



วิทยานิพนธ์

การโคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ของเชื้อ
Capsicum chlorosis virus สาเหตุโรคนยอดไหม้ของถั่วลิสง
ในประเทศไทย

**CLONING AND EXPRESSION OF NON-STRUCTURAL PROTEIN
(NSs) GENE OF CAPSICUM CHLOROSIS VIRUS CAUSING
PEANUT BUD NECROSIS IN THAILAND**

นายสุรศักดิ์ ชันคำ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การโคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* สาเหตุโรคนยอดไหม้ของถั่วลิสงในประเทศไทย

Cloning and Expression of Non-Structural Protein (NSs) Gene of *Capsicum chlorosis virus* Causing Peanut Bud Necrosis in Thailand

นามผู้วิจัย นายสุรศักดิ์ ชันคำ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เขียมสมบัติ, Dr.Agr.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ทิพย์วดี อรรถธรรม, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์รัชณี สงประยูร, Ph.D.)

ประธานสาขาวิชา

(รองศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครชนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจจงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การโคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus*
สาเหตุโรคนอดไหม้ของถั่วลิสงในประเทศไทย

Cloning and Expression of Non-Structural Protein (NSs) Gene of
Capsicum chlorosis virus Causing Peanut Bud Necrosis in Thailand

โดย

นายสุรศักดิ์ ชันคำ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2550

สุรศักดิ์ ขันคำ 2550: การโคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* สาเหตุโรคยอดค้ำของถั่วลิสงในประเทศไทย ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาการเกษตร การที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์พิศสุวรรณ เกียมสมบัติ, Dr.Agr. 88 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาวิเคราะห์ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน non-structural (NSs gene) ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ซึ่งเป็นไวรัสในสกุล *Tospovirus* และเป็นสาเหตุโรคใบและยอดค้ำของถั่วลิสง โคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ในสภาพปลอดดทลง โดยเก็บตัวอย่างถั่วลิสงจาก อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา (PPT) และจาก อ. เมือง จ. อุรธานี (PKK 2UD) นำมาตรวจวินิจฉัยโรคด้วยเทคนิค DAC-ELISA ออกแบบไพรเมอร์และสังเคราะห์ดีเอ็นเอของยีน NSs ด้วยเทคนิค Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) จากอาร์เอ็นเอต้นแบบที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อใบถั่วลิสงที่ติดเชื้อ CaCV โคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า ยีน NSs จากเชื้อ CaCV ที่ได้จากตัวอย่างถั่วลิสง PPT (NSs-PPT) และจากถั่วลิสง PKK 2UD (NSs-PKK 2UD) มีความยาว 1,320 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสได้เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 439 เรซิดิวส์ และมีน้ำหนักโมเลกุล 49.6 กิโลดาลตัน ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs จากเชื้อ CaCV ทั้งสองไอโซเลต ที่พบในถั่วลิสง มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 94% identity และคล้ายคลึงกับโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV-AIT จากมะเขือเทศในประเทศไทย, เชื้อ CaCV-CP จากถั่วลิสงในประเทศจีน และเชื้อ *Gloxinia tospovirus* จากประเทศสหรัฐอเมริกาที่ระดับ 85-90% identities นอกจากนี้ สามารถโคลนยีนโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (N gene) ของเชื้อ CaCV ในถั่วลิสง PPT ได้ครบสมบูรณ์ มีความยาว 828 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตัน และลำดับกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับโปรตีน N ของเชื้อ CaCV-PKK 2UD, CaCV-Pkk และ CaCV-ToK ที่ระดับ 97% identities โคลนยีน NSs จากเพลี้ยไฟชนิด *Scirtothrips dorsalis* ที่พบในแปลงปลูกถั่วลิสง PPT และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน พบว่าโปรตีน NSs จากเพลี้ยไฟ (NSs-TPT) มีความคล้ายคลึงกันกับโปรตีน NSs-PPT ที่ระดับ 96% identity สังเคราะห์โปรตีน NSs-PPT ด้วยระบบ pQE expression system ในเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้โปรตีนถูกผสม 6xHis-NSs น้ำหนักโมเลกุล 50 kDa มีความเข้มข้น 2.98 มก./มล. ผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน NSs-PPT (PAb-NSs) แล้วนำไปใช้ตรวจสอบเชื้อ CaCV ด้วยเทคนิค DAC-ELISA พบว่า PAb-NSs ทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับเชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-PKK ในถั่วลิสง โดยไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชที่ติดเชื้อทอสโปไวรัสชนิด *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) หรือเชื้อ *Melon yellow spot virus* (MYSV) แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ที่ผลิตได้ในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นประโยชน์ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อ CaCV แยกจากเชื้อทอสโปไวรัสชนิดอื่นได้อย่างชัดเจน

Surasak Khankhum 2007: Cloning and Expression of Non-Structural Protein (NSs) Gene of *Capsicum chlorosis virus* Causing Peanut Bud Necrosis in Thailand. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Assistant Professor Pissawan Chiemsombat, Dr. Agr. 88 pages.

