกเชื้อพบแผลจุดเฉพาะแห่งบน *C. quinoa* และ *C. amaranticolor* บนเสาวรสีเหลืองพบอาการใบด่าง mosaic และใบบิดเบี้ยว บน *N. benthamiana* และ *N. clevelandii* พบอาการใบด่าง สำหรับ *V. unguiculata* ‘Pitiuba’ และ ‘Clay’ พบอาการใบด่างแบบ mottle โดยไม่พบอาการดังกล่าวจากเชื้อ PWV-Brazil ดังนั้นเชื้อทั้ง 14 ไอโซเลทสามารถแยกออกจากเชื้อ PWV-Brazil โดยใช้ *V. unguiculata* ‘Pitiuba’ และ ‘Clay’

3.2 ลักษณะของอนุภาคไวรัส และโครงสร้างจุลภาคของเซลล์พืชที่เป็นโรค

Chang (1992) พบอนุภาคของเชื้อ PaMV ในเสาวรสีพันธุ์ TN-1 เป็นอนุภาครูปท่อนยาวคดเมื่อวัดขนาดจำนวน 104 อนุภาค ความยาวเฉลี่ย 736 นาโนเมตร และตรวจพบผลึกโปรตีนแบบ cylindrical inclusion bodies (CIP) ในบริเวณ epidermal cell ของเสาวรสีพันธุ์ TN-1 จากนั้นศึกษาขนาดของโปรตีน CP และ CIP ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีน CP มีขนาด 38 และ 37 กิโลดาลตันจากเชื้อ PaMV และ PWV ตามลำดับ สำหรับโปรตีน CIP พบว่ามีขนาด 79 และ 76 กิโลดาลตันจากเชื้อ PaMV และ PWV ตามลำดับ

Chang และคณะ (1996) พบอนุภาคไวรัสรูปท่อนยาวคดจากตัวอย่างเสาวรสีพันธุ์ TN-1 ที่มีเชื้อ PCV ความยาวเฉลี่ย 724 นาโนเมตร จาก 96 อนุภาค และพบผลึกโปรตีนแบบ bundle-shaped cylindrical inclusion บริเวณ epidermal cell การศึกษาขนาดของโปรตีน CP และ CIP ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบขนาดของ CP เท่ากับ 35 36 และ 37 กิโลดาลตัน และขนาดของ CIP เท่ากับ 79 76 และ 79 กิโลดาลตันจากเชื้อ PCV, PWV และ PaMV ตามลำดับ

Iwai และคณะ (1996) ตรวจพบอนุภาคไวรัส PWV-AO ในเสาวรส (*P. delis* Sims. X *P. edulis* Sim. f. *flavicarpa* Deg.) ในประเทศโคลัมเบียเป็นรูปท่อนยาวคความยาวเฉลี่ย 787 นาโนเมตรวัดจาก 150 อนุภาค และพบผลึกโปรตีนแบบ pinwheel และ scroll ปริมาณมากบริเวณ cytoplasm ของเซลล์ epidermal และ mesophyll

3.3 การตรวจสอบด้วยแอนติซีรัม

Chang (1992) ตรวจสอบเชื้อ PaMV จากตัวอย่างเสาวรสปันธ์ TN-1 เป็นโรคใบด่างแบบ mottle ด้วยแอนติซีรัมต่อเชื้อ PWV, BYMV, BICMV, CMV, *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Papaya ringspot virus type W* (PRV-W), *Peanut stripe virus* (PStV), *Potato virus Y* (PVY), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Watermelon mosaic virus 2* (WMV2) และ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ทางซีรัมทั้งหมดยกเว้นซีรัมต่อเชื้อ PaMV

Chang และคณะ (1996) ตรวจสอบเชื้อ PRPV, PWV และ PaMV จากตัวอย่างเสาวรสปันธ์ TN-1 ที่เป็นโรคด้วยแอนติซีรัมต่อเชื้อ PCV พบว่าเชื้อ PCV มีความสัมพันธ์ทางซีรัมเฉพาะเชื้อ PRPV

Benschler และคณะ (1996) ตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายเสาวรสในประเทศโคลัมเบีย โดยใช้เทคนิค Dot-blot hybridization โดยโพรบ (Probe) ที่นำมาใช้ตรวจสอบได้จากส่วนไม่แปลรหัสด้าน 3' ที่ติดฉลากด้วย α ³²P-dCTP พบตัวอย่างน้ำคั้นจากไอโซเลท Col-22 ทำปฏิกิริยากับเชื้อ SMV 76/6 ซึ่งเป็น positive control ทั้งตัวอย่างที่เจือจาง 1:5 และ 1:20 เท่า แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อ PWV-K

Nascimento และคณะ (2006) ตรวจสอบเชื้อ 14 ไอโซเลทที่เข้าทำลายในเสาวรสสี่เหลืองในประเทศบราซิลด้วยเทคนิค Indirect ELISA พบว่าน้ำคั้นจากตัวอย่างทั้ง 14 ไอโซเลททำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมต่อเชื้อ PWV (DFrs : เป็นแอนติซีรัมที่ใช้ในการตรวจเชื้อ PWV-Brazil) และแอนติซีรัมต่อเชื้อ CABMV (MGr) การจำแนกเชื้อ 14 ไอโซเลทไม่สามารถจำแนกได้เนื่องจากเชื้อ CABMV และ PWV มีความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยา

3.4 การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของเชื้อไวรัสในเสาวรศ

Benschler และคณะ (1996) ศึกษาลำดับกรดอะมิโนบริเวณขี้น CP และลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณส่วนที่ไม่แปลรหัสด้าน 3' จากเสาวรศที่เป็นโรคโดยออกแบบไพรเมอร์จากลำดับกรดอะมิโน 2 ส่วนคือ WCIEHQMKAAA ซึ่งเป็นส่วนอนุรักษ์ (conserved region) บริเวณขี้น CP ของเชื้อในจีนัส *Potyvirus* เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CP พบว่าไอโซเลท Col-22 และ Col-GR เหมือนกันที่ระดับ 98 เปอร์เซ็นต์กับเชื้อ SMV 76/6 และ SMV-N สำหรับบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนที่ไม่แปลรหัส 3' เหมือนกันที่ระดับ 90 และ 89 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ PWV-K พบว่าส่วนของ CP และส่วนที่ไม่แปลรหัส 3' มีความเหมือนกันที่ระดับ 83 และ 55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Iwai และคณะ (2006) จำแนกเชื้อ PWV-IB และ PWV-AO โดยสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากตัวอย่าง *P. vulgaris* cv. RICO23 แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค RT-PCR ได้ PCR product ขนาด 1,240 นิวคลีโอไทด์ มีส่วนของ CP 879 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นโปรตีนได้ 293 เรซิดิวซ์ (PWV-IB) มีน้ำหนักโมเลกุล 32,734 คาลตัน ส่วนเชื้อ PWV-AO แปลรหัสได้ 290 เรซิดิวซ์ มีน้ำหนักโมเลกุล 32,684 คาลตัน บริเวณ 3'UTR มีความยาว 254 (PWV-IB) และ 253 (PWV-AO) นิวคลีโอไทด์ ส่วน cleavage site ของโปรตีน CP มีลำดับกรดอะมิโน V-S-L-Q/S (PWV-IB) และ V-S-L-Q/T (PWV-AO) นอกจากนี้พบลำดับ DAG ห่างจาก cleavage site ของกรดอะมิโน 16-18 เรซิดิวซ์ ทั้งสองไอโซเลท การศึกษาลำดับกรดอะมิโนบริเวณขี้น CP สามารถจำแนกเชื้อ EAPV แยกจากเชื้อ PWV-Brazil และ PWV-Australia โดยเปรียบเทียบลำดับของ CP พบว่าเชื้อ PWV-AO และ PWV-IB มีความเหมือนกับ PWV-Brazil และ PWV-Australia เพียง 67-72 เปอร์เซ็นต์

Nascimento และคณะ (2006) ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจำแนกเชื้อ CABMV 14 ไอโซเลทที่เข้าทำลายเสาวรศสีเหลืองจากประเทศบราซิล โดยสกัดอาร์เอ็นเอจาก *N. benthamiana* หรือ *V. unguiculata* แล้วเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค RT-PCR ได้ขนาดของดีเอ็นเอประมาณ 1.3 กิโลเบส ซึ่งประกอบด้วยส่วนของขี้น CP และ 3'UTR โดยขี้น CP แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนประกอบด้วย 275 เรซิดิวซ์ นอกจากนี้พบลำดับกรดอะมิโน D/N-A-G ด้วย ส่วนของ 3'UTR มีขนาด 226-230 นิวคลีโอไทด์ จากการเปรียบเทียบลำดับ CP ของเชื้อ 14 ไอโซเลท พบว่าเหมือนกับเชื้อ CABMV ที่ระดับ 84-97 เปอร์เซ็นต์ แต่เหมือนกับเชื้อ PWV-Brazil เพียง 54-70 เปอร์เซ็นต์ และเหมือนกับเชื้อ PWV-Australia 71 เปอร์เซ็นต์

Abdullah และคณะ (2009) ศึกษาการเข้าทำลายของเชื้อ *Malasian Passiflora virus* (MPV) ในเสาวรสีในประเทศมาเลเซีย โดยศึกษาด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ได้ตีเอ็นเอขนาด 1,497 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วยยีนบางส่วนของ Nib ยีน CP และส่วนของ 3'UTR โปริติน CP ประกอบด้วยกรดอะมิโน 258 เรซิดิวซ์ และพบ cleavage site เป็น Q/S มีลำดับ DAG 2 ตำแหน่งซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดโรคโดยเพลี้ยอ่อน สำหรับ 3'UTR มีขนาด 255 นิวคลีโอไทด์ และพบส่วนอนุรักษ์ AG-GTGG-CCACC 2 ตำแหน่ง จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน CP พบว่าเชื้อ MPV เหมือนกับเชื้อ PWV และ EAPV ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ แต่เหมือนกับ SMV และ BCMV เพียง 73 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนบริเวณ 3'UTR พบว่าเหมือนกับ PWV และ EAPV ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ แต่เหมือนกับ SMV และ BCMV เพียง 69 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4. สายพันธุ์ หรือไอโซเลทของไวรัสสาเหตุโรคจุดดนิสของเสาวรสี (www.ncbi.nlm.nih.gov/)

4.1 PWV

ประเทศไทย

PWV Pangda 12 (AM409188), PWV Pangda 15 (AM409188)

ประเทศออสเตรเลีย

PWV-K (A1906186), PWV-M (P32574), PWV-S (P32575), PWV-TB (P32576), PWV-299 (AJ430527), PWV-CL1 (U67149) และ PWV-SD1 (U67150)

ประเทศญี่ปุ่น

PWV-IB (AB185021), PWV-AO (D85849)

ประเทศไต้หวัน

PWV-Taiwan (AF208662)

ประเทศบราซิล

PWV-F101 (AY433951), PWV-F144 (AY505342), PWV-M2 (AY433952), PWV-M3 (AY434454) และ PWV-SP (AY433950)

PWV isolate Gld-1 (DQ898215), PWV isolate Car-1 (DQ898216), PWV isolate KU-1 (DQ898217)

PWV isolate CoP-1 (DQ898218)

4.2 CABMV

ประเทศอาฟริกาใต้	CABMV-SAP (D10053)
ประเทศซิมบับเว	CABMV-Z (NC004013), CABMV-Mon (Y17822)
ประเทศ Ivory Coast	CABMV-IB (AJ132414)
ประเทศโมร็อกโก	CABMV-Mor (Y18634)
ประเทศบราซิล	CABMV-Br (AF241233)

4.3 EAPV

ประเทศญี่ปุ่น	EAPV-AO (PWV-AO), EAPV-IB (PWV-IB)
---------------	------------------------------------

4.4 *Passiflora foetida virus Y*

Passiflora virus Y (AY461661), *Passiflora foetida virus Y* (DQ112219)

4.5 Malasian *Passiflora virus* (MPV)

ประเทศมาเลเซีย	MPV(EU035271)
----------------	---------------

5. เกณฑ์ที่ใช้จำแนกชนิดของไวรัสในจีโนม *Potyvirus* จากข้อมูลจีโนม

Adam และคณะ (2005) ได้ศึกษาพบว่าการจำแนกชนิดของไวรัสในจีโนม *Potyvirus* โดยใช้ข้อมูลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของยีน NIB, CP และ 3'UTR ใช้เกณฑ์ซึ่งจัดว่าเป็นสปีชีส์เดียวกันที่ประมาณ 76.6, 78.0 และ 71.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน CP บริเวณตำแหน่งที่ 18-35 จะมีความเฉพาะตัวของไวรัส นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วย Phylogenetic tree สามารถชี้ให้เห็นได้ว่าไวรัสมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน แต่การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนที่บริเวณปลาย N-terminal ของ โปรตีน CP จำนวน 70 เรซิดิวซ์อาจมีความแตกต่างกัน จึงอาจจำแนกไปเชื่อต่างสปีชีส์ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างเสาวรสที่ใช้ในการศึกษาและการแยกเชื้อไวรัส

ตัวอย่างพืชที่นำมาศึกษาได้แก่ เสาวรสปันธ์ (*P. edulis*) สีม่วงเบอร์ 2 จากสถานีวิจัยปางคะ มูลนิธิโครงการหลวง อ.สะเมิง จ.เชียงใหม่ เก็บตัวอย่างเมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2551 และรวบรวม ไว้ที่ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลโดยใช้น้ำคั้นจากใบเสาวรสหาบ *C. quinoa* และ *C. amaranticolor* แล้วนำแผลจุดเฉพาะแห่งที่เกิดขึ้นไปปลูกเชื้อบนเสาวรสปกติเพื่อใช้เป็นแหล่งของ ไวรัสในการศึกษาขั้นต่อไปตลอดการทดลอง

การตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิค direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) โดยใช้แอนติบอดีต่อเชื้อ PWV (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน)

2. การปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกล และพืชทดสอบไวรัส

การปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกล (Mechanical inoculation) ดัดแปลงจากวิธีของ Trevisan และ Mendes (2006) ทำโดยใช้ใบพืชที่แสดงอาการของโรค น้ำหนัก 1 กรัมบดกับบัฟเฟอร์ปริมาตร 2 มล. (0.1 M phosphate buffer pH 7.0 ที่เติม 0.1% sodium sulfite ก่อนใช้) ที่แช่เย็นจัดและบดใน โกร่งที่แช่เย็น ผสมผงคาร์บอนดำในน้ำคั้นแล้วทาลงบนใบพืชทดสอบ เก็บต้นพืชในโรงเรือนตาข่าย

พืชทดสอบที่ใช้ศึกษาลักษณะอาการมี 7 ชนิดได้แก่

ยาสูบ (*N. benthamiana*, *N. tabacum*, *N. glutinosa*)

เสาวรสสีม่วง (*P. edulis*) เบอร์ 2

ถั่วพุ่ม (*V. sinensis*)

ถั่วฝักยาว (*V. sesquipedalis*)

ถั่วขาว (*B. cylindrica*)

ถั่วแขกญี่ปุ่น (*P. vulgaris*) พันธุ์ Yamashiro

ถั่วแขกออสเตรเลีย (*P. vulgaris*) พันธุ์ Bountiful

โทงเทง (*Physalis angulata*)

3. เทคนิค Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA)

บดตัวอย่างไบโสะวารสใน carbonate coating buffer (0.015 M Na_2CO_3 , 0.035 M NaHCO_3 , pH 9.6) ที่แช่เย็น ในอัตราไบพีช 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ปริมาตร 2 มล. คุคน้ำคั้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ ELISA plate บ่มไว้ในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง หรือแช่ที่ 4 °C ข้ามคืน ครบเวลาแล้วล้าง plate ด้วย 1 x PBST (140 mM Na_2CO_3 , 2 mM KH_2HPO_4 , 8 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2 mM KCl, 0.05% Tween 20) 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที บดไบโสะวารสปกติที่ได้จากการเพาะเมล็ดเป็นต้นกล้าใน conjugate buffer (PBST, 2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% ovalbumin) อัตรา 1 กรัมของไบพีชต่อบัฟเฟอร์ปริมาตร 2 มล. กรองเอาเฉพาะน้ำคั้นมาผสมกับแอนติซีรัมที่เจือจางไว้แล้วในอัตราส่วน 1:1,000 (ใน conjugate buffer) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำคั้นพีชเป็น 1 ต่อ 100 ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20-40 นาที จากนั้นดูแยกเอาเฉพาะส่วนใสของแอนติซีรัมใส่ลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้น ที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดัง plate ตามวิธีเดิม เตรียม anti-rabbit IgG alkaline phosphatase ที่เจือจางในอัตรา 1:30,000 โดยปริมาตรใน conjugate buffer นำไปใส่ในหลุมตัวอย่างที่ล้างแล้วหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดัง plate ตามวิธีเดิมเตรียมสารละลาย 5% *p*-nitrophenyl phosphate ใน substrate buffer (diethanolamine 97%, pH 9.8) ใส่ในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 60 นาที หยุดปฏิกิริยา ด้วยสารละลาย 3M NaOH ปริมาตร 50 ไมโครลิตร อ่านค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