A study on the non-structural protein (NSs) gene of *Capsicum chlorosis virus* (CaCV), the tospovirus that caused peanut bud necrosis disease, was conducted. The NSs genes were cloned and NSs protein was *in vitro* expressed. Infected peanut leaf samples collected from Pakthongchai district, Nakhonratchasima province (PPT) and from Muang district, Udon Thani province (PKK 2UD) were diagnosed for tospovirus infection by DAC-ELISA. Primers specific to NSs gene were designed and NSs genes were amplified by RT-PCR using total RNAs extracted from infected peanut leaf tissues as template. The cDNA fragments obtained were identified as NSs gene of CaCV and designated as NSs-PPT and NSs-PKK 2UD. Both NSs genes were composed of 1,320 nucleotides which coded for 439 amino acid residues with molecular weight of 49.6 kDa. Amino acid sequence analysis revealed that both NSs-CaCV from peanuts were 94% identity, and similar to those of CaCV-AIT from tomato in Thailand, CaCV-CP from peanut in China, and *Gloxinia tospovirus* from USA at 85-90% identities. In addition, the nucleoprotein (N) gene of CaCV-PPT was completely cloned and its amino acid sequence was analyzed. The N-PPT gene comprised of 828 nucleotides, coding for 275 amino acid residues with molecular weight of 30.5 kDa. Amino acid sequence analysis indicated that the N protein of CaCV-PPT isolate was similar to those of CaCV-PKK 2UD, CaCV-Pkk, and CaCV-ToK at 97% identities. Moreover, the NSs gene was successfully isolated from thrips vector; *Scirtothrips dorsalis*, collected from peanut field in Pakthongchai district and it showed 96% identity to NSs-PPT by amino acid sequence comparison. The cloned NSs-PPT gene was subsequently expressed *in vitro* by using pQE expression system in *E. coli* cell culture, yielding about 2.98 mg/ml of 50 kDa recombinant 6xHis-NSs polypeptide. The 6xHis-NSs protein was used as immunogen for producing polyclonal antibody in rabbit (PAb-NSs). By using DAC-ELISA technique, the PAb-NSs reacted specifically to CaCV-infected peanut leaf tissue without cross-reactivity to plant tissues infected by *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) or *Melon yellow spot virus* (MYSV). According to its specificity, PAb-NSs produced in this study could be used as immunoprobe for the detection and differentiation of CaCV from other species of tospovirus.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ผศ. ดร. พิศสุวรรณ เจริญสมบัติ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูงที่ให้โอกาสในการทำงานวิจัยด้านไวรัสโรคพิษ พร้อมทั้งประสิทธิประสาทความรู้ ให้คำแนะนำในการวิจัย ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณ ผศ. ดร. รัชณี ธงประยูร และ รศ. ดร. ทิพย์วดี อรรถธรรม กรรมการ เป็นอย่างสูงที่ให้ความรู้ ให้คำแนะนำในการวิจัย ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการวิจัย และขอขอบคุณ ดร. วีระพันธุ์ ศรีดอกจันทร์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย เป็นอย่างสูง ที่ให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เป็นอย่างสูงที่สนับสนุนทุนด้านการศึกษา ทุนวิจัย และห้องปฏิบัติการเพื่อการวิจัย ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สนับสนุนทุนการศึกษา

ขอขอบคุณ ดร. อรประไพ กชนันท์ ที่อนุเคราะห์แอนติบอดีในการวินิจฉัย และคุณเกื้อกุล บุญญานุกาพพงศ์ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างพืชเพื่อใช้วิจัย ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน ที่อนุเคราะห์โรงเรือนเพื่อการวิจัย และพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลือในการวิจัย การเก็บตัวอย่าง พร้อมทั้งให้กำลังใจในการศึกษา และการวิจัย ด้วยดีตลอดมา

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อเสาร์ คุณแม่มีมนวล ชันคำ น้องหญิง น้องก้อย และน้องโบว์ ครอบครัวที่แสนอบอุ่น ที่เสียสละสนับสนุนทุนด้านการศึกษา และให้กำลังใจเป็นอย่างดีตลอดระยะเวลาการศึกษา

ความดีทั้งหลายแห่งวิทยานิพนธ์ ขอมอบแต่ บิดา-มารดา ครู อาจารย์ทุกท่าน ที่อบรมสั่งสอน ประสิทธิประสาทความรู้ แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

สุรศักดิ์ ชันคำ
มีนาคม 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(8)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	20
ผลและวิจารณ์	33
สรุปผล	68
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	70
ภาคผนวก	82

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดเชื้อทอสโปไวรัส ซีโรกรุป การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ พืชอาศัย และ เพลี้ยไฟพาหะ	6
2	ชื่อย่อ accession number และซีโรกรุป ของเชื้อทอสโปไวรัส ที่ใช้วิเคราะห์ สายสัมพันธ์ และสร้าง phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของ โปรตีน NSs และ N	31
3	ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุป IV ในตัวอย่างใบถั่วลิสง ที่เก็บ จากแปลงเพาะปลูกของเกษตรกร อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา (PPT) และ ไอโซเลต PKK 2UD ด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยใช้แอนติบอดี PAb-A1 ที่ ความเจือจาง 1:1,000	35
4	ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุป IV ในตัวอย่างถั่วพุ่มที่ได้รับ การปลูกเชื้อทอสโปไวรัส ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยใช้ แอนติบอดี PAb-A1 ที่ความเจือจาง 1:1,000	36
5	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PKK 2UD และ CaCV-PPT กับ เชื้อทอสโปไวรัสชนิดอื่น ๆ	42
6	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PPT กับเชื้อทอสโปไวรัสชนิด อื่น ๆ	46
7	เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PPT กับเชื้อทอสโปไวรัส ที่พบในประเทศไทย	49
8	ค่าความเจือจางสูงสุด (dilution end point) ของแอนติบอดี PAb-NSs เมื่อใช้ โปรตีน 6xHis-NSs บริสุทธิ์ปริมาณ 3 µg/ml เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วย เทคนิค DAC-ELISA	56

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
9	ค่า DAC-ELISA ของการตรวจสอบเชื้อ CaCV ในน้ำคั้นใบถั่วลิสง (<i>Arachis hypogaea</i>) เชื้อ WSMoV ในน้ำคั้นใบแตงโม (<i>Citrullus lanatus</i>) และเชื้อ MYSV ในน้ำคั้นใบแคนตาลูป (<i>Cucumis melo</i>) เมื่อตรวจสอบด้วย แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 (PAb-NSs5) เปรียบเทียบกับแอนติบอดีต่อโปรตีน N	59