4. เทคนิค Dip preparation เพื่อตรวจอนุภาคไวรัส

เตรียมกริดทองแดงที่เคลือบฟอรัมวาร์และคาร์บอน ตรวจอนุภาคไวรัสในไบพีชโดยหยดฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 M Phosphate buffer, pH 7.0) ลงบนแผ่นพาราฟิล์มตัดไบพีชเป็นชิ้นสามเหลี่ยมปลายแหลมขนาดเล็กแล้วจุ่มปลายแหลมลงขึ้นสลับกันในหยดบัฟเฟอร์ 4-5 ครั้ง เปลี่ยนชิ้นไบพีช และทำวิธีเดียวกันนี้ซ้ำ 2 ครั้ง กว่ากริดลงบนบัฟเฟอร์นาน 1-2 นาที แล้วยกกริดขึ้นซับบัฟเฟอร์ออกให้แห้ง ย้อมสีด้วย 5% uranyl acetate (ในน้ำ) นาน 5 นาที ซับให้แห้งนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) บันทึกภาพไวรัส 50-100 อนุภาคเพื่อวัดขนาดอนุภาค

5. เทคนิค Ultrathin section เพื่อตรวจดูโครงสร้างจุลภาคของเซลล์พืช

เตรียม Ultrathin section ของใบเสาวรสที่เป็นโรคโดยตัดชิ้นใบขนาด 0.5 ตร.ซม. แช่ในสารละลาย 5% glutaraldehyde (ใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0) นาน 2 ชั่วโมง ตามด้วย 1% osmium tetroxide ในน้ำ บ่มในน้ำแข็งนาน 2 ชั่วโมง ย้ายชิ้นพืชมาแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 30, 50, 70, 90, 95 และ 100% ความเข้มข้นละ 10 นาที และแช่ในสารผสมของ Absolute ethanol และ QY-1 (1:1) นาน 15 นาที ย้ายลงใน QY-1 (100%) นาน 15 นาที ก่อนแช่ในสารผสม QY-1 และ Spurr's resin (1:1) นาน 30 นาที ตามด้วยใน Spurr's resin (100%) นาน 1 ชั่วโมง อบชิ้นพืชใน Spurr's resin นาน 3 ชม. และตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Ultramicrotome ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Roland, 1977)

6. การโคลนยีนบางส่วนของไวรัส

6.1 วิธีสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบเสาวรส

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบเสาวรสที่เป็นโรคตัดแปลงจากวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยชั่งใบพืชน้ำหนัก 0.1 กรัม บดให้ละเอียดใน 2% CTAB buffer (2% CTAB, 100mM Tris-HCl pH8.0, 1.4 M NaCl, 20mM EDTA, 0.2% Na₂SO₃, 1% PVP40) ปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนักใบพืช บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายส่วนบนใส่หลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลาย chloroform : isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ย้ายสารละลายส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ เติม 4M LiCl ปริมาตรเท่ากับสารละลาย ผสมให้เข้ากันด้วยการพลิกหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที เติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol (-20 °C) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 10 นาที ปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เติม 70% เอทานอล (-20 °C) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยให้แห้งแล้วเติมน้ำที่กำจัด RNase (DEPC-dH₂O) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร

6.2 การออกแบบไพรเมอร์ และปฏิกิริยา RT-PCR

ใช้ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีน CP ของเชื้อ *Potyvirus* ที่ทำให้เกิดโรคในเสาวรส

(a) Coat protein gene – *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CAMV) (นุชนาถ, 2538)

Forward CAMV-V1 5' GCG AAT TCT CAG GAA CTG GAC 3'

CP-CAMV (282-294)

Reverse CAMV-AV2 5' CCA AGC TTT TAC TGC GGG GAA 3'

CP-CAMV (1133-1146)

ให้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 864 คู่เบส

(b) Coat protein gene - *Passionfruit woodiness virus* (PWV) (พิศสุวรรณ และคณะ, 2549)

Forward PWV-F 5' TGG CAA AGC ACC ATA CAT TGC 3'

CP-PWV (3-23)

Reverse PWV-R 5' TTA CTG CAC TGA ACC CAC TCC GAG 3'

CP-PWV (943-966)

ให้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 963 คู่เบส

(c) Polymerase 3' end : Coat protein gene – (*Potyvirus*, *Cowpea aphid borne mosaic virus*)

Forward Unipoty NIb 5' GGX AAY AAY AGY GGX CAZ 3'

(Chen *et al.*, 2001) (X=A, G, C or T; Y = T or C; Z = A or G)

Reverse CAMV-AV2 5' CCA AGC TTT TAC TGC GGG GAA 3'

CP-CAMV (1133-1146) (นุชนาถ, 2538)

ให้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1500 คู่เบส

ตั้งเคราะห์ดีเอ็นเอจากอาร์เอ็นเอของไวรัสโดยใช้ชุดปฏิกิริยา One step RT-PCR (QIAGEN) ส่วนผสมของปฏิกิริยา One step RT-PCR ประกอบด้วย

RNA-free water	10	ไมโครลิตร
5x RT buffer	4	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
100 pmole FPLV-CP (7145-7160)	1	ไมโครลิตร
100 pmole RPLV-CP (7688-7673)	1	ไมโครลิตร
DTT	2	ไมโครลิตร
RNA template	1	ไมโครลิตร
รวมปริมาตร	20	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมในหลอดทดสอบขนาด 0.2 มล. ให้เข้ากันดีแล้วนำหลอดส่วนผสมไปใส่ในเครื่อง thermal cycler ตั้งโปรแกรมดังนี้

1) Initiation	50 ⁰ C	30	นาที
Denaturation	95 ⁰ C	15	นาที
2) Three step-cycling	35 รอบ		
Denaturation	94 ⁰ C	1	นาที
Annealing	50 ⁰ C	1	นาที
Extension	72 ⁰ C	1	นาที
3) Final extension	72 ⁰ C	10	นาที

ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1% agarose gel electrophoresis

6.3 การโคลนยีน

เตรียมดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา RT-PCR ที่แยกขนาดด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสให้บริสุทธิ์สำหรับนำไปเชื่อมต่อกับพลาสมิดพาหะทำการแยกสกัดดีเอ็นเอจากเจลด้วยชุดแยกสำเร็จรูป (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega) จากนั้นเชื่อมดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์เข้าสู่พาหะ pGEM-T easy (Promega coporation) ตามวิธีของบริษัทผู้ผลิตตั้งนี้เติมส่วนผสมของ 2X T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, pGEM-T easy (50 นาโนกรัม) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (30 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, T4 DNA ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (3 Weiss ยูนิต/ไมโครลิตร) และเติมน้ำกลั่นนิ่งมาเพื่อให้ปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำหลอดปฏิกิริยาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 16 ชั่วโมง เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอสายผสมโดยนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธี Heat shock transformation ที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 1 นาที แล้วแช่น้ำแข็ง 2 นาที จากนั้นเติม Luria-Bertani medium (LB broth medium) 950 ไมโครลิตร เขย่าที่ 37 °C นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหมุนเหวี่ยง 5,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำตะกอนเซลล์มาผสม LB broth ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

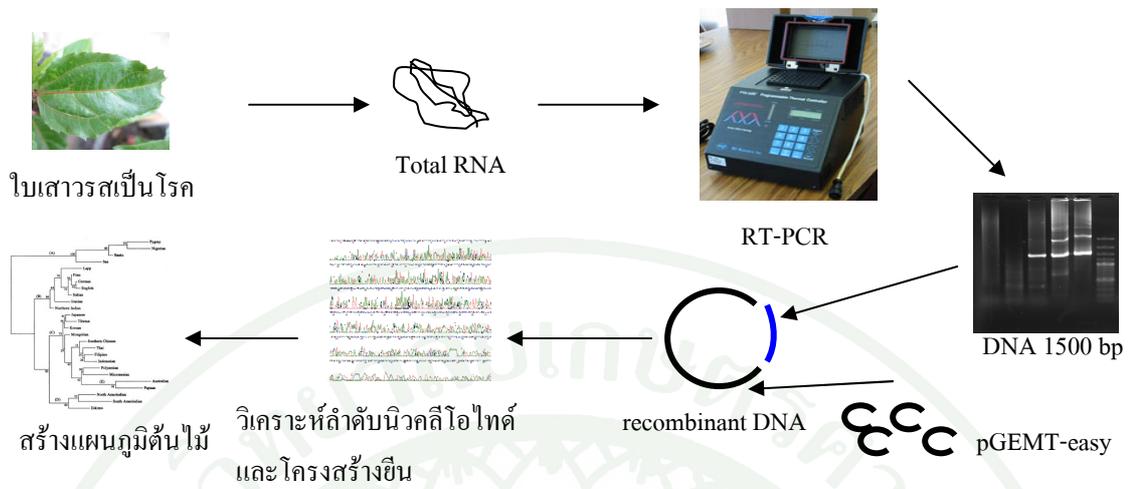
คัดเลือกเซลล์ที่ได้รับดีเอ็นเอสายผสมด้วยวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยนำตะกอนเซลล์ใน LB broth ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเติม 100 mM IPTG (Isopropyl- β -D Thiogalactopyranoside) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และ X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactosidase) ที่มีความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 °C ซ้ำคืน เลือกลโคไลของเชื้อเป็นโคไลเดี่ยวสีขาวซึ่งคาดว่ามิพลาสมิดดีเอ็นเอสายผสมนำมาเลี้ยงในอาหาร LB Broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ที่มีแอมพิซิลิน 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 37 °C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 12-16 ชั่วโมง

สกัดพลาสมิดที่มีดีเอ็นเอสายผสมจากเซลล์โดยวิธี Alkaline lysis method ด้วยวิธีของ Sambrook และคณะ (1989) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงอาหารเหลว LB broth ปั่นตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทอาหารเก่าทิ้งแล้วเติมสารละลาย I (Solution I: 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ละลายตะกอนด้วยเครื่อง vortex แล้วแช่น้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติมสารละลาย II (Solution: 0.2N NaOH, 1% SDS) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดขึ้นลง

แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติมสารละลาย III (solution III: 3 M Potassium acetate, 0.2 M glacial acetic acid) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ดูดเก็บน้ำใสประมาณ 400 ไมโครลิตร แล้วเติมส่วนผสมของ PCI mixture (phenol:chloroform : isoamyl alcohol; 25:24:1) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เติม 96-100% Ethanol 2.5 เท่าของปริมาตรน้ำใสที่ได้พลิกหลอดกลับไปมาดูน้ำใสส่วนบนที่มีพลาสติกใสห่อคใหม่แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15-20 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้งล้างตะกอนพลาสติกด้วย 70% Ethanol หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-15 นาที ดูดน้ำใสส่วนบนทิ้งทำให้ตะกอนแห้งด้วยสูญญากาศละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่น หรือ TE (Tris-EDTA buffer) ปริมาตร 30 ไมโครลิตรที่เติม RNaseA อัตรา 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

7. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และ Phylogenetic tree

นำพลาสติกสายผสมที่คัดเลือกว่ามีดีเอ็นเอที่ต้องการมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเทคนิค dideoxy chain termination และเครื่อง automated DNA sequencer เชื่อมลำดับนิวคลีโอไทด์ศึกษาโครงสร้างยีน และส่วนปลาย 3'UTR ด้วยโปรแกรม DNA Star ศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลของไวรัสในฐานข้อมูล Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยโปรแกรม Blastn, Blastp และศึกษาความสัมพันธ์ของไอโซเลท SY2 กับไวรัสในเสาวรสและพืชชนิดอื่นอีก 22 ชนิดด้วยโปรแกรม ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalW) จากนั้นสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007)



ภาพที่ 1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทดลองระดับโมเลกุลเพื่อศึกษาและจำแนกชนิดเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคใบด่างจุดเหลืองในเสาวรส

ผลการทดลอง และวิจารณ์

1. การแยกเชื้อไวรัสจากเสาวรสที่แสดงอาการของโรค

ตัวอย่างเสาวรสจำนวน 20 ต้นที่นำมาศึกษาแบ่งกลุ่มตามลักษณะอาการได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกอาการใบหนาแข็ง ใบด่างเหลือง และใบจุดเหลืองจำนวน 10 ต้น (ภาพที่ 2ก และ 2ข) กลุ่มที่สองอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยว และผิดปกติจำนวน 10 ต้น (ภาพที่ 2ค) ตรวจสอบไวรัสในใบพืชด้วยเทคนิค DAC ELISA โดยใช้แอนติซีรัมต่อ PWV (พิศสุวรรณ และ คณะ, 2549) พบว่าน้ำคั้นจากทุกตัวอย่างทำปฏิกิริยาได้กับแอนติซีรัม (ตารางที่ 3)

เมื่อนำน้ำคั้นจากใบเสาวรสกลุ่มที่ 1 แต่ละต้นบนใบคีนโโปเดียม 2 ชนิด พบว่าบนใบ *C. quinoa* เกิดแผลจุดสีเหลืองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน (ภาพที่ 3ก) ส่วนบนใบ *C. amaranticolor* เกิดแผลจุดสีแดงเข้มตรงกลางเป็นสีขาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 14 วัน (ภาพที่ 3ข)

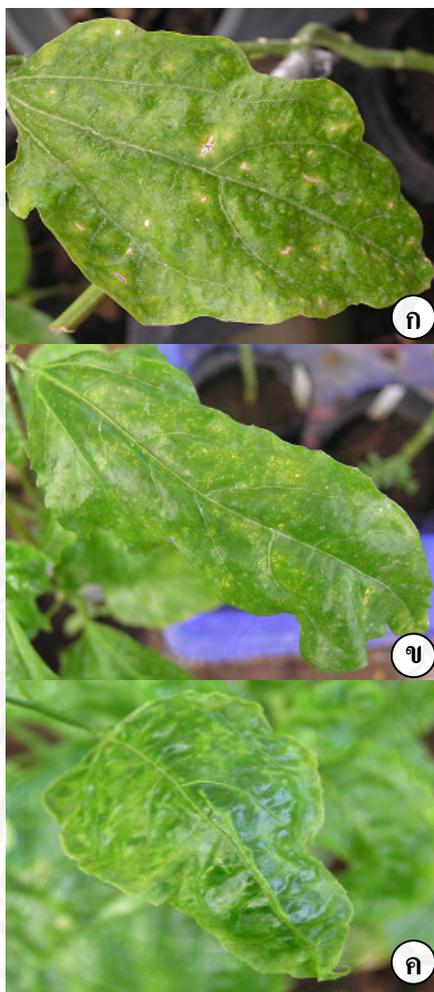
เมื่อตัดแผลจุดเฉพาะแห่งแต่ละจุดบนใบ *C. amaranticolor* มาดกับบัพเฟอร์ และปลูกเชื้อโดยการทาน้ำคั้นที่ได้บนใบของต้นกล้าเสาวรสม่วงที่เพาะจากเมล็ด พบอาการใบด่างจุดเหลือง หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 30 วัน (ภาพที่ 3ค และ 3ง) เลือกต้นเสาวรสที่แสดงอาการใบด่างจุดเหลือง 1 ต้น (ไอโซเลท SY2) มาใช้เป็นแหล่งของไวรัสที่จะศึกษา และขยายปริมาณต้นเป็นโรค ด้วยวิธีการทาบกิ่งบนเสาวรสปันธุ์สีเหลืองที่เพาะจากเมล็ด

ผลการปลูกเชื้อจากเสาวรสในกลุ่มที่ 2 ที่แสดงอาการใบสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยว และผิดปกติ พบอาการแผลจุดเฉพาะแห่งบนใบ *C. quinoa* เป็นแผลจุดสีเหลืองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มม. หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 7 วัน (ภาพที่ 4ก) ส่วนบนใบ *C. amaranticolor* เกิดแผลจุดสีแดงเข้มตรงกลางเป็นสีขาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. หลังจากปลูกเชื้อแล้ว 14 วัน (ภาพที่ 4ข) เมื่อตัดแผลจุดเฉพาะแห่งแต่ละจุดบนใบ *C. amaranticolor* มาดกับบัพเฟอร์ และปลูกเชื้อโดยการทาน้ำคั้นที่ได้บนใบของต้นกล้าเสาวรสม่วงที่เพาะจากเมล็ดพบอาการใบสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยว และผิดปกติหลังจากปลูกเชื้อแล้ว 30 วัน (ภาพที่ 4ค และ 4ง)