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างอนุภาคของเชื้อ <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV) เชื้อหุ้มมีไกลโคโปรตีน G_N/G_C ภายในประกอบด้วยโปรตีน RdRp (L) และอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวสามสายห่อหุ้มด้วยนิวคลีโอโปรตีน (N)	9
2	โครงสร้าง และการแสดงออกของสารพันธุกรรมของเชื้อ <i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	11
3	อาการโรคบนใบถั่วลิสง (<i>Arachis hypogaea</i>) สายพันธุ์ไทนาน 9 และใบถั่วพุ่ม (<i>Vigna sinensis</i>)	34
4	เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,320 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน NSs ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PKK 2UD และ CaCV-PPT ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ CaCV-NSsF และ CaCV-NSsR และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากใบถั่วลิสงเป็นต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis	39
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน NSs ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PKK 2UD และ CaCV-PPT ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNA star อักษรสีแดง คือ นิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน และสีน้ำเงิน คือ กรดอะมิโนที่ต่างกัน	40
6	เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 828 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน N ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PPT ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ CaCV-CP-NR2 และ 3'V Tospo gIV และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากใบถั่วลิสงเป็นต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis	44
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน N ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PPT	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
8	Neighbor-joining phylogenetic tree วิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs (ก) และ N (ข) ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PPT และ CaCV-PKK 2UD กับเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่น ๆ โดยโปรแกรม ClustalW คำนวณค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 replications โดยใช้โปรแกรม MEGA package version 3.1 และแสดงค่าที่กิ่งของ tree เลขโรมันแสดงเชื้อโรกรูป	48
9	Neighbor-joining phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PPT กับเชื้อทอสปอไวรัสไอโซเลตที่พบในประเทศไทย (Th) จีน (Ch) ออสเตรเลีย (Aus) สหรัฐอเมริกา (USA) และอินเดีย (Id) วิเคราะห์จากลำดับ กรดอะมิโนของโปรตีน N ด้วยโปรแกรม ClustalW คำนวณค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 replications โดยใช้โปรแกรม MEGA package version 3.1 และแสดงค่าที่กิ่งของ tree	50
10	ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน 6xHis-NSs ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ไอโซเลต CaCV-PPT เมื่อสกัดในสภาวะ native condition และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ตรวจสอบด้วย 12% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis	52
11	Calibration curve ที่สร้างขึ้นจากค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน (cm) และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (kDa) เมื่อแยกขนาดโปรตีนด้วย 12% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis และโปรตีน NSs เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 1.6 cm ซึ่งเทียบน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 50 kDa	53
12	Standard curve ที่สร้างขึ้นจากค่า Absorbance ที่ 595 nm ของโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น (ตั้งแต่ 1.25-10 $\mu\text{g/ml}$) วัดด้วยวิธี Bradford's เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ที่แยกให้บริสุทธิ์ ซึ่งวัดค่า Absorbance ได้ 0.169 คิดเป็นความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 2.987 $\mu\text{g/ml}$	54

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs (PAb-NSs) จากการเจาะเลือด 5 ครั้ง ใช้โปรตีน 6xHis-NSs ความเข้มข้น 3 µg/ml เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่า ELISA ที่ A ₄₀₅ หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที	57
14	กราฟแสดงค่า ELISA Titer ของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 (PAb-NSs5) เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs ในน้ำคั้นใบถั่วลิสงที่เป็นโรค (PPT) ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าที่ A ₄₀₅ หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที	58
15	กราฟแสดงปฏิกิริยาจำเพาะในการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 (PAb-NSs5) ตรวจเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> (CaCV) ในน้ำคั้นใบถั่วลิสงเปรียบเทียบกับแอนติบอดีต่อโปรตีน N โดยใช้เชื้อ <i>Watermelon silver mottle virus</i> (WSMoV) ในน้ำคั้นใบแตงโม และเชื้อ <i>Melon yellow spot virus</i> (MYSV) ในน้ำคั้นใบแคนตาลูป เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ วิเคราะห์ด้วย DAC-ELISA วัดค่าที่ A ₄₀₅ หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที	60
16	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟชนิด <i>Scirtothrips dorsalis</i>	62
17	สัณฐานวิทยาของเพลี้ยไฟ <i>Scirtothrips dorsalis</i> ที่เก็บจากแปลงปลูกถั่วลิสงใน อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา และลักษณะสำคัญทางที่ใช้จำแนกชนิด	63
18	เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,320 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน NSs ของเชื้อ <i>Capsicum chlorosis virus</i> ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ CaCV-NSsF และ CaCV-NSsR และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากเพลี้ยไฟ 1 และ 5 ตัว เป็นต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

- 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus*, CaCV ที่พบในถั่วลิสง PPT และในเพลี้ยไฟ TPT เปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม DNA star อักษรสีแดง คือ นิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน และสีน้ำเงิน คือ กรดอะมิโนที่ต่างกัน

66

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A_{405}	=	Absorbance at 405 nanometre
A_{595}	=	Absorbance at 595 nanometre
A_{600}	=	Absorbance at 600 nanometre
BSA	=	Bovine serum albumin
dNTP	=	Deoxynucleotide tri-phosphate
<i>E. coli</i>	=	<i>Escherichia coli</i>
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
RNA	=	Ribonucleic acid
v/v	=	volume per volume
v/v/v	=	volume per volume per volume
w/v	=	weight per volume

การโคลนยีนและสังเคราะห์โปรตีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus*
สาเหตุโรคนอดไหม้ของถั่วลิสงในประเทศไทย

**Cloning and Expression of Non-Structural Protein (NSs) Gene of
Capsicum chlorosis virus Causing Peanut Bud Necrosis in Thailand**

คำนำ

เชื้อทอสโปไวรัส (tospovirus) เป็นไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สำคัญกลุ่มหนึ่งซึ่งสร้างความเสียหายอย่างมากต่อผลผลิตพืชหลายชนิด เชื้อไวรัสกลุ่มนี้มีพืชอาศัยกว้าง และส่วนใหญ่เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น มะเขือเทศ พริก แตงต่าง ๆ ถั่วลิสง ไม้ดอกไม้ประดับ เป็นต้น (German *et al.*, 1992; Prins and Kormelink, 1998) ในประเทศไทยมีรายงานการพบเชื้อทอสโปไวรัสที่จัดอยู่ในซีโรกรุป (serogroup) IV ได้แก่เชื้อ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) และ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) (โสภณ, 2536; โสภณ และ จุฑารัตน์, 2536; ปิยาภรณ์ และคณะ, 2548; Pongsapich and Chiemsombat, 2002) รวมถึงเชื้อ *Melon yellow spot virus* (MYSV) ซึ่งยังไม่ได้กำหนดซีโรกรุป (Warin *et al.*, 2005) เชื้อทอสโปไวรัสมีการระบาดอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีเพลี้ยไฟ (thrips) เป็นพาหะ พบว่าเพลี้ยไฟมากกว่า 10 ชนิด สามารถถ่ายทอดเชื้อทอสโปไวรัสและก่อให้เกิดโรคกับพืชอาศัยได้ (German *et al.*, 1992; Ullman *et al.*, 1993; Ullman *et al.*, 1995; Whitfield *et al.*, 2005) เพลี้ยไฟที่พบในแปลงเพาะปลูกพืชในประเทศไทย ได้แก่ ชนิด *Scirtothrips dorsalis*, *Caliothrips phaseoli*, *Megalurothrips usitatus*, *Thrips palmi*, *Frankliniella schultzei* และ *Ceratothripoides claratris* (โสภณ, 2536; โสภณ และ จุฑารัตน์, 2537; ปิยาภรณ์ และคณะ, 2548; Premachandra *et al.*, 2005) เพลี้ยไฟบางชนิดสามารถเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อทอสโปไวรัสได้มากกว่าหนึ่งชนิด และมีพืชอาศัยหลายชนิด จึงยากต่อการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อทอสโปไวรัส

ในด้านการก่อให้เกิดโรค มีการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่ไม่ใช่โปรตีนโครงสร้างของอนุภาคไวรัส ที่เรียกว่า non-structural protein (หรือโปรตีน NSs) ซึ่งสังเคราะห์จากรหัสพันธุกรรมบน S RNA ของเชื้อทอสโปไวรัส พบว่ามีการสะสมในลักษณะเป็น filamentous inclusion bodies อยู่ในเซลล์พืช และในร่างกายของเพลี้ยไฟพาหะ (Ullman *et al.*, 1993; Wijkamp *et al.*, 1993) โปรตีน NSs มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการ RNA silencing (RNA silencing suppressor) ที่เกิดขึ้นใน

ขณะที่เชื้อไวรัสเข้าทำลายพืช (Takeda *et al.*, 2002) นอกจากนี้อาจเกี่ยวกับความรุนแรงของอาการโรค (Okuda *et al.*, 2003) และอาจมีบทบาทเกี่ยวกับการจำลองอาร์เอ็นเอทั้งในพืช และเปลือกไฟฟ้ายา เพราะเนื่องจาก S RNA จะถูกจำลองทั้งสายก่อนที่จะมีการลอกรหัสส่วนของยีน NSs (Ullman *et al.*, 1993) จึงน่าสนใจที่จะนำยีนและโปรตีน NSs มาศึกษาด้านการก่อโรคและควบคุมโรค

ประสิทธิภาพของวิธีการตรวจสอบไวรัส จากชิ้นส่วนพืชที่แสดงอาการคล้ายติดเชื้อไวรัสนับว่ามีความสำคัญอย่างมากต่อการป้องกันการแพร่กระจายของโรค วิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสส่วนใหญ่มีเป้าหมายอยู่ที่โปรตีน โครงสร้างที่เป็นองค์ประกอบอนุภาค หรือตรวจสอบโปรตีนอื่นที่ไม่นำไปใช้เป็นโครงสร้างของอนุภาค ซึ่งสังเคราะห์ได้จากรหัสพันธุกรรมของไวรัส ในกรณีของเชื้อทอสปอไวรัสสามารถตรวจสอบเชื้อได้จากโปรตีน โครงสร้าง เช่น ไกลโคโปรตีนซึ่งเป็นโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มอนุภาค (glycoprotein หรือ G_N/G_C) และโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (nucleoprotein หรือ N) โดยใช้แอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะในระดับซีโรกรูปด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา เช่น enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งมีความรวดเร็ว และประหยัด หรือการตรวจสอบด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ซึ่งสามารถตรวจสอบชนิดของไวรัสได้ในระดับสปีชีส์ (species) โดยการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (N gene) เป็นประโยชน์ในการจัดจำแนกและศึกษาวิวัฒนาการของเชื้อทอสปอไวรัส (de Avila *et al.*, 1990, 1993; Heinze *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน N ในการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA มักเกิดปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) กับเชื้อในสกุลทอสปอไวรัสด้วยกัน เช่น เชื้อ WSMoV, CaCV หรือ *Calla lily chlorotic spot virus* (CCSV) ซึ่งจัดอยู่ในซีโรกรูป IV และเชื้อ MYSV (Bhunchoth *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005; Warin *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006b)