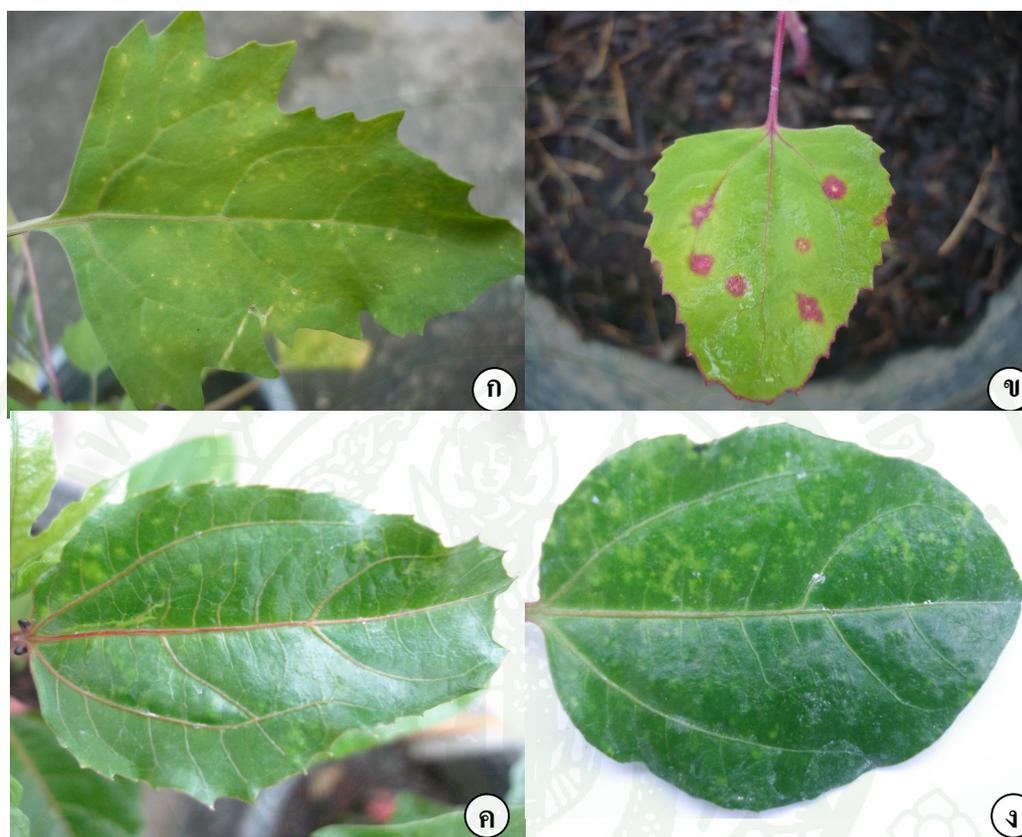
ตารางที่ 3 ผลการตรวจไวรัสในตัวอย่างใบเสาวรสถที่แสดงอาการของโรคไวรัสด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อ *Passionfruit woodiness potyvirus* (PWV)

กลุ่มที่-คั่นที่	ELISA ^{1/}
1-1	1.079
1-2	1.111
1-3	1.417
1-4	1.157
1-5	1.179
1-6	1.689
1-7	1.533
1-8	1.487
1-9	1.235
1-10	1.620
2-1	1.508
2-2	1.066
2-3	1.544
2-4	1.207
2-5	1.493
2-6	1.615
2-7	1.634
2-8	1.598
2-9	1.432
2-10	1.620
ใบเสาวรสถปกติ	0.374
บัฟเฟอร์	0.106

^{1/} ค่า ELISA วัดที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรเมื่อเติมซับสเตรทแล้ว 60 นาที คัดค่าเฉลี่ยจาก 2 หลุมต่อตัวอย่าง ค่าที่สูงกว่า 2 เท่าของใบเสาวรสถปกติถือว่าให้ผลบวกกับแอนติซีรัมและแสดงว่ามีเชื้อไวรัสในตัวอย่าง

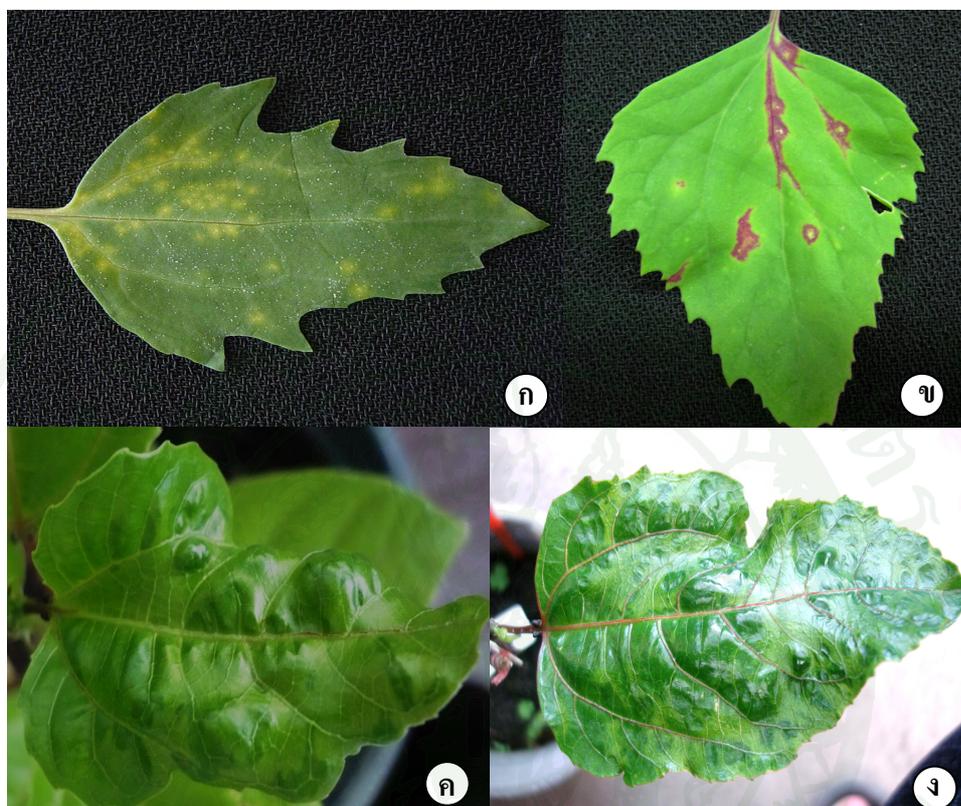


ภาพที่ 2 ลักษณะอาการของโรคไวรัสบนใบเสาวรสสีม่วง (*Passiflora edulis*) ที่รวบรวมไว้
 ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน
 จ.นครปฐม
 ก และ ข. กลุ่มที่ 1 อาการใบหนาแข็ง ต่างเหลือง และจุดต่างเหลือง
 ค. กลุ่มที่ 2 อาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยว และผิดรูป



ภาพที่ 3 อาการบนพืชอาศัยจากการปลูกเชื้อจากใบเสาวรสที่แสดงอาการ ใบหนาแข็ง
ต่างเหลือง และต่างจุดเหลือง (กลุ่มที่ 1)

- ก. อาการแผลจุดเฉพาะแห่งสีเหลืองบนใบ *Chenopodium quinoa*
- ข. อาการแผลจุดเฉพาะแห่งสีแดงบนใบ *C. amaranticolor*
- ค. อาการจุดเหลืองบนใบยอดเสาวรส
- ง. อาการจุดเหลืองบนใบล่างของเสาวรส



ภาพที่ 4 อาการบนพืชอาศัยจากการปลูกเชื้อจากใบเสาวรสาการใบต่างสีเขียวเข้มสลบสีเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยว และผิดปกติรูป (กลุ่มที่ 2)

- ก. อาการแผลจุดเฉพาะแห่งสีเหลืองบนใบ *Chenopodium quinoa*
- ข. อาการแผลจุดเฉพาะแห่งสีแดงบนใบ *C. amaranticolor*
- ค. อาการใบต่างสีเขียวเข้มสลบสีเขียวอ่อน และใบบิดเบี้ยวของใบยอดเสาวรสา
- ง. อาการใบต่างสีเขียวเข้มสลบสีเขียวอ่อน และใบบิดเบี้ยวของใบล่างเสาวรสา

จากการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะอาการของโรค woodiness ของเสาวรสปันธ์สีม่วงเบอร์ 2 พบว่าเสาวรสกลุ่มที่ 1 แสดงอาการใบหนาแข็ง ใบด่างเหลือง และใบด่างจุดเหลืองเหมือนกับเสาวรสที่เข้าทำลายโดยเชื้อ PWV รวมทั้งแสดงอาการใบจุดเหลืองบนใบแก่ซึ่งเป็นอาการแบบหนึ่งของโรค woodiness (Manicom, 2003) นอกจากนี้พบว่ามีอาการเหมือนกับเสาวรส (*P. edulis f. flavicarpa*) ในประเทศศรีลังกาที่เป็นโรคจากเชื้อ SLPMoV โดยแสดงอาการใบจุดเหลือง และด่างเหลือง (Dassanayake and Hicks 1992) รายงานของ Parella และ Castellano (2002) ที่พบอาการจุดเหลือง และใบด่างแบบ mottle บนเสาวรส (*P. caerulea*) รวมถึงรายงานของ Kitajima และคณะ (2003) ที่พบโรคในเสาวรสปันธ์สีม่วงในประเทศ Ivory Coast ที่เกิดจากเชื้อ *Passiflora rinspot potyvirus* แสดงอาการใบจุดเหลือง และใบด่างแบบ mottle กับรายงานของ Baker และ Jone (2006) พบอาการใบด่างเหลืองอย่างรุนแรงบนเสาวรส (*P. incense*)

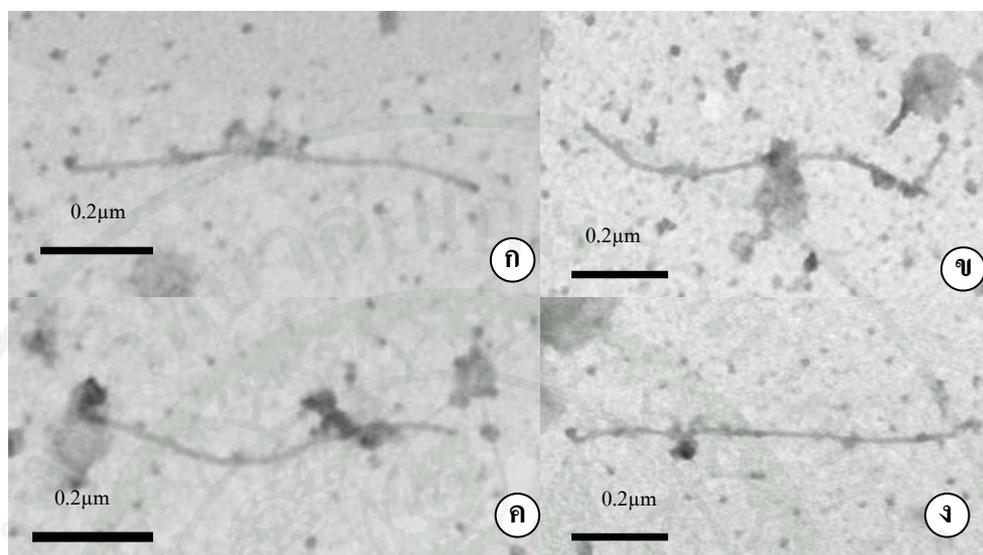
ส่วนอาการของเสาวรสกลุ่มที่ 2 ได้แก่ออาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยว และผิดปกติ มีอาการเหมือนกับอาการจากเชื้อ PWV (Jan และ Yeh, 1994) คือ ใบด่างสีเขียวเข้ม ใบบิดเบี้ยว และผิดปกติ เช่นเดียวกับ Chang (1992) พบอาการบนเสาวรส (*P. edulis f. flavicarpa* และ *P. edulis x P. edulis f. flavicarpa*) ที่มีเชื้อ PWV แสดงอาการใบด่างแบบ mosaic

คีนโน โปเดียมที่ได้รับการปลูกเชื้อจากใบเสาวรสกลุ่มที่ 1 และ 2 แสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่งบนใบทั้ง *C. quinoa* และ *C. amaranticolor* ซึ่งเหมือนกับอาการที่เกิดจากเชื้อ PaMV (Chang, 1992), PWV-AO (Iwai *et al.*, 2006) และ CABMV (Nascimento *et al.*, 2006) นอกจากนี้พบอาการแผลจุดเฉพาะแห่งบนใบ *C. amaranticolor* ยังเกิดจากเชื้อ SLPMoV (Dassanyake and Hicks 1992), PFSV (Kitajima *et al.*, 2003) และ PCV (Chang *et al.*, 1996) ดังนั้นอาการจากไวรัสในเสาวรสกลุ่มที่ 1 และ 2 บนคีนโน โปเดียมไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อได้ถูกต้อง

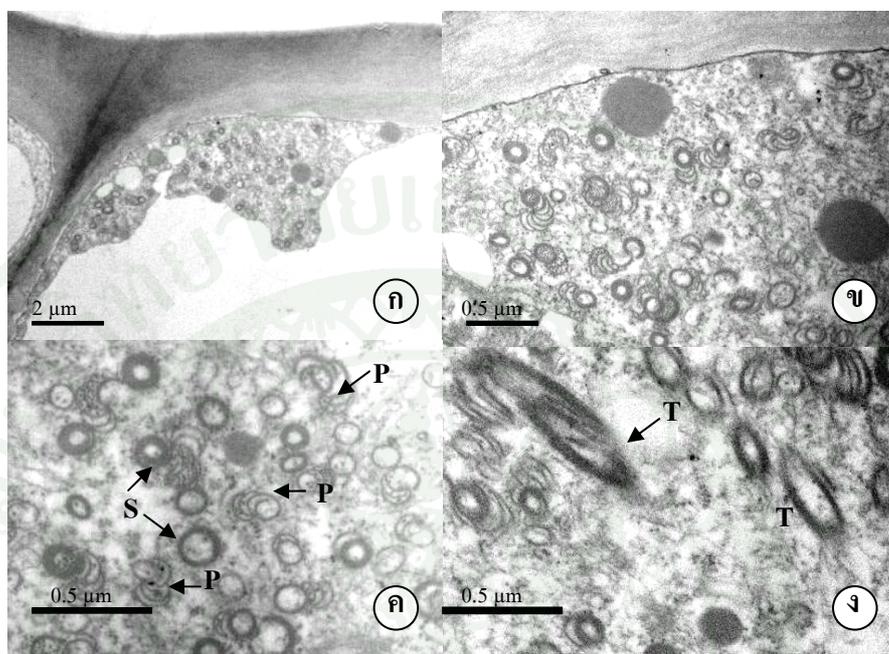
2. การตรวจคุณสมบัติของอนุภาคไวรัส และโครงสร้างจุลภาคของเซลล์ใบเสาวรสที่เป็นโรค

เมื่อใช้ใบเสาวรส SY2 เป็นแหล่งของไวรัสในการตรวจสอบรูปร่าง และขนาดของอนุภาคไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคพบว่าอนุภาคไวรัสเป็นรูปท่อนยาวคด ถ่ายภาพ และวัดขนาดอนุภาคจำนวน 23 อนุภาคพบว่ามีความเฉลี่ย 11.3×642 นาโนเมตร (ภาพที่ 5) การตรวจสอบไวรัสด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในเสาวรสเป็นโรคที่มีรายงานว่าสาเหตุมาจากเชื้อในจีโนม *Potyvirus* เหมือนกับไอโซเลต SY2 ที่ศึกษามีรายงานขนาดของอนุภาคไวรัสแตกต่างกัน เช่น เชื้อ CABMV มีขนาด 690-760 นาโนเมตร (Nascimento *et al.*, 2006), PWV มีขนาด 12×750 นาโนเมตร (Edwardson and Christie, 1991), PaMV ขนาด 13×736 นาโนเมตร (Chang, 1992) และ PCSV มีขนาด 750 นาโนเมตร (Baker and Jone, 2006)

ผลการศึกษาโครงสร้างจุลภาคของเซลล์พืชที่เป็นโรคโดยตรวจดูภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ใบเสาวรส SY2 พบผลึกโปรตีน (inclusion bodies) แบบ pinwheel, scroll และ tubular จำนวนมาก (ภาพที่ 6) ซึ่งแสดงว่าไวรัสที่พบในตัวอย่างเสาวรส SY2 จัดอยู่ในจีโนม *Potyvirus* มีลักษณะของ inclusion bodies ในเซลล์คล้ายกับเชื้อ *Potyvirus* ชนิดอื่นที่มีรายงานว่าเข้าทำลายเสาวรส เช่น PWV (Yeh and Chu, 1996) พบการสร้างผลึกโปรตีน แบบ pinwheel และ tubular ในไซโทพลาสซึมของเซลล์เสาวรสและรายงานของ Dassanayake และ Hick (1992) ที่ศึกษาเชื้อ SLPMoV พบผลึกโปรตีนแบบ pinwheel ในไซโทพลาสซึมของเซลล์เสาวรสที่มีเชื้อ PaMV พบผลึกโปรตีนแบบ bundle-shaped inclusion (Chang, 1992) PFCV และ PCV (Baker and Jone, 2006, Chang *et al.*, 1996) พบผลึกโปรตีนแบบ cylindrical inclusion อย่างไรก็ตามไม่สามารถจำแนกชนิดของเชื้อได้โดยฐานวิทยาและลักษณะของผลึกโปรตีน



ภาพที่ 5 ลักษณะอนุภาคไวรัสรูปท่อนยาวคดที่พบในใบเสาวรสไอโซเลท SY2 เตรียมตัวอย่างแบบ Dip preparation



ภาพที่ 6 ลักษณะของผลึกโปรตีน (inclusion bodies) ที่พบในไซโทพลาสซึมของใบ
เสาวรศ SY2 เตรียมตัวอย่างแบบ Ultratin sectioning
pinwheel (P), scroll (S), tubular (T)

3. ลักษณะอาการบนพืชทดสอบ

หลังจากปลูกเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคในเสาวรส SY2 อาการที่พบบนพืชอาศัยแบ่งได้เป็นแบบแผลจุดเฉพาะแห่ง และแบบแพร่กระจายทั่วต้น

Family Leguminosae

ถั่วฝักยาว (*V. sesquipedalis*) อาการยอดใบด่างเหลืองตามเส้นใบหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน จากนั้นเกิดอาการแผลจุดเฉพาะแห่งสีน้ำตาลหลังปลูกเชื้อ 14 วัน (ภาพที่ 7ก และ ข)

ถั่วแขกญี่ปุ่น (*P. vulgaris* cv. Yamashiro) อาการใบเหลืองที่ยอดใบ และแผลจุดเฉพาะแห่งหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน จากนั้นเกิดพบแผลจุดเฉพาะแห่งสีดำบนใบที่ปลูกเชื้อแล้ว 14 วัน (ภาพที่ 7ค และ ง)

ถั่วขาว (*B. cylindrica*) อาการเส้นใบเหลืองที่ยอดใบหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน จากนั้นแสดงอาการแผลจุดเฉพาะแห่งสีน้ำตาลบนใบที่ปลูกเชื้อแล้ว 14 วัน (ภาพที่ 8ก และ ข)

ถั่วพุ่ม (*V. sinensis*) อาการยอดใบด่างเหลืองหลังปลูกเชื้อ 7 วัน จากนั้นเกิดอาการแผลจุดเฉพาะแห่งสีดำหลังปลูกเชื้อ 14 วัน (ภาพที่ 8ค และ ง)

ถั่วแขกออสเตรเลีย (*P. vulgaris* cv. Bountiful) ไม่เป็นพืชอาศัย

Family Solanaceae

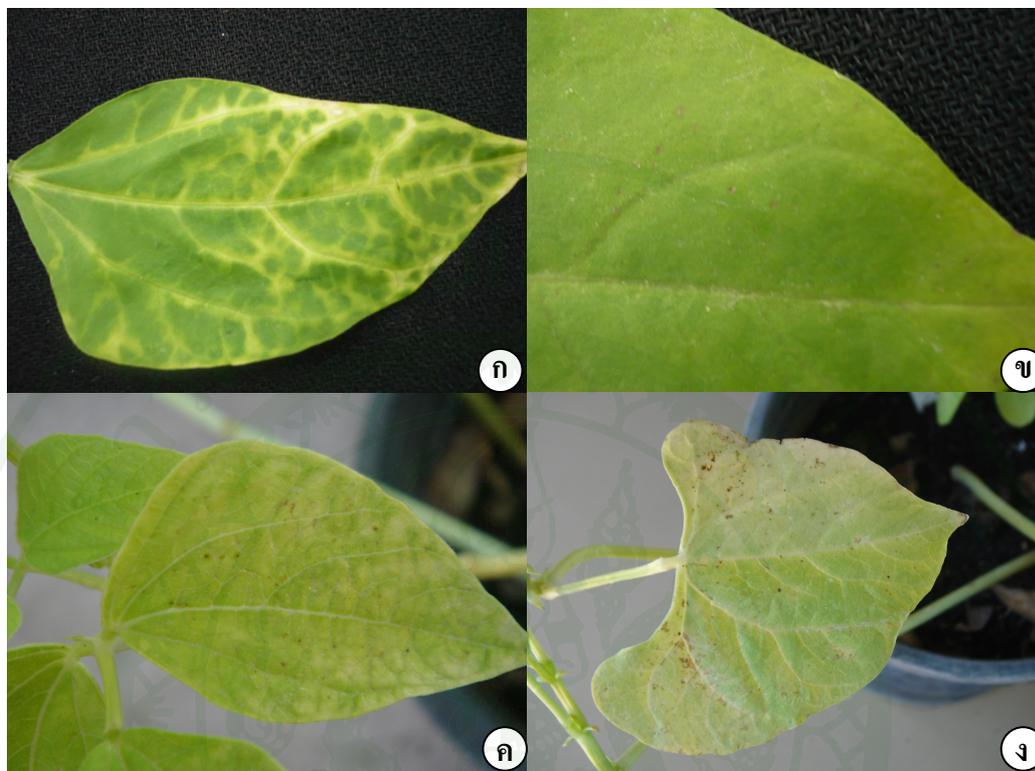
N. benthamiana อาการใบด่างเหลืองแพร่กระจายทั่วต้นหลังปลูกเชื้อ 14 วัน

N. glutinosa และ *N. tabacum* ไม่เป็นพืชอาศัย

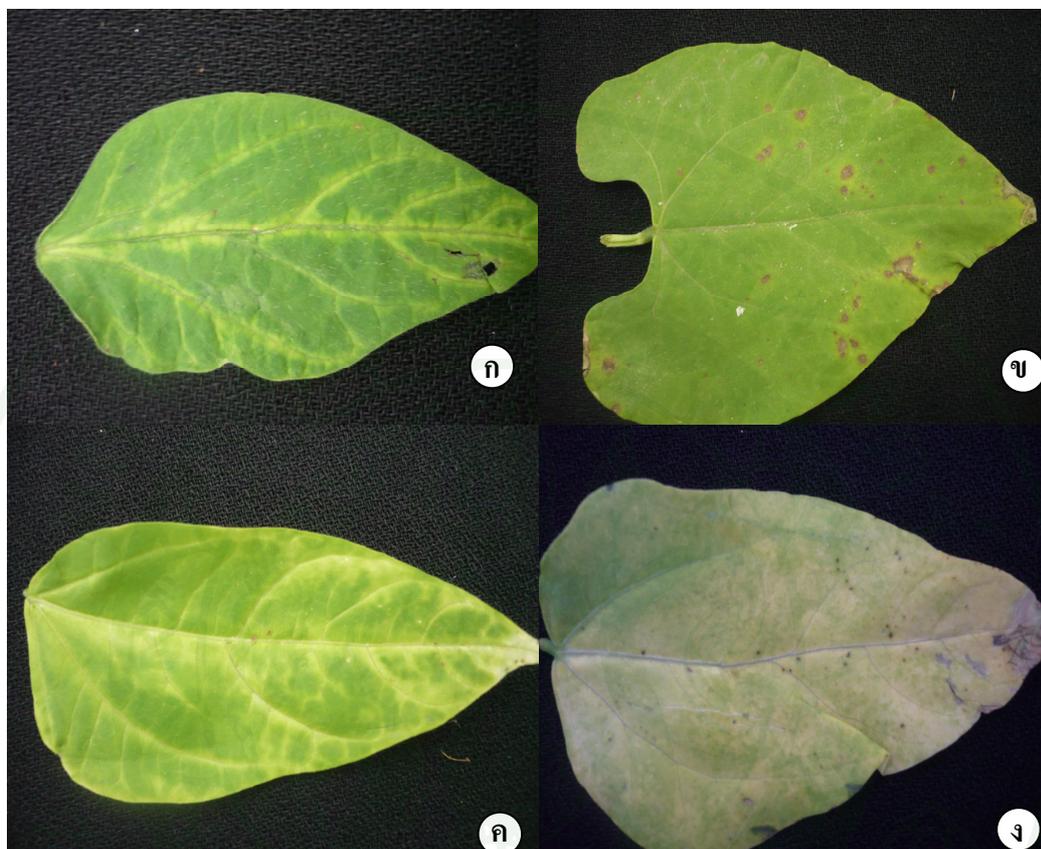
Family *Chenopodiaceae*

พบเฉพาะอาการแบบแผลจุดเฉพาะแห่งทั้ง *C. quinoa* และ *C. amaranticolor* โดย *C. quinoa* แสดงอาการแผลจุดสีเหลืองหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน ส่วน *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลจุดสีแดงเข้มตรงกลางเป็นสีขาวหลังปลูกเชื้อ 14 วัน (ภาพที่ 3)

อาการแผลจุดเฉพาะแห่งที่พบบน *C. quinoa* และ *C. amaranticolor* จากไอโซเลท SY2 เหมือนกับที่พบจากเชื้อ PWV-AO, CABMV และ PaMV ส่วนอาการบนยาสูบ *N. benthamiana* เหมือนกับรายงานของเชื้อ CABMV (Nascimento *et al.*, 2006), PaMV (Chang, 1992) และ PCV (Chang *et al.*, 1996) สำหรับพืชในกลุ่ม *Leguminosae* พบว่าไอโซเลท SY2 ทำให้เกิดอาการของโรคทั้งบนใบที่ปลูกเชื้อและใบยอด เมื่อเปรียบเทียบกับ SY2 กับเชื้อ PWV-IB, PWV-AO, PaMV และ PCV ซึ่งไม่ทำให้เกิดโรคบนถั่วฝักยาว (*V. sesquipedalis*) และเชื้อ PFSV ไม่ก่อให้เกิดโรคบนถั่วพุ่ม และถั่วขาว (Kitajima *et al.*, 2003)



ภาพที่ 7 ลักษณะอาการบนพืชทดสอบจากการปลูกเชื้อไวรัสเอโซเลท SY2 ถั่วฝักยาว (*Vigna sesquipedalis*) แสดงอาการบนใบยอดหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน (ก) และแผลจุดบนใบที่ปลูกเชื้อหลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน (ข) ส่วน *Phaseolus vulgaris* cv. Yamashiro ใบยอดแสดงอาการแบบ systemic หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน (ค) ส่วนใบยอดแสดงอาการแบบ systemic หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน ใบที่ปลูกเชื้อแสดงอาการแผลจุดหลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน (ง)



ภาพที่ 8 อาการเป็นโรคบนถั่วขาว (*Bruguiera cylindrica*) และถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) จากการปลูกเชื้อจากเสาวรสไอโซเลท SY2

- ก. อาการเส้นใบเหลืองที่ยอดใบถั่วขาว หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน
- ข. อาการจุดแผลแห้งสีน้ำตาลบนใบถั่วขาว หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน
- ค. อาการใบยอดค่างเหลืองถั่วพุ่ม หลังจากปลูกเชื้อ 7 วัน
- ง. อาการจุดแผลเฉพาะแห้งสีดำบนใบถั่วพุ่มที่ปลูกเชื้อ 14 วัน

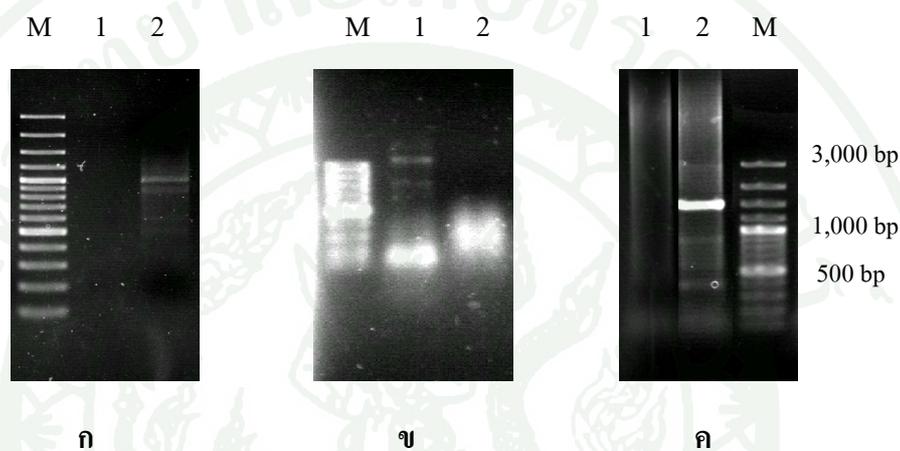
ตารางที่ 4 ลักษณะอาการบนพืชทดสอบ 8 ชนิดที่ได้รับปลูกเชื้อไวรัสจากเสาวรศ SY2

พืช	SY2		PWV-IB	PWV-AO	CABMV	PFSV	SLPMoV	PaMV	PCV
	U	I							
ตระกูล Chenopodiaceae									
<i>C. quinoa</i>	LL	LL	-	LL	LL	-	-	LL	-
<i>C. amaranticolor</i>	LL	LL	-	LL	LL	LL	LL	LL	LL
ตระกูล Solanaceae									
<i>N. benthamiana</i>	YM	YM	-	-	YM	-	N	YM	YM
<i>N. tabacum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. glutinosa</i>	-	-	-	-	-	N	-	-	-
ตระกูล Leguminosae									
<i>V. sinensis</i>	YV	Lb	N	N	N	-	N	N	N
<i>V. sesquipedalis</i>	YV	Lb	-	-	N	N	N	-	-
<i>B. cylindrica</i>	YM	LB	N	N	N	-	N	N	N

PWV-IB = *Passionfruit woodiness virus*; Ibuski-kakoshima isolate (Iwai *et al.*, 2006), : PWV-AO = *Passionfruit woodiness virus*; Amami-O-shima isolate (Iwai *et al.*, 2006), CABMV = *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (Nascimento *et al.*, 2006), PFSV = *Passionfruit ringspot virus* (Kitajima *et al.*, 2003), SLPMoV = *Srilankan passionfruit mottle virus* (Dassanayake *et al.*, 1992), PaMV = *Passionfruit mottle virus* (Chang *et al.*, 1992), PCV = *Passionfruit crinkle virus*, (Chang *et al.*, 1996), U = ใบยอด, I = ใบที่ปลูกเชื้อ, LL = แผลจุดเฉพาะแห้ง, YM = ใบด่างเหลือง YV = เส้นใบเหลือง, Lb = แผลจุดเฉพาะแห้งสีดำ, LB = แผลจุดเฉพาะแห้งสีน้ำตาล, - = ไม่เป็นพืชอาศัย, N = ไม่มีรายงาน

4. การสังเคราะห์ยีนของไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR

ผลการสังเคราะห์ยีนของไวรัสจากตัวอย่างเสาวรศ SY2 ด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ พบว่าไพรเมอร์ Forward CAMV-V1 และ Reverse CAMV-AV2 ให้ดีเอ็นเอผลผลิตขนาดประมาณ 1,000 คู่เบส (ภาพที่ 9ก) ไพรเมอร์ Forward PWV-F และ Reverse PWV-R ไม่พบแถบดีเอ็นเอ (ภาพที่ 9ข) ส่วนไพรเมอร์ Unipot และ CABMV-AV2 ให้ดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (ภาพที่ 9ค)



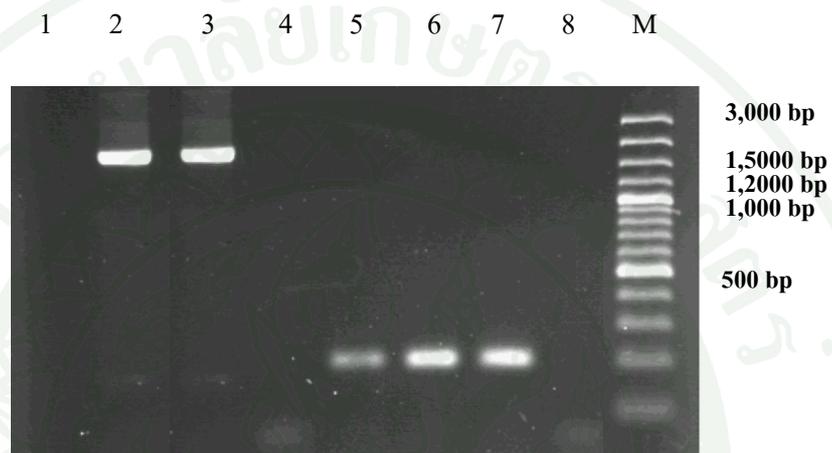
ภาพที่ 9 เจลแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากใบเสาวรศ SY2 เป็นต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วยเอทิลเดียมโบรไมด์

- ก. ไพรเมอร์ Forward CAMV-V1 และ Reverse CAMV-AV2
- ข. ไพรเมอร์ Forward PWV-F และ Reverse PWV-R
- ค. ไพรเมอร์ Unipot และ CABMV-AV2

1: เสาวรศปกติ; 2: เสาวรศไอโซเลท SY2

4.1 การโคลนยีนของเสาวรสีไอโซเลท SY2

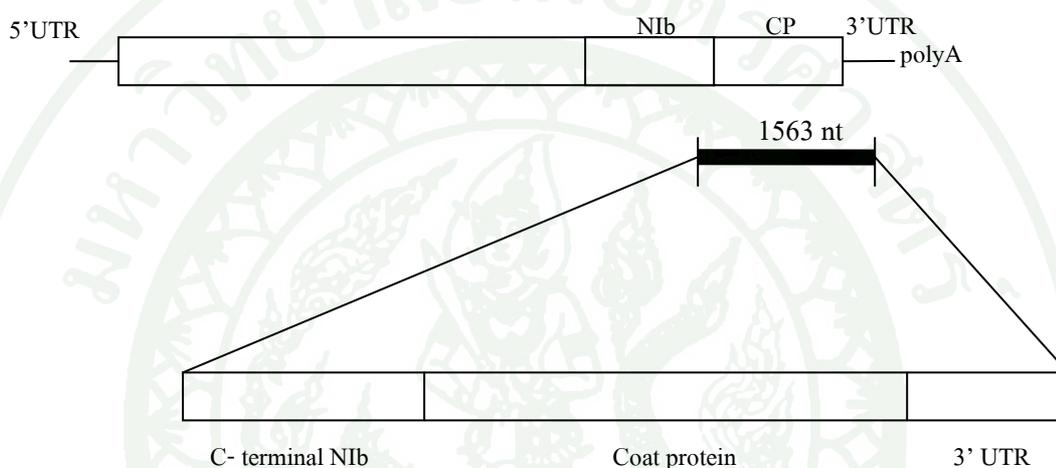
ผลการตรวจสอบ โคลนรวม 8 โคลน พบว่ามี 2 โคลนที่มีดีเอ็นเอสอดแทรกในพลาสมิด พหุขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส (ภาพที่ 10 ช่องที่ 2 และ 3) จึงเลือกไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์