ปัจจุบันในประเทศไทย มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีน N และแอนติบอดีต่อโปรตีน N ตลอดจนวิธีการตรวจสอบเชื้อทอสปอไวรัสหลายชนิด รวมทั้งเชื้อ CaCV ที่เป็นสาเหตุของโรคกล้วยลิสง มะเขือเทศ และพริก ซึ่งเป็นเชื้อทอสปอไวรัสในซีโรกรูป IV แต่ยังไม่มีการศึกษาข้อมูลของยีนและโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV สาเหตุโรคยอดไหม้ของกล้วยลิสง การวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs ของเชื้อ CaCV ที่แยกได้จากกล้วยลิสง และวิเคราะห์สายสัมพันธ์กับเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่น ๆ ทำการสังเคราะห์โปรตีน NSs ในสภาพหลอดทดลอง เพื่อใช้เป็นแอนติเจนสำหรับผลิตแอนติบอดี และนำมาทดลองใช้ตรวจวินิจฉัย และจำแนกเชื้อ CaCV ในพืชที่เป็นโรค

วัตถุประสงค์

1. โคลนยีน และศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน non-structural protein (NSs) ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) สาเหตุโรคมอดไหม้ของถั่วลิสง
2. ศึกษาสายสัมพันธ์ของเชื้อ CaCV สาเหตุโรคมอดไหม้ของถั่วลิสง กับเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่น จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน NSs
3. สังเคราะห์โปรตีน NSs ในสภาพหลอดทดลอง และผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน NSs
4. ทดสอบความจำเพาะต่อการตรวจสอบเชื้อ CaCV ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ที่ผลิตได้
5. จำแนกชนิดเพลี้ยไฟจากแปลงเพาะปลูกถั่วลิสง ตรวจสอบ และศึกษาข้อมูลยีน NSs ที่แยกได้จากตัวเพลี้ยไฟ

การตรวจเอกสาร

1. ประวัติและการจัดจำแนกเชื้อทอสโปไวรัส

โรค spotted wilt ของมะเขือเทศ ซึ่งพบครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1915 ในประเทศออสเตรเลีย มีรายงานว่าเกิดการระบาดจากเพลี้ยไฟซึ่งเป็นพาหะนำโรค เมื่อมีการตรวจพิสูจน์จึงทราบว่าเชื้อไวรัสเป็นสาเหตุในการก่อให้เกิดโรค และเรียกชื่อว่า *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัส และจัดทอสโปไวรัสอยู่ในวงศ์ Bunyaviridae แต่เนื่องจากสามารถถ่ายทอดโดยเพลี้ยไฟจึงแยกออกเป็นสกุล (Genus) *Tospovirus* (Prins and Kormelink, 1998; Whitfield *et al.*, 2005) จากนั้นได้มีรายงานการค้นพบเชื้อ TSWV เพิ่มขึ้นในหลายประเทศ พร้อมกับรายงานพืชอาศัยที่มากขึ้นด้วย จึงมีการเรียกชื่อไวรัสแตกต่างกันออกไป เช่น *Tomato bronzing virus*, *Kromnek virus*, *Pineapple yellow potyvirus*, *Nakhorka tip chlorosis virus*, *Vira cabeca virus* เป็นต้น (Prins and Kormelink, 1998) การตั้งชื่อที่หลากหลายนี้เนื่องจากความแตกต่างของอาการโรค ไอโซเลตของเชื้อไวรัส พืชอาศัย และแหล่งที่พบ ปัจจุบันพบว่าเชื้อ TSWV มีพืชอาศัยทั้งใบเลี้ยงเดี่ยวและใบเลี้ยงคู่ โดยพืชอาศัยที่มีความอ่อนแอหลายชนิดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญ เช่น พริก ถั่วลิสง มันฝรั่ง ยาสูบ มะเขือเทศ ผักชนิดต่าง ๆ เช่น ขึ้นช่าย และผักกาดหอม ไม้ประดับ เช่น dahlia, gerbera, impatiens, chrysanthemum และ iris รวมทั้งวัชพืชอีกหลายชนิด (German *et al.*, 1992; Prins and Kormelink, 1998)

เดิมเชื้อ TSWV จัดจำแนกเป็นกลุ่มของไวรัสที่เข้าทำลายพืช เรียกว่ากลุ่ม tomato spotted wilt virus เมื่อมีการศึกษารายละเอียดทางชีวโมเลกุล เช่น ความคล้ายคลึงทางสัณฐานวิทยาของอนุภาค ลักษณะของสารพันธุกรรม และรูปแบบการสังเคราะห์โปรตีน (Elliott, 1990) จึงพบว่ามีความคล้ายคลึงโดยทั่วไปอยู่ในวงศ์ Bunyaviridae ซึ่งเป็นวงศ์ใหญ่ที่พบได้ทั่วโลก และจัดเป็นสกุลใหม่เรียกว่า *Tospovirus* เมื่อมีการใช้แอนติบอดีชนิด polyclonal และ monoclonal เพื่อตรวจสอบโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของเชื้อ TSWV ในพืชชนิดต่าง ๆ จึงพบว่าไวรัสชนิดนี้มีการเข้าทำลายอย่างกว้างขวาง (de Avila *et al.*, 1990) และมีการจัดกลุ่มของเชื้อทอสโปไวรัส โดย de Avila *et al.* (1993) ได้จัดจำแนกเชื้อทอสโปไวรัส ตามเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก และแยก *Impatiens necrotic spot virus* (TNSV) ออกจากเชื้อ TSWV เพราะมีพืชอาศัยจำพวกไม้ประดับ เช่น impatiens, gerbera, astroemeria และ cineraria และไม่พบในพืชพวก solanaceous crops (German *et al.*, 1992) ต่อมามีการจำแนกเชื้อไวรัสอีก 2 ชนิด คือ