ภาพที่ 10 เจลแสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการคัดเลือกโคลนของยีนจากไอโซเลท SY2 ในพลาสมิด สายผสม (ช่อง 1-8) แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis
ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และโครงสร้างของยีนบางส่วนจากไอโซเลต SY2

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีโนมที่ได้จากเสาวรส์ไอโซเลต SY2 มีจำนวน 1,563 คู่เบส ประกอบด้วยยีน 3 ส่วนของจีโนม คือ ยีน NIB บางส่วนด้านปลาย 3' ขนาด 630 คู่เบส, Coat protein (CP) ครบทั้งยีนขนาด 819 คู่เบส และส่วนที่ไม่แปลรหัส 3' UTR บางส่วนขนาด 111 คู่เบส (ภาพที่ 11)



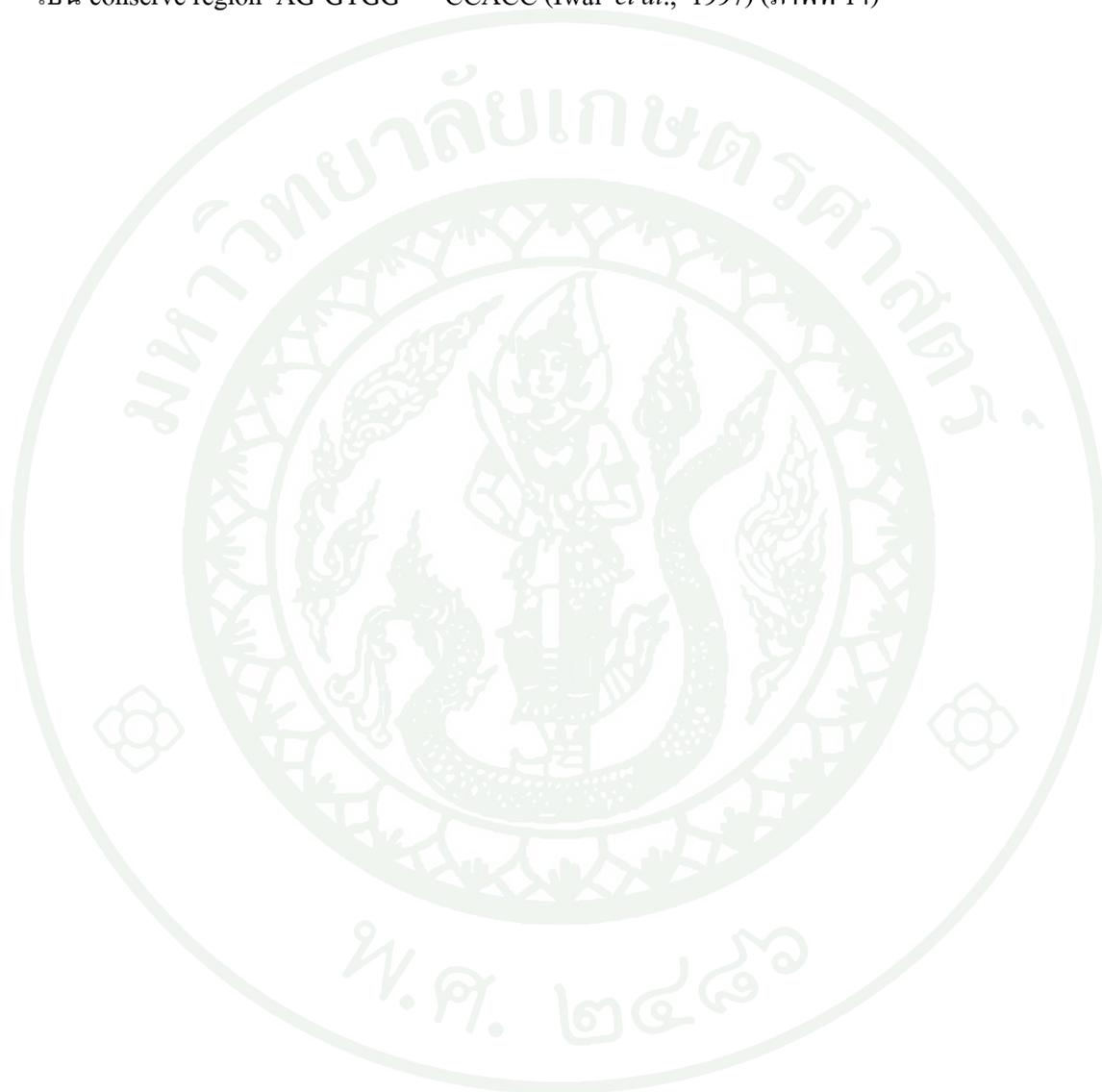
ภาพที่ 11 โครงสร้างยีนของจีโนมจากไวรัสในตัวอย่างเสาวรส์ SY2

ส่วนแรก เป็นยีน NIB มี 342 นิวคลีโอไทด์ เป็นกรดอะมิโนได้ 114 เรซิดิวซ์ ซึ่งเป็นกรดอะมิโนด้านปลาย Carboxyl end บางส่วนของยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) (Shukla *et al.*, 1991) พบตำแหน่งของ putative nucleic acid binding site (Q) (Ha *et al.*, 2008) และ metal ion binding site (GDD) ที่เรซิดิวส์ตำแหน่งที่ 6 และ 45 ตามลำดับ (Shukla *et al.*, 1991; Ha *et al.*, 2008) (ภาพที่ 12)

ส่วนที่สองเป็น Coat protein ครบทั้งยีนจำนวน 819 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 272 เรซิดิวซ์ บริเวณที่เป็น cleavage site ของ CP พบเรซิดิวซ์ Q/S (CAGTCT) กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 9-11 เป็นรหัส DAG ซึ่งเกี่ยวข้องกับการถ่ายทอดโรคโดยเพลี้ยอ่อน (Iwai *et al.*, 1997) และ cell-to-cell movement (Shukla *et al.*, 1991; Ha *et al.*, 2008) ภายใน CP พบส่วนที่เป็น Core protein ประกอบด้วย 234 เรซิดิวซ์ (Shukla *et al.*, 1991) และส่วนที่เป็น Poty-coat superfamily

ประกอบด้วยกรดอะมิโนได้ 140 เรซิดิวส์ นอกจากนี้พบกรดอะมิโน LRQ-X41-FDF ซึ่งเกี่ยวข้อง
กับ Encapsidation ของไวรัส (Ha *et al.*, 2008) (ภาพที่ 13)

ส่วนที่สามเป็นบริเวณที่ไม่แปลรหัส 3'UTR บางส่วนจำนวน 111 นิวคลีโอไทด์ มีส่วนที่
เป็น conserve region AG-GTGG----CCACC (Iwai *et al.*, 1997) (ภาพที่ 14)





ภาพที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนบริเวณ C-terminal ของยีน Nib ของไอโซเลทไบ

ต่างจุดเหลือง SY2

1. ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของยีน Nib (ตัวหนา)
2. putative nucleic acid binding site (Q)
3. metal ion binding site (GDD)
4. ไพรมอร์ Unipoty 5'-GGXAAYAAYAGYGGXCAZ-3'

Coat protein (nucleotide)

Q S G K I D D V **D A G** N T G K D K K K E
CAGTCTGGAAAGATTGATGATGTC**GATGCAGGC**AAACACAGGCAAAGACAAAAAGAAAGAA 60
 1 2 3
 G E Q P K N P N S E K V A A I S D K D V
 GGTGAGCAACCCAAAAATCCAAATTCTGAAAAAGTTGCTGCTATATCAGACAAAGATGTT 120
 G S S S K G R I V P R L Q K I T K K M N
 GGCAGTAGCTCAAAAGGGCGCATTGTGCCCGGTTGCAGAAAAICAAAAAGAAATGAAC 180
 L P M V K G K V I L D L D H L I D Y K P
 TTACCAATGGTTAAAGGCAAAGTAATTCTTGATCTTGATCATTGATTGATTACAAGCCT 240
 N Q T D W F N T R A T K K H F D S L Y N
 AACCAGACAGATTGGTTCAACACAAGAGCAACCAAGAAACATTTTGATTGATTGTACAAT 300
 A V K T E Y E L D D V Q M N V V M N G F
 GCTGTCAAAACTGAATACGAGTTGGACGATGTTCAAATGAATGTCGTTATGAATGGTTTC 360
 4
 M V W C I E N G T S P D V N G V W V M M
 ATGGTGTGGTGCATTGAAATTGGCACTTCACCAGATGTCAATGGCGTGTGGGTAATGATG 420
 D G D E Q I E Y P L K P M V E N A K P T
 GACGAAGATGAACAAATTGAGTACCCACTCAAGCCAAGTGTGAAAATGCAAAGCCGACA 480
L R Q I M H H F S D A A E A Y I E M R N
TTGAGACAAATCATGCATCACTTTTCAGATGCGGCTGAAGCATAACATTGAAATGAGGAAT 540
 5
 S E G L Y M P R Y G L L R N L R D K S L
 TCTGAGGGACTGTACATGCCTAGGTATGGTCTTCTTAGGAACCTGAGGGACAAAAGTCTG 600
 A R Y A **F D F** Y E V T S K T S D R A K E
 GCGCGATATGCAT**TTCGATTTCT**TATGAGGTCACCTCTAAGACGTCAGATAGAGCTAAAGAA 660
 5
 A V T Q M ⁵K A A A L V G T T N K M F G L
 GCTGTACACAAAATGAAGGCAGCCGCCCTCGTTGGCACTACAAATAAGATGTTTGGATTG 720
 D G S V S A T G E D T E R H T A G D V N
 GATGGTAGTGTGAGCGCAACTGGCGAAGATACTGAAAGGCACACTGCAGGGGATGTCAAT 780
 4 3
 Q N M H S L L G V G S V Q
 CAGAACATGCACTCTTCTCGGAGTGGGTTTCAGTGCAGTAA 819

ภาพที่ 13 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีน Coat protein ครบทั้งยีน

1. cleavage site (Q/S) ของ Coat protein V-S-L-Q/SGKI
2. เรซิดิว DAG
3. Core protein 4. Poty -coat superfamily region 5. Encapsidation domain (LRQ-X₄₁-FDF)

3' UTR

AGGCTAGGTAAACTGGCCACAGTTAGAACTTCGCGTTGCTTAGTAATCCTTAGTACTTTT 60
 ACTTTCACTCTCTTTACTTTCC**AGTGTGGTTATACCACC**TCTAGAGGATCC 111

1 ←
 CAMV-AV2 primer

ภาพที่ 14 ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 111 นิวคลีโอไทด์บริเวณยื่น 3'UTR บางส่วน และส่วน conserve region AG-GTGG----CCACC (ตัวหนา)



6. การทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนส่วนของ Coat protein

จากการทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน Coat protein ด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่าไอโซเลท SY2 มีความเหมือนกับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ *Telosma mosaic virus* (TeMV) มากที่สุดที่ระดับ 87 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ เชื้อ PWV-AUS จากประเทศออสเตรเลีย ที่ระดับ 82 เปอร์เซ็นต์ เชื้อ PWV (IB, AO และ Taiwan) จากประเทศญี่ปุ่น และได้หวั่นที่ระดับ 70-71 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ CABMV ที่ระดับ 66-70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6) ทั้งนี้บริเวณ 70 เรซิดิวซ์แรกของโปรตีน CP ของไอโซเลท SY2 มีความแตกต่างกับเชื้ออื่นที่นำมาเปรียบเทียบ เช่น เชื้อ TeMV ตำแหน่งที่ 4, 12, 13, 19-24, 26-28, 30-33 และ 39 เชื้อ PWV (ไอโซเลท CL, SD-Newsouthwales) ตำแหน่ง 1-8, 10-13, 17-18 และ 21 เชื้อ PWV (ไอโซเลท IB, AO, Taiwan) ที่ตำแหน่ง 1-12, 14, 15, 20 และ 23 เชื้อ CABMV (ไอโซเลท SP, Zim, Mor) ที่ตำแหน่ง 1, 3-7 และ 12-16 (ภาพที่ 15)

Coat protein ของไวรัสที่นำมาศึกษาทั้งหมดมีลำดับกรดอะมิโน DAG ตำแหน่งที่ 9-11 ยกเว้นเชื้อ PWV (Queensland) จากประเทศออสเตรเลียมีลำดับกรดอะมิโนเป็น DTG ที่ตำแหน่ง 16-18 ส่วนเชื้อ PWV-AO พบว่ามีลำดับ DAG อยู่ 2 แห่ง คือ ที่ตำแหน่ง 16-18 และ 58-60 (Iwai *et al.*, 1997) นอกจากนี้พบว่าบริเวณก่อนหน้า และหลังลำดับ DAG มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันทุกเชื้อ

บริเวณ cleavage site ของ ไอโซเลท SY2 และเชื้อที่นำมาศึกษาทั้งหมดเป็น Q/S ยกเว้น PWV-AO และ PWV-Taiwan ที่มีลำดับเป็น Q/T ในส่วนของ Core protein ไอโซเลท SY2 และเชื้อที่นำมาศึกษามีความแตกต่างกันของลำดับกรดอะมิโน เช่น TeMV ตำแหน่งที่ 1 และ 7 เชื้อ PWV (CL, SD-Newsouthwales) ที่ตำแหน่ง 1, 6, 7, 8, 12, 13 และ 36 เชื้อ PWV-IB ที่ตำแหน่ง 1, 3, 6, 7, 8, 13, 18, 23 และ 36 เชื้อ PWV (AO, Taiwan) ที่ตำแหน่ง 3 และ 6 เชื้อ CABMV (SP, Zim, Mor) ที่ตำแหน่ง 1-3, 6, 7, 10, 12, 13, 21, 28 และ 30 (ภาพที่ 15)

บริเวณ Poty coat superfamily ของ ไอโซเลท SY2 มีความแตกต่างกับเชื้ออื่น เช่น PWV (AO, IB, Taiwan) ตำแหน่งที่ 3, 4, 7, 24, 29, 53-55, 62, 69, 78, 86, 90, 94, 102-108, 114, 121, 128 และ 136 เชื้อ PWV (CL, SD, AUS, Queensland) ตำแหน่งที่ 4, 17, 51-55, 70, 81-83, 90, 94, 102-104, 108, 114, 116, 119, 128, 132 และ 136 เชื้อ CABMV (SP, Zim, Mor) ตำแหน่งที่ 9, 17, 19, 24, 35, 55, 62, 90, 93, 94, 101-107, 114, 116, 119, 121 และ 128 (ภาพที่ 15)

บริเวณลำดับกรดอะมิโน LRQ-X₄₁-FDF ของไอโซเลท SY2 มีลำดับ LRQ และ FDF เหมือนกับเชื้อที่นำมาศึกษาทั้งหมดยกเว้น PWV-Taiwan มีลำดับเป็น FDS รวมถึงที่บริเวณ X₄₁ มีความแตกต่างดังนี้ CABMV-Zim ตำแหน่งที่ 4 และ 31 เชื้อ PWV (CL, SD, AUS, Queensland) ตำแหน่งที่ 20-22, 24 และ 39 เชื้อ PWV (AO, IB, Taiwan) ตำแหน่งที่ 22-24, 31, 38 และ 47 (ภาพที่ 15)



ตารางที่ 5 ไวรัสในจีนัส *Potyvirus* ที่นำลำดับกรดอะมิโนของ Coat protein (CP) มาศึกษาเปรียบเทียบกับไวรัสจากเสาวรศ SY2

ชื่อเต็ม, ชื่อย่อ	รหัสจาก GenBank	อ้างอิง
<i>Azuki bean mosaic virus</i> , ABMV	AB012663	McKern <i>et al.</i> , 1992
<i>Ammi majus latent virus</i>	AB361564	Irey <i>et al.</i> , 2001
<i>Bean common mosaic necrosis virus</i> , BCMNV	NP660175	Melgarejo <i>et al.</i> , 2007
<i>Bean common mosaic virus</i> , BCMV	NC003397	Fang <i>et al.</i> , 1995
<i>Blackeye cowpea mosaic virus</i> , BICMV	AY575773	McKern <i>et al.</i> , 1992
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> , CABMV-Mor	AF083558	McKern <i>et al.</i> , 1994
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> , CABMV-SP	AY433950	Gioria <i>et al.</i> , 2004
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> , CABMV-Zim	AF348210	Mlotshwa <i>et al.</i> , 2002
<i>Ceratobium mosaic potyvirus</i> , CerMV	AF022446	Mackenzie <i>et al.</i> , 1998
<i>Fritillary virus Y</i> , FVY	YP001974419	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Peanut stripe virus</i> , PStV	Y11775	Flasinski <i>et al.</i> , 1995
<i>Passionfruit woodiness virus</i> , PWV-AO	D85849	Iwai <i>et al.</i> , 1997
<i>Passionfruit woodiness virus</i> , PWV-IB	AB185021	Iwai <i>et al.</i> , 2006
<i>Passionfruit woodiness virus</i> , PWV-Taiwan	AF208662	Iwai <i>et al.</i> , 2006
<i>Passionfruit woodiness virus</i> , PWV-AUS	AY461662	Iwai <i>et al.</i> , 2006
<i>Passionfruit woodiness virus</i> , PWV-CL	U67149	Sokhandan <i>et al.</i> , 1997
<i>Passionfruit woodiness virus</i> , PWV-SD	U97150	Sokhandan <i>et al.</i> , 1997
<i>Passionfruit woodiness virus</i> , PWV-Queensland	AJ430527	Sokhandan <i>et al.</i> , 1997
<i>South African passiflora virus</i> , SAPV	D10053	Brand <i>et al.</i> , 1993
<i>Soybean mosaic virus</i> , SMV	AJ628753	Benschler <i>et al.</i> , 1996
<i>Telosma mosaic virus</i> , TeMV	YP001816835	Ha <i>et al.</i> , 2008
<i>Trycyrtis potyvirus</i>	AY864850	Ha <i>et al.</i> , 2008

SY2 -----SGKIDVDAGNTGKD-----KKKEGEQ-----PKNP-----NSEKVA AISDKDVGSSSKGRIVPRLQKITKKMNLPMVKGKVID 70
 YP001816835-TeMVCP -----SSKVDDVDAGNSNKD-----KKKGVES-----SQSP-----KEDKTVIIPDKDVGNSKGRIVPRLQKITKKMNLPMVKGKVID 70
 AY864850-TricyrtisCP -----SGTGVEGIDAGVDSRK-----KKQVEES-----SKNV-----AEPEI IDHREPDVNVGTKGKVVPRQLQKITKKMNLPMVKGSVILN 72
 YP001974419-FVYCP -----SGSGEVGALDAGTDSRK-----KKQSEGD-----PILI-----GDPSTTKQHEPDINVGTGKRVVPRQLQKITKKMNLPMVKGNVILN 72
 AJ628753-SMVCP -----SGKETGEDLDAGKETKKNTTNEKGDKSQNTQN-----TQNG-----KGTSSGNKDKDINVGSKGKVVPRQLQKITKKMNLPMVGGKIILN 80
 NC003397-BCMVCP -----SGTGQPQPIVDAGVDAGK---DKRERNNRGKE-----PENREGSGNNSRGAGDSTMRDKDVNAGSKGKVVPRQLQKITKKMNLPMVKGNVILN 85
 AY575773-BLCMVCP -----SGTGQPQPIVDAGVDAGK---DKRERSNRGKD-----PEGREGSVNNNRGAGDSTMRDKDVNAGSKGKVVPRQLQKITKKMNLPMVKGNVILN 85
 Y11775-PstVCP -----SGSSTTQSPVLDAGVDTAK---DNKEKSNKGKG-----PESSESGSNKSRGTENQSMRDKDVNAGSKGKIVPRLQKITKKMNLPMVKGNVILN 85
 AB012663-ABMVCP -----SGTNQSSTPVVDAGVDAGK---DKKEKSNKGKG-----PESKEGSGDSSRGAENSSMRDKDVNAGSKGRVVPRLQRI TRKMMPMVKGNMILN 85
 AJ430527-PWVQueenlandCP -----SNSGK-KDEI IDTGADGKK---VVSKKDTQDAG-----EVNK-----GKESVSGEKDKDVNAGSKGSGVPRQLQKITKKMNLPMVKGNMVLD 77
 AY461662-PWVAUSCP -----
 U67149-PWVCLNewSouthWalesCP --SGSMSGKDKDETLDAGGDGKR---STGKKA AEGSG-----GDSR-----KKSEEDTTQDKDVNAGSKGNVVPRLQKITKKMNLPMVKGNMILN 80
 U67150-PWVSDNewSouthWalesCP --SGSMSGKDKDETLDAGADGKR---STGKKA AEGSS-----GDSR-----RKSEEDTTQDKDVNAGSKGNVVPRLQKITKKMNLPMVKGNMILN 80
 AF022446-CerMVCP -----SVIKPGESGPESLDAGDGSQK-----KEKEKPT-----DQPQ-----QEVITPNRDKDVNVGSKGKVIPRLKKITKKMNLPTVKGNVILN 75
 AB361564-AmmimajusCP -----SSTVEQSAIDAGVDNKE-----GQDGG-----SKDK-----ALVASGVQDKDVGASSKQTI PRLHKITKKMNLPTVKGVILN 69
 AF208662-PWVTaiwanCP TKSEDDKEELGKNAIDAGNDGKR-----KDKEKE---RMVTPPTNPKNNSSEFG-GSSFNRKDRDVDAGSKGKMPRLQKITKKMNLPTVKGRVILN 88
 D85849-PWVAOJAPANCP TKSEENKDELGKDAIDAGNDGKR-----KDKEKE---GMVTPPTNPNNKFG-GSSFNRKDRDVDAGSKGKMPRLQKITKKMNLPTVKGRAILD 88
 AB185021-PWVIBJAPANCP SSTGKDKKEESKDTIDAGGDGGR-----KDKEKEKRTGTLATLENPNPINPNGGDGSSSLGR-DKDVNAGSKGRVVPRLQKITKKMNLPTVKGRVILN 91
 NP660175-BCMNVCP -----SSKKEEEKDAGADERE-----KDKGKGP-----ADKDVGAGSKGKVVPRQLQKITKKMNLPMVGGRMILN 59
 D10053-SAPVCP -----SGRKQEELDAGKDKEK-----TKEGEEQS-----TQQKQ-----TKDKGTKETERDVATSSSGQLVPRLQKITKKMNLPMVAGKVID 73
 AY433950-CABMVSPCP -----SDGKDKGLDAGKDKEK-----DKEGKEQS-----VQQKQ-----AKNKGTKETERDVATSSSGQLVPRLQKITKKMNLPMVAGRVLLN 73
 AF348210-CABMVzimCP -----SDERQKELDAGKDKDK-----AKEAREQS-----TQQKQ-----AKNKGAKETERDVAASSSGQLVPRLQKITKKMNLPMVAGRLILN 73
 AF083558-CABMVMorCP -----SGRRQEEVDAGQDKDK-----GKENAEQP-----TQQK-----TKKKGVNETERDVAASSSGQLVPRLQKITKKMNLPMVAGKVID 72

ภาพที่ 15 ลำดับกรดอะมิโนของ Coat protein ของเชื้อไวรัสในจีนัส *Potyvirus* 22 ชนิด ที่มีรายงานว่าพบในเสาวรสและพืชอื่นบางชนิดเปรียบเทียบกับ
 ไวรัสจากเสาวรสไอโซเลต SY2 ทำการวิเคราะห์แบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW

```

SY2 LDHLLIDYKPNQTDWFNTRATKKHFDLSYNAVKT EYELDDVQMNVMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWVMDGDEQIEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 170
YP001816835-TeMVCP LDHLLIDYKPNQTDLFNTRATKQFDSWYNAVKT EYELDDAQMNVMNGFMVWCIENGTSPDINGVWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 170
AY864850-TricyrtisCP LDHLLIEYKPNQTDLFNTRATRKQFESWYVAVKNEYELDDAQMGIVMNGFMVWCVDNGTSPDINGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDA 172
YP001974419-FVYCP LDHLLIEYKPNQTDLFNTRATRTQFESWYTAVKNEYELDESQMGVVMNGFMVWCIENGTSPDMNGVWVMDGDEQVEYPLKPMVNAKPTLRQIMHHFSDA 172
AJ628753-SMVCP LDHLLIEYKPNQVDFNTRATKTQFTAWYNAVKA EYELDEQMGVVMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDA 180
NC003397-BCMVC LDHLLDYKPEQTDLFNTRATKMQFEMWYNAVKG EYELDDAQMSIVMNGFMVWCIENGTSPDVNGTWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 185
AY575773-BLCMVCP LDHLLDYKPEQTDLFNTRATKMQFEMWYNAVKG EYELDDAQMSIVMNGFMVWCIENGTSPDVNGTWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 185
Y11775-PstVCP LDHLLDYKPEQTDLFNTRATKMQFEMWYNAVKG EYELDDAQMSIVMNGFMVWCIENGTSPDVNGTWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 185
AB012663-ABMVCP LDHLLDYKPEQTDLFNTRATKMQFEMWYNAVKE EYELDDAQMSIVMNGFMVWCIENGTSPDVNGTWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 185
AJ430527-PWVQueenlandCP LDHLLIEYKPDQTKLFNTRATDAQFAAWYEGVK AEYELSDDQMGVIMNGFMVWCIENGTSPDINGVWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 177
AY461662-PWVAUSCP -----TSPDINGVWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 43
U67149-PWVCLCP LEHLLIEYKPEQTKLFNTRATDAQFSAWYDAVK EYELTDDQMGVVMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 180
U67150-PWVSDCP LEHLLIEYKPEQTKLFNTRATDAQFSAWYDAVK EYELTDDQMGVVMNGFMVWCIENGTSPDINGVWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 180
AF022446-CerMVCP LDHLLIEYKPEQTDLFNTRATKQFESWYNAV KNEYELDDQMGVVMNGFMVWCIENGTSPDITGSWVMDGDEQVEYPLKPMIENAKPTLRQVMMHHFSDA 175
AB361564-AmmimajusCP IDHLLIEYKPTQTDLFNTRATKQFESWYNAI QREYELTDEQMSVIMNGFMVWCIENGTSPDINGVWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQIMHHFSDA 169
AF208662-PWVTaiwanCP LDHLLIEYAPNQVDFNTRATKQFESWYSAVQR EYELDDNQMSVIMNGFMVWCIENGTSPNVNGTWVMDGDEQVEYPLKPLVNAQPTLRQIMHHFSDA 188
D85849-PWVAOJAPANCP LDHLLIEYAPNQVDFNTRATKQFESWYSAVQR EYELDDNQMSVIMNGFMVWCIENGTSPNVNGTWVMDGDEQVEYPLKPLVNAQPTLRQIMHHFSDA 188
AB185021-PWVIBJAPANCP LDHLLIEYAPNQVDFNTRATKQFESWYSAVQR EYELDDNQMSVIMNGFMVWCIENGTSPNVNGTWVMDGDEQVEYPLKPLVNAQPTLRQIMHHFSDA 191
NP660175-BCMNVCP LDHLLIEYKPKQTDLYNTRATKAQFERWYEA VKTEYELDDQMGVVMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWVMDGDEQVEYPLKPMVENAKPTLRQVMMHHFSDA 159
D10053-SAPVCP LTHLLIEYKPAQIDLYNTRASKTQFNKWF EAIKEEYELDDDKMGVIMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDA 173
AY433950-CABMVSPCP LDHLLIEYKPAQIDLYNTRASKTQLSKWF -AI KEEYELDDDKMGVIMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDA 172
AF348210-CABMVzimCP IDHLLIEYKPKQIDLYNTRASKAQNWF EAVKKEEYELDDDKMSVIMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQVMMHHFSDA 173
AF083558-CABVMorCP LNHLIEYKPAQIDLYNTRASRAQFSKWYAAI KEEYELDDDKMAVIMNGFMVWCIENGTSPDVNGVWVMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMHHFSDA 172
***:.:* *.****: *.*:****: *.****:*****

```

ภาพที่ 15 (ต่อ) ลำดับกรดอะมิโนของ Coat protein ของเชื้อไวรัสในจีนัส *Potyvirus* 22 ชนิด ที่มีรายงานว่าพบในเสาวรสและพืชอื่นบางชนิดเปรียบเทียบกับไวรัสจากเสาวรสไอโซเลต SY2 ทำการวิเคราะห์แบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW (สัญลักษณ์ * ระบุชนิดกรดอะมิโนที่เหมือนกัน)

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีน Coat protein ของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่าง
จุดเหลือง SY2 กับ เชื้อ *Potyvirus* ชนิดอื่น ใช้โปรแกรม ClustalW ในการวิเคราะห์

ชนิดของเชื้อ	พืชอาศัย	ประเทศที่พบ	ระดับความเหมือน (% identity)
SY2	เสาวรส	ไทย	100
TeMV	ขจร	เวียดนาม	87
PWV-AUS	เสาวรส	ออสเตรเลีย	82
<i>Tricyrtis Potyvirus</i>	ไม้ดอก	สหรัฐอเมริกา	75
BCMV	ถั่วแขก	สหรัฐอเมริกา	73
BICMV	ยาสูบ	ไต้หวัน	73
BCMV	ยาสูบ	จีน	72
ABMV	ถั่วอะซูกิ	ญี่ปุ่น	72
<i>Ammi majus latent virus</i>	ไวท์เลซ	บราซิล	72
PStV	ถั่วลิสง	ออสเตรเลีย	72
PWV-AO	เสาวรส	ญี่ปุ่น	71
PWV-Taiwan	เสาวรส	ไต้หวัน	71
SMV	ถั่วเหลือง	สหรัฐอเมริกา	71
PWV-IB	เสาวรส	ญี่ปุ่น	70
FVY	ไม้ดอก	จีน	70
CerMV	กล้วยไม้	สหรัฐอเมริกา	70
CABMV- Mor	ยาสูบ	โมร็อกโก	70
PWV-IB	เสาวรส	ญี่ปุ่น	70
SAPV	เสาวรส	แอฟริกา	69
PWV-CL	เสาวรส	ออสเตรเลีย	69
PWV-SD	เสาวรส	ออสเตรเลีย	69
PWV-Queensland	เสาวรส	ออสเตรเลีย	69
CABMV-SP	เสาวรส	แอฟริกา	67
CABMV- Zim	ยาสูบ	ซิมบับเว	66

7. ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3'UTR

ผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' UTR ส่วนที่ไม่แปลรหัสบางส่วนจำนวน 111 นิวคลีโอไทด์ เปรียบเทียบกับเชื้อไวรัส 12 ชนิดที่มีรายงานข้อมูลบริเวณ 3' UTR พบว่าเหมือนกับเชื้อ TeMV มากที่สุดที่ระดับ 81เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ FVY 71-72 เปอร์เซ็นต์ CABMV 72 เปอร์เซ็นต์ และ BCMV 72 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 16 และตารางที่ 7) นอกจากนี้พบลำดับกรดอะมิโน AGTGTGGTTATACCA ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ในส่วน 3'UTR สอดคล้องกับรายงานของ Abdullah และคณะ (2009) ที่ได้ศึกษาเชื้อ *Malasian Passiflora virus* (MPV) ที่เข้าทำลายเสาวรศ และพบลำดับดังกล่าวในส่วนของ 3'UTR 2 ตำแหน่ง

ดังนั้นผลการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของไวรัสไอโซเลท SY2 เสาวรศ เปรียบเทียบกับไวรัสชนิดอื่นที่ใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่า SY2 เป็น strain ที่ใกล้ชิดกับ TeMV ที่พบในประเทศเวียดนาม และอาจจัดเป็นไวรัสชนิดเดียวกันได้โดยใช้เกณฑ์การจำแนกชนิดที่เสนอโดย Adam และคณะ (2005) ซึ่งศึกษาพบว่าการจำแนกชนิดของจีโนม *Potyvirus* ด้วยข้อมูลนิวคลีโอไทด์ส่วนของ 3'UTR ใช้เกณฑ์ประมาณ 71 เปอร์เซ็นต์ ของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกันเป็นสปีชีส์เดียวกัน ส่วนยีน NIB และ CP ของสปีชีส์เดียวกันใช้เกณฑ์ที่ระดับ 76.6 และ 78 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

AF022442CerMV3UTR	GGACCC TTC---AGTGTGAATTGGTC-ACGAGTATTG-CCGAGGTTTGACAATGTTTGTGTGCCAAAAAAAA-----	253
AY461662PWVAUS3UTR	GGAGCTTTC---AGAGTGATTACATC-ACGTGCACTGTCCGAGGTACGGCAATGTTTATCGTTCC-----	249
AJ310200SMV3UTR	GGAGCCCTTCTA-AGAGTGATTTTATC-ACG--TAGTGGCCGAGGTACGGCAATGCTTGTGTGCC-----	249
AB127934WMV3UTR	GGAGTTGTTTGTAGTGTGATTTTCATC-ACGGTTAATAGCCGAGGTACGGTAATGTTTGTGTGCCA-----	252
AY864850Tricyrtis3UTR	GGAGTTTTTC---AGAGTGGTTACACC-ATGCGTATACACCGAGGCACGGCAATGCTTGTGTGCCA-----	251
AM039800FVY3UTR	GGAGCTTTC---AGAGTGATTAAGTC-ACGCGCCCTTCCGAGACCCGGCAATTTTTGTGTGCTT-----	247
AB185021EAPV3UTR	GGAGCTTTC---AGAGTGGGT-CACCCACGCGCACTGACCGAGGTTTGGCAATGTTTGTGTGCCT-----	254
AF208662PWVTaiwan3UTR	GGAGCTTTC---AGAGTGGATGCTTCCACGTGTACTGTCCGAGGTTTGGCAACGTTTGTGTGCCT-----	255
DQ925424BCMVVEITNAM3UTR	GAGGGCATGC--AGAGTGATTTGATC-ATGCGTCATGAGGTAGCTACGGCAATGTTTGTGTGCC-----	253
U72204CABMV3UTR	GAGGGCATGC--AGAGTGATTTAATC-ATGCGTCATGAGGTAGCCACGGCAATGTTTGTGTGCCAAAAAAAAAAAAAAAA-----	273
Y11772PStv3UTR	-----	
SY23UTR	-----	
DQ851493TeMV3UTR	GAGCTCTTGT--AGAGAGGTCACACCTCCA---ATAGAGTAATGTGCCTTAATGTTTGTGTGCC-----	252