Tomato chlorotic spot virus (TCSV) และ *Groundnut ringspot virus* (GRSV) (de Avila *et al.*, 1993) ซึ่งมีพีชอาศัยคล้ายคลึงกับเชื้อ TSWV อย่างมาก นอกจากนั้นการศึกษาลักษณะทางชีววิทยา การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ของสารพันธุกรรมของเชื้อทอสโปไวรัสที่เข้าทำลายแตงโมในประเทศไต้หวัน และญี่ปุ่น ทำให้พบเชื้อ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) เพิ่มขึ้นอีกชนิดหนึ่ง (Yeh and Chang, 1995) อย่างไรก็ตามการใช้ลักษณะทางซีรัมวิทยาก็ให้ผลไม่ชัดเจนนักในการจำแนกเชื้อ *Groundnut bud necrosis virus* (GBNV) (Reddy *et al.*, 1992; Satyanarayana *et al.*, 1996a)

ปัจจุบันเชื้อไวรัสในวงศ์ Bunyaviridae ประกอบด้วย 5 สกุล คือ *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* และ *Tospovirus* โดยเชื้อทอสโปไวรัสเป็นเพียงสกุลเดียวที่เข้าทำลายพืช ปัจจุบันจำแนกออกได้ 17 ชนิด ตามระดับความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (N) และ จัดแบ่งเป็น 6 ซีโรกรุป ตามคุณสมบัติทางซีรัมวิทยา (ตารางที่ 1) (Whitfield *et al.*, 2005)

เชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) มีรายงานว่าพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1999 ที่เมืองบันดาเบอร์ก รัฐควีนสแลนด์ ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งเข้าทำลายพริก และมะเขือเทศ (McMichael *et al.*, 2002) โดยระหว่างปี ค.ศ. 2001-2004 สร้างความเสียหายแก่ผลผลิตพริก (*Capsicum annuum*) ของเมืองบันดาเบอร์กกว่า 30-40 เปอร์เซ็นต์ (Jones and Sharman, 2005)

ในประเทศไทยพบการเข้าทำลายของเชื้อทอสโปไวรัสในมะเขือเทศครั้งแรกในปี พ.ศ. 2524 ที่ จ. เชียงใหม่ ต่อมาในปี พ.ศ. 2528 มีรายงานการพบเชื้อ GBNV (ปัจจุบันเรียก *Peanut bud necrosis virus*, PBNV) สาเหตุโรคยอดไหม้ถั่วลิสงใน จ. สกลนคร จากนั้นปี พ.ศ. 2531 มีการระบาดมากขึ้นในเขตเพาะปลูกถั่วลิสง จ. ลำปาง อุตรดิตถ์ และน่าน (โสภณ, 2536) ในช่วงปี 2545-2547 มีรายงานว่ามะเขือเทศในแปลงทดลองของสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย ใน จ. ปทุมธานี และมะเขือเทศใน จ. กาฬสินธุ์ แสดงอาการคล้ายเชื้อทอสโปไวรัสเข้าทำลาย เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา และเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก พบว่าเป็นเชื้อ CaCV (Bhunchoth *et al.*, 2005; Premachandra *et al.*, 2005) ในปัจจุบันเชื้อทอสโปไวรัสส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยจัดอยู่ในซีโรกรุป IV ได้แก่ เชื้อ WSMoV ในแตงโม มะเขือเทศ พริก แตงเทศ และบวบงู เชื้อ CaCV ในพริก มะเขือเทศ และถั่วลิสง และพบเชื้อ MYSV ในพืชตระกูลแตงหลายชนิด (Bhunchoth *et al.*, 2005; Warin *et al.*, 2005; วิมล และคณะ, 2547; ปิยาภรณ์ และคณะ, 2548)

ตารางที่ 1 ชนิดเชื้อทอสโปไวรัส ซีโรกรุป การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์ พืชอาศัย และเพลี้ยไฟพาหะ

ชนิดทอสโปไวรัส	ซีโรกรุป	การกระจายตัวทางภูมิศาสตร์	พืชอาศัย	เพลี้ยไฟพาหะ
<i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i>	I	ทั่วโลก	มากกว่า 800 ชนิด	<i>Frankliniella bispinosa</i> <i>F. fusca</i> <i>F. intonsa</i> <i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i> <i>Thrips palmi</i> <i>T. setosus</i> <i>T. tabaci</i>
<i>Tomato chlorotic spot virus (TCSV)</i>	II	บราซิล	มะเขือเทศ	<i>F. occidentalis</i> <i>F. intonsa</i> <i>F. schultzei</i>
<i>Groundnut ringspot virus (GRSV)</i>	II	แอฟริกาใต้ บราซิล อาเจนตินา	ถั่วลิสง มะเขือเทศ	<i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i>
<i>Impatiens necrotic spot virus (INSV)</i>	III	สหรัฐอเมริกา ยุโรป	impatiens, begonia, dahlia, gloxinia	<i>F. occidentalis</i>
<i>Watermelon silver mottle virus (WSMoV)</i>	IV	ญี่ปุ่น ไต้หวัน ไทย	แตงโม แตงกวา	<i>T. palmi</i> <i>Scirtothrips dorsalis</i>
<i>Groundnut bud necrosis virus (GBNV)</i>	IV	อินเดีย เอเชีย ตะวันออกเฉียงใต้	ถั่วลิสง	<i>T. palmi</i> <i>F. schultzei</i> <i>S. dorsalis</i>
<i>Capsicum chlorosis virus (CaCV)</i>	IV	ออสเตรเลีย ไทย	พริก ถั่วลิสง	<i>Ceratothripoides claratris</i>