ภาพที่ 16 (ต่อ) ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ 3' UTR ของเชื้อ *Potyvirus* 12 ชนิด ที่มีรายงานว่าเข้าทำลายในเสาวรสและพืชอื่นเปรียบเทียบกับเสาวรส SY2 จำนวน 111 นิวคลีโอไทด์ (เป็นข้อมูลบางส่วน) ทำการวิเคราะห์แบบ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม ClustalW (สัญลักษณ์ * ระบุชนิดนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน)

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 111 นิวคลีโอไทด์ บริเวณ 3' UTR บางส่วนของเชื้อไวรัส SY2 สาเหตุโรคใบด่างจุดเหลือง SY2 กับ เชื้อ *Potyvirus* อื่นที่เข้าทำลายเสาวรสและพืชอื่นรวม 12 ชนิดวิเคราะห์ความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม ClustalW

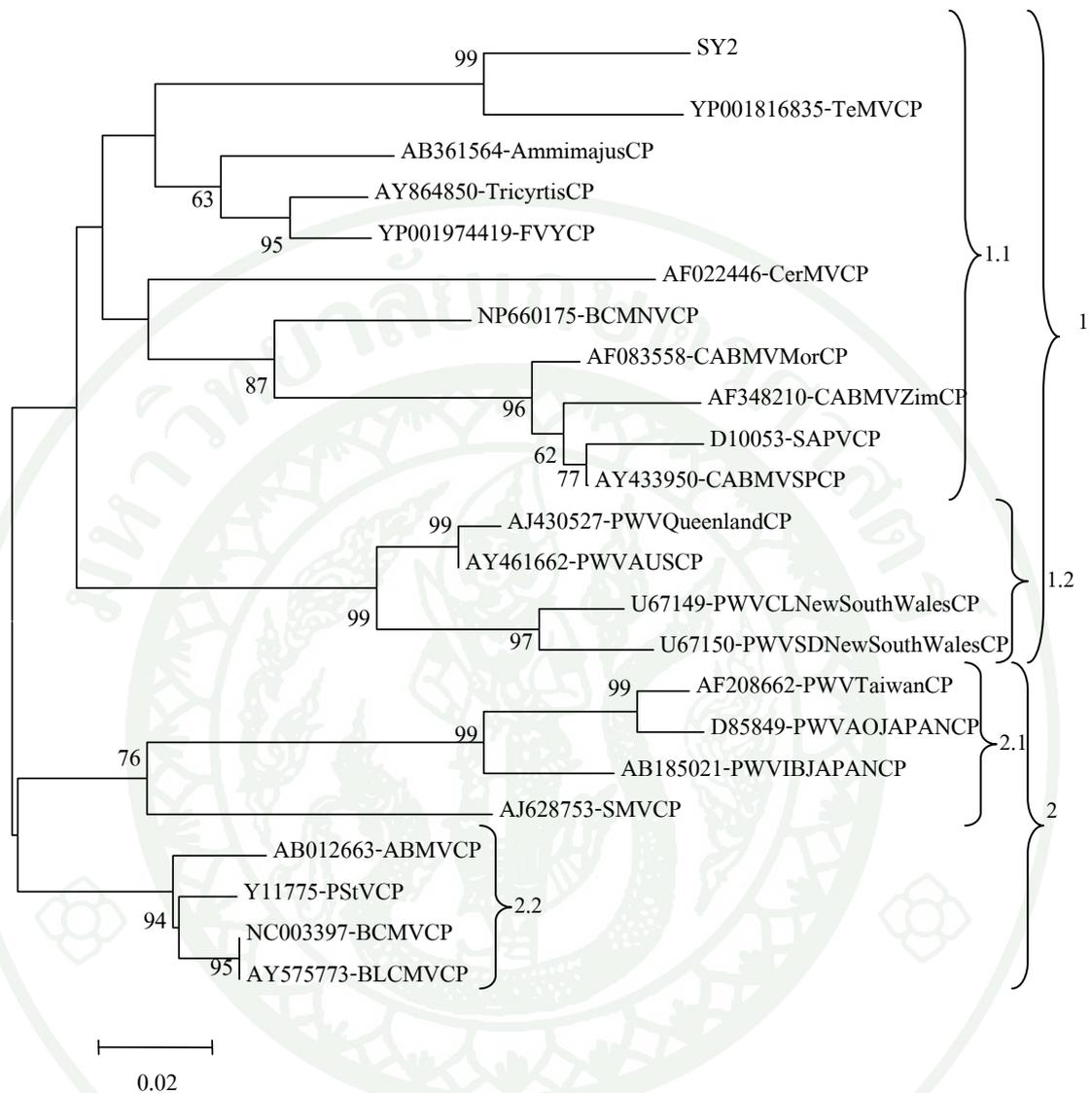
ไวรัส	พืชอาศัย	ประเทศที่พบ	ระดับความเหมือน (% identity)
SY 2	เสาวรส	ไทย	100
<i>Telosma mosaic virus</i> , TeMV	ดอกขจร	เวียดนาม	81
<i>Bean common mosaic virus</i> , BCMV	ยาสูบ	จีน	72
<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i> , CABMV	ถั่วฝักยาว	ไทย	72
<i>Fritillary virus Y</i> , FVY	ไม้ดอก	จีน	71
<i>Ceratobium mosaic potyvirus</i> , CerMV	กล้วยไม้	สหรัฐอเมริกา	70
<i>Soybean mosaic virus</i> , SMV	ถั่วเหลือง	จีน	69
<i>Peanut stripe virus</i> , PStV	ถั่วลิสง	ออสเตรเลีย	69
<i>Passionfruit woodiness virus</i> , PWV-Taiwan	เสาวรส	ไต้หวัน	67
<i>East Asian Passiflora virus</i> , EAPV	เสาวรส	ญี่ปุ่น	67
<i>Tricyrtis Potyvirus</i>	ไม้ดอก	สหรัฐอเมริกา	67
<i>Passionfruit woodiness virus</i> , PWV-AUS	เสาวรส	ออสเตรเลีย	63

8. การศึกษา Phylogenetic tree ของไวรัสไอโซเลต SY2

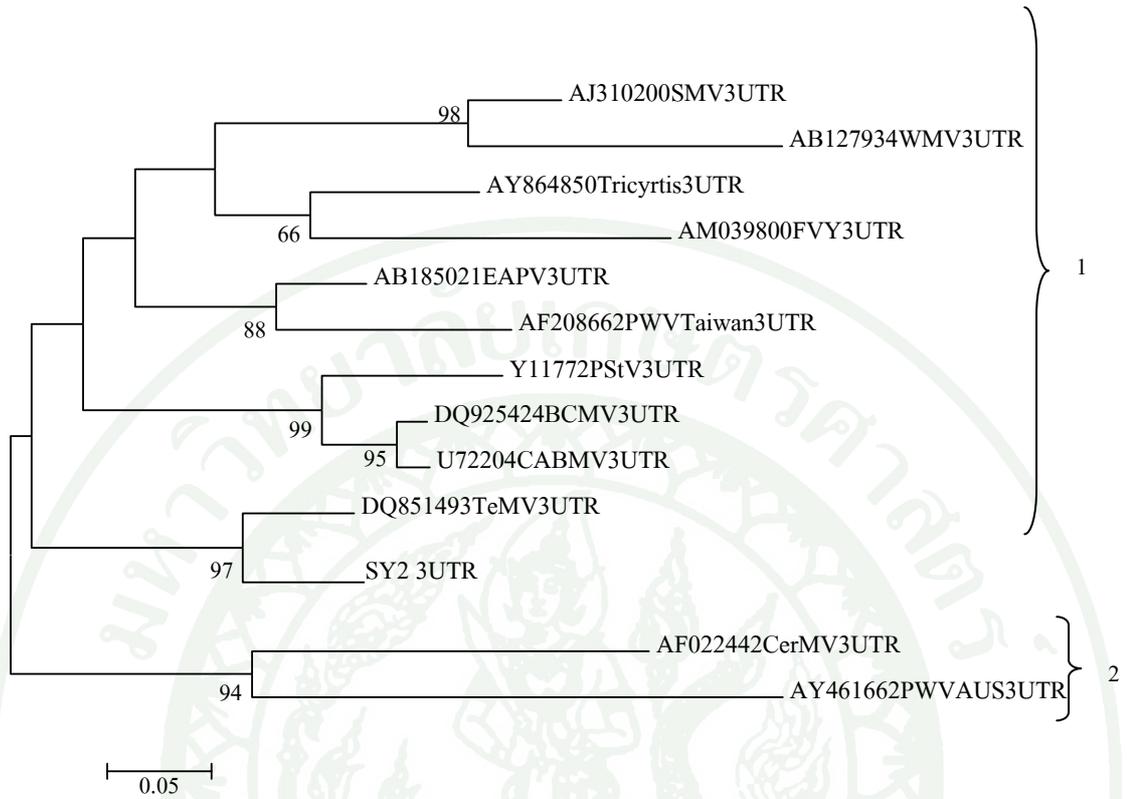
Phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นจากลำดับกรดอะมิโนของยีน Coat protein แสดงให้เห็นว่าไวรัสทั้ง 23 ชนิดที่ศึกษาแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (cluster) กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยไอโซเลต SY2 จากเสาวรชของไทย, TeMV จากเวียดนาม, *Ammimajus latent virus* จากบราซิล, *Tricyrtis Potyvirus* จากสหรัฐอเมริกา, FVY จากจีน, CABMV จากโมร็อกโก, ซิมบับเว และแอฟริกา และ PWV จากแอฟริกาใต้ และออสเตรเลีย กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย PWV จากญี่ปุ่นและไต้หวัน, SMV สหรัฐอเมริกา, BCMV จากจีน, BICMV จากไต้หวัน, PSiV จากออสเตรเลีย และ ABMV จากญี่ปุ่น (ภาพที่ 17)

เมื่อศึกษาสายสัมพันธ์ของไวรัสในกลุ่มที่ 1 พบว่าแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยเชื้อไอโซเลต SY2 จัดอยู่ใกล้ชิดกับ TeMV มากที่สุดและจัดอยู่ใน กลุ่มย่อยที่ 1.1 สำหรับกลุ่มย่อยที่ 1.2 ประกอบด้วย PWV ไอโซเลตที่พบในประเทศออสเตรเลีย และไวรัสในพืชตระกูลถั่ว กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของเชื้อ PWV ที่พบในญี่ปุ่นและไต้หวัน และแยกเป็นกลุ่มย่อยออกจากเชื้อ SMV ที่พบในพืชตระกูลถั่ว กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วย BCMV, BICMV, PSiV และ ABMV (ภาพที่ 17)

สำหรับแผนภูมิต้นไม้ที่วิเคราะห์จากนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3'UTR ของไวรัส 12 ชนิด สามารถจัดแบ่ง *Potyvirus* เป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรกประกอบด้วย SMV, WMV, *Tricyrtis Potyvirus*, FVY, EAPV, PWV จากประเทศไต้หวัน, PSiV, BCMV จากประเทศจีน, CABMV, TeMV และ SY2 กลุ่มที่สองประกอบด้วย CerMV และ PWV-AUS จากประเทศออสเตรเลีย (ภาพที่ 18) เชื้อไอโซเลต SY2 จัดอยู่ใกล้ชิดกับ TeMV และแยกจากไวรัสชนิดอื่น นอกจากนี้ CerMV และ PWV-AUS มีความใกล้ชิดกันมากเช่นเดียวกัน และแยกออกจาก *Potyvirus* อื่นทั้งหมดที่ศึกษาจากการใช้ข้อมูลของบริเวณ 3' UTR พบว่าไวรัสชนิดที่มีความสัมพันธ์กันจับกันเป็นคู่ชัดเจนกว่าการใช้ข้อมูลกรดอะมิโนของ CP ในการวิเคราะห์ เช่นพบว่าไวรัสจากเสาวรชที่พบในไต้หวัน (PWV-Taiwan) และญี่ปุ่น (EAPV) จับคู่ใกล้ชิดกันเป็นต้น ดังนั้นการใช้ 3' UTR จึงเป็นอีกหนทางหนึ่งที่เหมาะสมกับการจำแนกชนิดของ *Potyvirus* ในเสาวรช

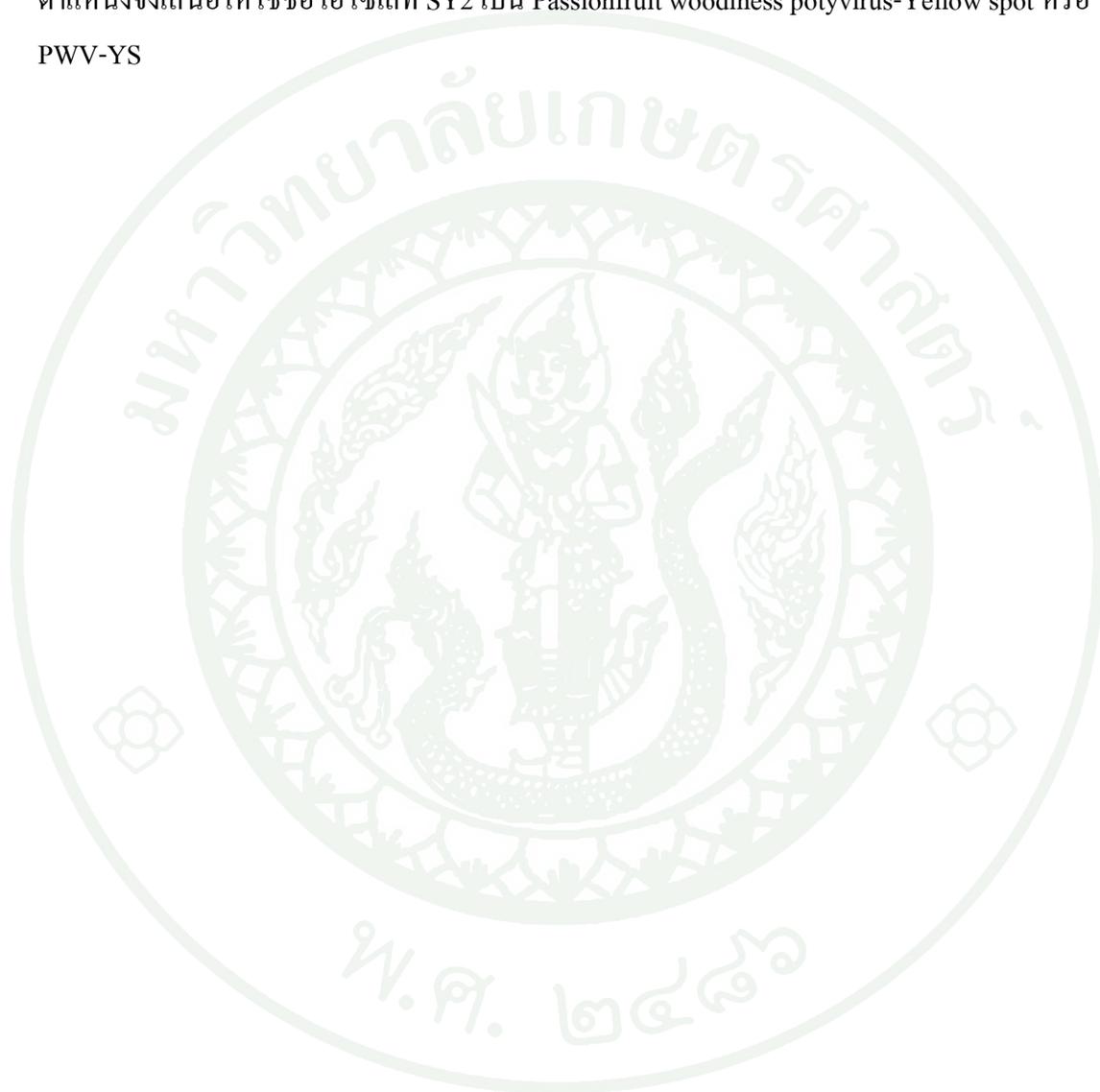


ภาพที่ 17 แผนภาพแบบต้นไม้ (Neighbor joining phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Potyvirus* ไอโซเลต SY2 ในเสาวรสมแม่พันธุ์ส้มวงเบอร์ 2 ไอโซเลต SY2 กับ *Potyvirus* อีก 22 ชนิด โดยวิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของ Coat protein ของไวรัสด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 ตัวเลขที่กำกับกิ่งย่อยในแผนภาพแสดงการวิเคราะห์ Bootstrap1000 replication



ภาพที่ 18 แผนภาพแบบต้นไม้ (Neighbor joining phylogenetic tree) แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ *Potyvirus* ไอโซเลต SY2 ในเสาวรสมแม่พันธุ์สีม่วงเบอร์ 2 ไอโซเลต SY2 กับ *Potyvirus* 12 ชนิด โดยวิเคราะห์จากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 3' UTR ที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0 ตัวเลขที่กำกับกิ่งย่อยในแผนภาพแสดงการวิเคราะห์ Bootstrap 1000 replication

จากการวิเคราะห์ระดับความคล้ายคลึงกันของกรดอะมิโนบนโปรตีน NIB และ CP พบว่า ไอโซเลท SY2 สัมพันธ์ใกล้ชิดกับ TeMV มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจจำแนกเป็นสปีชีส์เดียวกันได้ แต่เมื่อพิจารณาลำดับกรดอะมิโนบริเวณปลาย N-terminal ของ CP จำนวน 70 เรซิดิวซ์ พบว่ามีความแตกต่างจาก TeMV อย่างชัดเจน (ภาพที่ 15) โดยเรซิดิวซ์ที่ 1-35 พบว่าแตกต่างกัน 18 ตำแหน่งจึงเสนอให้ใช้ชื่อ ไอโซเลท SY2 เป็น Passionfruit woodiness potyvirus-Yellow spot หรือ PWV-YS



สรุปผลการทดลอง

ตัวอย่างเสาวรสที่แสดงอาการของโรค woodiness แยกกลุ่มตามลักษณะอาการได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 อาการใบหนาแข็ง ใบด่างเหลือง และใบจุดเหลือง กลุ่มที่ 2 อาการใบด่างสีเขียวเข้ม สลับสีเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยว และผิดปกติ เมื่อตรวจสอบไวรัสในใบเสาวรสด้วยเทคนิค DAC ELISA พบว่านำคั้นจากทุกตัวอย่างทำปฏิกิริยาได้กับแอนติซีรัมต่อเชื้อ PWV

การปลูกเชื้อไอโซเลท SY2 บนพืชทดสอบพบว่าบน *C. quinoa* เกิดแผลจุดสีเหลืองเฉพาะแห่งบน *C. amaranticolor* เกิดแผลจุดสีแดงเข้มตรงกลางสีเขียว และผลการปลูกเชื้อบนเสาวรสจากแผลจุดเฉพาะแห่งบนใบ *C. amaranticolor* ทำให้เสาวรสแสดงอาการใบด่างจุดเหลืองซึ่งได้คัดเลือกไอโซเลท SY2 มาศึกษา

การตรวจคุณสมบัติของอนุภาคไวรัสจากไอโซเลท SY2 พบอนุภาครูปท่อนยาวคด มีขนาดเฉลี่ย 11.3 x 642 นาโนเมตร เมื่อตรวจดูภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ใบเสาวรสที่เป็นโรคพบผลึกโปรตีน (Inclusion bodies) แบบ pinwheel, scroll และ tubular จำนวนมาก

อาการบนพืชอาศัยที่เกิดจากไอโซเลท SY2 ได้แก่ บนใบถั่วพุ่ม (*V. sinensis*) ถั่วฝักยาว (*V. sesquipedalis*) และถั่วขาว (*B. cylindrica*) พบอาการเส้นใบเหลืองที่ยอดใบ และแผลจุดเฉพาะแห่งสีน้ำตาลบนใบที่ปลูกเชื้อ บนใบถั่วแขกญี่ปุ่น (*P. vulgaris* cv. Yamashiro) พบอาการแผลจุดเฉพาะแห่งสีดำ และใบด่างเหลือง บนใบยาสูบ (*N. benthamiana*) พบอาการใบด่างเหลือง

การโคลนยีนของไวรัสไอโซเลท SY2 จากเสาวรสโดยใช้เทคนิค RT-PCR ในการเพิ่มปริมาณยีนพบว่ามีจำนวน 1,563 คู่เบส ประกอบด้วยยีน 3 ส่วนคือ ยีน Nib เป็นส่วนด้านปลาย 3', Coat protein ครบทั้งยีน และ 3'UTR ที่ไม่แปลรหัสมีเพียงบางส่วนมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ 630, 819 และ 111 คู่เบส ยีน Nib บางส่วน และ Coat protein แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 210 และ 272 เรซิดิวซ์ตามลำดับ

ในส่วนของยีน Nib พบลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ตำแหน่ง putative nucleic acid binding site (Q) และ metal ion binding site (GDD) และพบ cleavage site ของยีน CP เป็น Q/S นอกจากนี้พบลำดับกรดอะมิโน DAG ที่

ตำแหน่ง 9-11 Core protein จำนวน 234 เรซิดิวส์ รวมทั้งพบบริเวณที่เป็น Poty-coat superfamily และลำดับ LRQ-X₄₁-FDF ซึ่งเกี่ยวข้องกับ Encapsidation ของไวรัส

การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของ CP ของไอโซเลท SY2 กับไวรัสชนิดอื่นอีก 22 ชนิดพบว่ามีความเหมือนกับเชื้อ TeMV จากพืชและวัชพืชในประเทศเวียดนามมากที่สุดที่ระดับ 87 เปอร์เซ็นต์ และบริเวณ 3'UTR ส่วนที่ไม่แปลรหัสมีความเหมือนกับ TeMV มากที่สุดถึง 81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อวิเคราะห์ Phylogenetic tree จากลำดับกรดอะมิโน CP และลำดับนิวคลีโอไทด์ 3'UTR พบว่าไอโซเลท SY2 จับคู่ใกล้ชิดกับเชื้อ TeMV และอาจจัดเป็น species ที่ใกล้ชิดกันมาก และเมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนในช่วง 70 เรซิดิวส์จากปลาย N-terminal ของโปรตีน CP ของไอโซเลท SY2 กับเชื้ออื่นอีก 22 ชนิดพบว่ามีความแตกต่างกันค่อนข้างชัดเจนจึงตั้งชื่อไวรัส SY2 เป็น PWV-Yellow spot

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2530. การปลูกแพศชั้นฟรุต. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ. 4 หน้า.

กองพัฒนาเกษตรที่สูง. 2545. เสาวรสรับประทานสด. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ. 1-6 หน้า.

นุชนาด แซ่อึ้ง. 2538. ลักษณะทางโมเลกุลของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบด่างเหลืองถั่วฝักยาว.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 48
หน้า.

พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ, สิริภัทร์ พรหมฉี, ณรงค์ชัย พิพัฒน์ธนวงศ์, สุวรรณ กัดัดพันธุ์,
นุชนาด วารินทร์ และ อัจฉรา ภาวสุทธิ. 2549. การทดสอบต้นแม่พันธุ์เสาวรสร
รับประทานสดปราศจากไวรัส. รายงานผลงานวิจัยของมูลนิธิโครงการหลวง ประจำปี
2549 ฝ่ายวิจัยมูลนิธิโครงการหลวง 16-17 พฤศจิกายน 2549 จ.เชียงใหม่. หน้า 1-33.

Abdullah, N., I. Ismanizan, V. Pillai, R. Abdullah and S. A. Sharifudin. 2009. Nucleotide
sequence of the coat protein gene of the Malaysian Passiflora virus and its 3' non coding
region. **Am. J. Appl. Sci.** 6: 1633-1636.

Adams, M. J., J. F. Antoniw and C. M. Fauquet. 2005. Molecular criteria for genus and species
discrimination within the family *Potyviridae*. **Arch. Virol.** 150: 459-479.

Baker, C. A. and L. Jones. 2006. A New *Potyvirus* found in *Passiflora incence* in Florida.
Plant Dis. 91: 227.

Bensch, D., S. S. Pappu, C. L. Niblett, F. Agudelo, F. Morales, E. Hodson, E. Alvarez, O.
Acosta and R. F. Lee. 1996. A strain of *Soybean mosaic virus* infecting *Passiflora spp.*
in Colombia. **Plant Dis.** 80: 58-62.

- Brand, R. J., J. T. Burger and E. P. Rybicki. 1993. Cloning sequencing and expression in *Escherichia coli* of the coat protein gene of a new potyvirus infection South African Passiflora. **Arch. Virol.** 128: 29-41.
- Chagas, C. M., E. W. Kitajima and M. T. Lin. 1981. Severe disease of yellow passionfruit (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) in Bahia state, caused by an isolate of *Passionfruit woodiness virus* (in Portuguese). **Fitopatol. Bras.** 6: 259-268.
- Chang, C. A. 1992. Characterization and comparison of *Passionfruit mottle virus*, a newly recognized *Potyvirus* with *Passionfruit woodiness virus*. **Phytopathol.** 82: 1358-1363.
- _____, C. C. Chen, T. C. Deng and F. W. Zettler. 1996. Characterization of *Passionfruit crinkle potyvirus* a newly found virus infecting passionfruit. **Plant Prot. Bull.** 38: 339-354.
- Chen, J., J. Chen and M. J. Adam. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. **Arch. Virol.** 146: 757-766.
- Chen, J., H. Y. Zheng, Y. H. Shi, M. J. Adam, C. B. Wei, L. Lin and J. P. Chen. 2006. Detection and characterization of a second potyvirus from Thunberg, fritillary in China. **Arch. Virol.** 151: 439-447.
- Dassanayake, E. M. and R. G. T. Hicks. 1992. *Sri Lankan passion fruit mottle virus*, a *Potyvirus* infecting golden passion fruit in Sri Lanka. **Ann. Appl. Biol.** 20: 459-469.
- De Wijs, J.J. 1974. A virus causing ringspot of *Passiflora edulis* in the Ivory coast. **Ann. Appl. Biol.** 77: 33-40.

- Edwardson, J. R. and R. G. Christie. 1991. **The potyvirus group**. Volume II, University of Florida Agricultural Experiment Station. 696 pp.
- Fang, G.W., R. F. Allison., E.M. Zambolim, D.P. Maxwell and R. L. Gilbertson. 1995. The complete nucleotide sequence and genome organization of bean common mosaic virus (NL3 strain). **Virus Res.** 39: 13-23.
- Flasinski, S., U. B. Gunasinghe, R. A. Gonzales and B. G. Cassidy. 1995. The cDNA sequence and infectious transcripts of peanut stripe virus. **Plant Biology Division.** 171: 299-300.
- Gioria, R., J.A.M. Rezende and E.W. Kitajima. 2004. Biological, serological and molecular characterization of a strain of *Passion fruit woodiness virus* (PWV) inducing leaf mottling on some cucurbit species. **Phytopathol.** 30: 256-264.
- Ha, C., S. Coombs, P.A. Revill, R.M. Harding, M. Vu and J.L. Dale. 2008. Design and application of two novel degenerate primer pairs for the detection and complete genomic characterization of potyviruses. **Arch. Virol.** 153: 25-36.
- Irey, M., S. Adkins, F. L. Pierce, C. Baker and F.L. Gainesville. 2001. First report of a virus infection of *Ammi majus* in Florida. **Phytopathol.** 95: 46.
- Iwai, H., T. Ohmori, Y. Kurokawa, T. Muta and K. Arai. 1996. New record of *Passionfruit woodiness virus* in Japan. **Ann. Phytopathol. Soc. J.** 62: 459-465.
- _____, J. Sakai, K. Hanada and K. Arai. 1997. Nucleotide sequence of the coat protein gene and 3'-noncoding region of the *Passionfruit woodiness virus*-Amami Ohshima isolate. **Ann. Phytopathol. Soc. J.** 63: 475-478.

- _____, Y. Yamashita, N. Nishi and M. Nagamura. 2006. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-shima strain of *East Asian Passiflora potyvirus*. **Arch. Virol.** 151: 1457-1460.
- Jan, F. J. and S. D. Yeh. 1994. Purification, in situ localization and comparative serological properties of Passionfruit woodiness virus-encoded amorphous inclusion protein and two other virus proteins. **Phytopathol.** 85: 64-71.
- Kitajima, E. W., J. A. Rezende and J. C. Rodrigues. 2003. Passion fruit green spot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae) on passion fruit in Brazil. **Exp. Appl. Acarol.** 30(1-3): 225-231.
- Lovisol, O. and M. Conti. 1966. Identification of an aphid transmitted cowpea mosaic virus. **Neth. J. Pl. Path.** 72: 265-269.
- Mackenzie, A. M., M. Nolan, K. J. Wei, M. A. Clements, D. Gowanlock, B. J. Wallace and A. J. Gibbs. 1998. *Ceratobium mosaic potyvirus*: another virus from orchids. **Arch. Virol.** 143: 903-914.
- Manicom, B. 2003. **Diseases of fruit and vegetables.** Diagnosis and Management. Volume II. Klumer Academic Publisher. 436 pp.
- Melgarejo, A., M. T. Lehtonen, C. E. Fribourg, M. Rannali and J. P. T. Valkonen. 2007. Strains of BCMV and BCMNV characterized from lima bean plants affected by deforming mosaic disease in Peru. **Arch. Virol.** 152: 1941-1949.

McKern, N. M., D. D. Shukla, O. W. Barnett, H. J. Vetten, L. W. Whittaker and C. W. Ward. 1992. Coat protein properties suggest that *Azuki bean mosaic virus*, *Blackeye cowpea mosaic virus*, *Peanut stripe virus* and three isolates from soybean are all strains of the same *Potyvirus*. **Intervirology**. 33: 121-134.

_____, P. M. Strike, O. W. Barnett, J. Dijkstra, D. D. Shukla and C. W. Ward. 1994. *Cowpea aphid borne mosaic virus* Morocco and *South African passiflora virus* are strains of the same potyvirus. **Arch. Virol**. 136: 207-217.

McKnight, T. 1953. The woodiness virus of the passion vine (*Passiflora edulis Sims*) Qd. **J. Agric**. 10: 4-35.

Mlotshwa, S., J. Verver, I. Sithole-Niang,, T. Van Kampen, A. Van Kammen and J. Wellink. 2002. The genomic sequence of *Cowpea aphid-borne mosaic virus* and its similarities with other potyviruses. **Arch. Virol**. 147: 1043-1052.

Nascimento, A. V. S., E. N. Santana, A. S. K. Braz, P. F. Alfenas, G. Pio-Ribeiro, M. G. de Carvalho and F. Murilo Zerbini. 2006. *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. **Arch. Virol**. 151: 1797-1809.

Naqui, S. A. M. H. 2004. **Diseases of fruit and vegetables**. Diagnosis and Management Volume II. Klumer Academic Publisher. 289-290.

Oliveira, C. R. B., V. L. A. Marinho, F. S. Astolfi, M. Azevedo, C. M. Chagas and E. W. Kitajima. 1994. Purification, serology and some properties of the purple granadilla (*Passiflora edulis*) mosaic virus. **Fitopatol. Bras**. 19: 455-462.

- Parrella, G. and M. A. Castellano. 2002. Passiflora chlorotic spot a disease caused by a strain of Bean yellow mosaic virus in *Passiflora coerulea* in Italy. **J. Plant Pathol.** 84: 139-140.
- Roland, J.C. 1977. General preparation and staining of thin section. In Hall, J.L. edited. **Electron Microscopy and Cytochemistry of Plant Cells.** Elsevier/North Holland Biomedical Press, The Netherlands.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. **Molecular cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Santana, E. N., A. S. K. Braz, L. B. Torres, E. M. Zombolim and F. M. Zerbini. 1999. Molecular characterization of potyvirus isolate causing passion fruit woodiness in Brazil. **Virus Res.** 47: 153 pp.
- Shukla, D. D., N. M. McKern and C. W. Ward. 1988. Coat protein of *Potyriviruses* symptomatology, serology, and coat protein sequences of three strains of *Passionfruit woodiness virus*. **Arch. Virol.** 102: 221-232.
- Sokhandan, N., M. R. Gillings and J. W. Bowyer. 1997. Polymerase chain reaction detection and assessment of genetic variation in New South Wales strains of *Passionfruit woodiness potyvirus*. **Australasian Plant Pathol.** 26: 155-164.
- _____, M. J. Frenkel and C. W. Ward. 1991. Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region. **Can. J. Plant Pathol.** 13: 178-191.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Mol. Biol. Evol.** 24(8): 1596–1599.

- Taylor, R. H. and K. A. Kimble. 1964. Two unrelated viruses which cause woodiness of passionfruit (*Passiflora edulis* Sims). **Aust. J. Agric. Res.** 15: 560-570.
- Taylor, R. H. and R. S. Greber. 1973. Passion fruit woodiness virus. **Description of Plant Virus** no. 122.
- Teakle, D. S., C. C. Gill, R. H. Taylor and R. D. Raabe. 1963. Cucumber mosaic virus in *Passiflora* in California. **Plant Dis. Rept.** 47: 677-678.
- Trevisan, F. and B. M. J. Mendes. 2006. Resistant to *Passion fruit woodiness virus* in transgenic Passionflower Expressing the virus coat protein gene. **Plant Dis.** 90: 1026-1030.
- Van Regenmortel, M. H. V. and M. C. Dubs. 1993. Serological procedures. In: Matthew, REF, ED. **Diagnosis of Plant Virus Disease.** Boca Raton. FL. USA: CRC Press. 159-214.
- Yeh, S. D. and F. H. Chu. 1996. Production and evaluation of transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of *Passionfruit woodiness virus*. **Bot. Bull. Acad. Sin.** 37: 181-190.



การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

Thyptone	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	5	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121⁰C นาน 15 นาที

ถ้าเตรียม LB agar ให้เติม agar 15 กรัมต่อลิตร

2. 2xYT broth

Thyptone	16	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	5	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121⁰C นาน 15 นาที

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายสิทธิชัย บุญรอด
วัน เดือน ปี ที่เกิด	3 เมษายน พ.ศ. 2526
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2543 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนวชิรธรรมสาธิต จ. กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2547 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี พ.ศ. 2552 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พันธุวิศวกรรม) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