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดทอสมโฟไวรัส	ซีโรกรุป	การกระจายตัวทาง ภูมิศาสตร์	พืชอาศัย	เพลี้ยไฟพาหะ
<i>Calla lily chlorotic spot virus (CCSV)</i>	IV	ไต้หวัน	Calla lily	-
<i>Iris yellow spot virus (IYSV)</i>	V	เนเธอร์แลนด์ อินเดีย	Iris	<i>T. tabaci</i>
<i>Peanut yellow spot virus (PYSV)</i>	VI	อินเดีย	ถั่วลิสง	<i>S. dorsalis</i>
<i>Melon spotted wilt virus (MSWV)</i>	-	ญี่ปุ่น	Melon	<i>T. palmi</i>
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus (CSNV)</i>	-	บราซิล	Chrysanthemum	<i>F. occidentalis</i> <i>F. schultzei</i>
<i>Zucchini lethal chlorotic virus (ZLCV)</i>	-	บราซิล	Zucchini	<i>F. zucchini</i>
<i>Peanut chlorotic fan spot virus (PCFV)</i>	-	ไต้หวัน	ถั่วลิสง	<i>S. dorsalis</i>
<i>Watermelon bud necrosis virus (WBNV)</i>	-	อินเดีย	บวบ	<i>T. palmi</i>
<i>Melon yellow spot virus (MYSV)</i>	-	ญี่ปุ่น ไทย	Melon แตงต่าง ๆ	<i>T. palmi</i>
<i>Tomato yellow ring virus (TYRV)</i>	-	อิหร่าน	มะเขือเทศ	-

ที่มา: Prins and Kormelink, 1998; Jain *et al.*, 1998; Satyanarayana *et al.*, 1998a; Lin *et al.*, 2005; Hanssani-Mehraban, 2005; Chiemsombat and Adkins, 2007

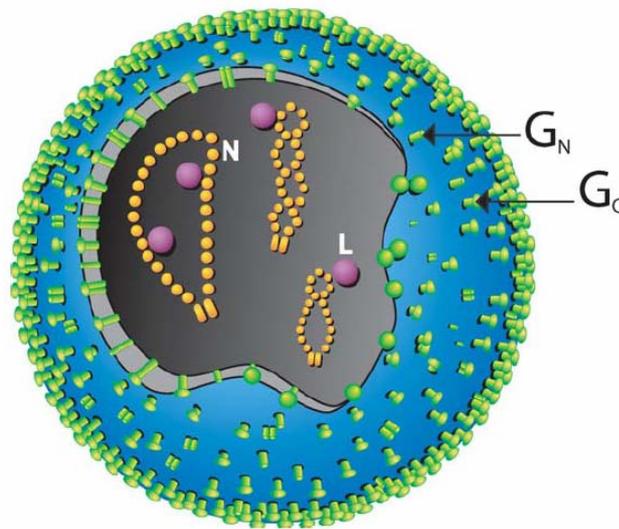
2. ผลกระทบทางเศรษฐกิจของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อทอสปอไวรัสและการควบคุมโรค

จากรายงานพบว่ามีพืชมากกว่า 800 ชนิด ใน 82 วงศ์ ที่เชื้อทอสปอไวรัสสามารถเข้าทำลายได้ โดยเฉพาะเชื้อ TSWV ที่มีรายงานว่าสร้างความเสียหายแก่พืชเกษตรที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ 10 อันดับแรก คิดเป็นมูลค่าทั่วโลกกว่า 1 ล้านล้านเหรียญสหรัฐ (Goldbach and Peters, 1994) โดยในรัฐจอร์เจีย ประเทศสหรัฐอเมริกา พบสร้างความเสียหายแก่ผลผลิตพริกและมะเขือเทศสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Gitaitis *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบเชื้อ PBNV สาเหตุโรคยอดไหม้ของถั่วลิสง ในประเทศอินเดีย (Reddy *et al.*, 1992) การระบาดของโรคมักพบมากในแถบภูมิประเทศเขตอบอุ่นซึ่งเหมาะแก่การแพร่กระจายของเพลี้ยไฟ (Prins and Kormelink, 1998) ซึ่งลำบากต่อการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อทอสปอไวรัส การควบคุมประชากรของเพลี้ยไฟ และการสร้างพืชสายพันธุ์ต้านทาน จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อทอสปอไวรัสได้ (Prins and Glodbach, 1998) อย่างไรก็ตาม การที่จะสามารถควบคุมการระบาดของเชื้อทอสปอไวรัสได้ ต้องอาศัยความรู้จากหลายสาขาทั้งด้านกีฏวิทยา นิเวศวิทยา และไวรัสวิทยา ตลอดจนทราบความสัมพันธ์ระหว่างเพลี้ยไฟ เชื้อทอสปอไวรัส และพืชอาศัย (Whitfield *et al.*, 2005)

3. องค์ประกอบของอนุภาคและสารพันธุกรรมของเชื้อทอสปอไวรัส

อนุภาคของเชื้อ WSMoV ซึ่งเป็น type species ของเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรุป IV มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 75-100 นาโนเมตร (Okuda *et al.*, 2002) และอนุภาคเชื้อ CaCV ห่อหุ้มด้วยเยื่อไขมันที่มีโปรตีนโครงสร้าง 2 ชนิด คือ โกลโคโปรตีน G_N และ G_C สารพันธุกรรมของเชื้อทอสปอไวรัสเป็นชนิดอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว มี 3 สาย คือ large RNA (L RNA) ขนาด 8,912 นิวคลีโอไทด์ medium RNA (M RNA) ขนาด 4,823 นิวคลีโอไทด์ และ small RNA (S RNA) ขนาด 3,477 นิวคลีโอไทด์ แต่ละสายมีนิวคลีโอไทด์ที่เป็นคู่สมกันทั้งทางด้านปลาย 5' และ 3' ยาวประมาณ 13-65 นิวคลีโอไทด์ (Knierim *et al.*, 2006) ทำให้เกิดโครงสร้างเป็นวงของสายอาร์เอ็นเอ (ภาพที่ 1) (Peters *et al.*, 1991; Whitfield *et al.*, 2005) แต่ปลายสายอาร์เอ็นเอทุกสายจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์จำนวน 8 นิวคลีโอไทด์ (3'-UCUCGUUA) สายพันธุกรรมของเชื้อทอสปอไวรัสประกอบด้วยยีน 5 ยีน ที่มีความจำเพาะต่อการสร้างโปรตีน 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ RNA-dependent RNA polymerase (RdRp หรือ โปรตีน L), glycoprotein (G_N และ G_C), movement protein (NSm), nucleoprotein (N) และ non-structural protein (NSs) (ภาพที่ 2) (German *et al.*, 1992; Kormelink *et al.*, 1994; Knierim *et al.*, 2006)

L RNA มีรหัสพันธุกรรมเป็นแบบสายลบ เมื่อแปลรหัสจะได้โปรตีน L ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2,877 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุล 331.3 กิโลดาลตัน (Knierim *et al.*, 2006) จากหนึ่ง open reading frame (ORF) โปรตีนชนิดนี้มีลำดับกรดอะมิโนที่มีความจำเพาะสูง และสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ polymerase คือ arginine-glycine-aspartic acid (RGD) ซึ่งพบในลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน RdRp ของอาร์เอ็นเอไวรัสชนิดสายลบ ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ได้หลายชนิด ได้แก่ NTPase, polymerase, nuclease, helicase และ polymerase (de Haan *et al.*, 1991; Prins and Kormelink, 1998; Whitfield *et al.*, 2005)



ภาพที่ 1 โครงสร้างอนุภาคของเชื้อ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) เยื่อหุ้มมีไกลโคโปรตีน G_N/G_C ภายในประกอบด้วยโปรตีน RdRp (L) และอาร์เอ็นเอสายเดี่ยวสามสายห่อหุ้มด้วยนิวคลีโอโปรตีน (N)

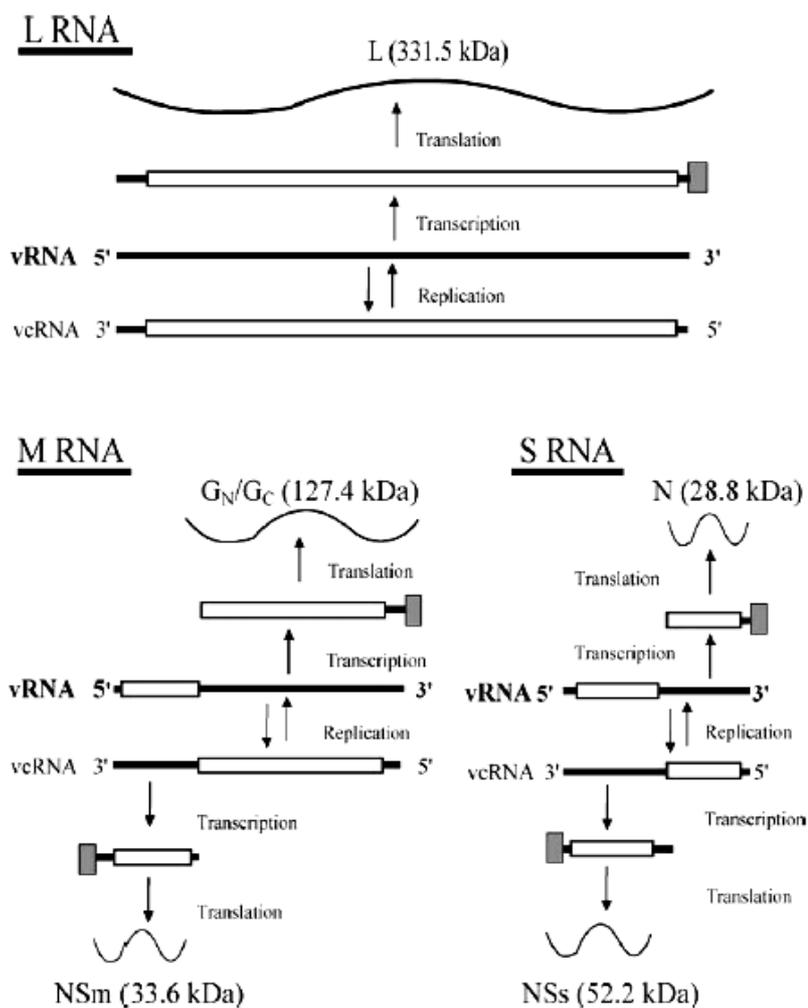
ที่มา: Whitfield *et al.*, 2005

MRNA เป็นสายที่มีรหัสพันธุกรรมสองแบบบนสายเดียวกัน (ambisense) โดยสายอาร์เอ็นเอของไวรัส (viral หรือ V) จะลอกรหัสและแปลรหัสจาก ORF ที่มีรหัสแบบสายลบเพื่อสังเคราะห์ไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 1,121 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 127.2 กิโลดาลตัน (Knierim *et al.*, 2006) ซึ่งจะเป็นสารตั้งต้นของโปรตีน G_N และ G_C เพื่อใช้เป็นไกลโคโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส และทำหน้าที่เป็นโปรตีนจดจำโปรตีน receptor ที่มีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน ในทางเดินอาหารส่วนกลางของเพลี้ยไฟ (Bandla *et al.*, 1998; Adkins, 2000) ส่วนปลาย 5' ของสายอาร์เอ็นเอของไวรัส จะลอกรหัสและแปลรหัสจาก ORF ที่มีรหัสแบบ

สายบวกเพื่อสังเคราะห์โปรตีนที่ไม่นำไปใช้เป็นโครงสร้าง น้ำหนักโมเลกุล 34.2 กิโลดาลตัน ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ระหว่างเซลล์ต่อเซลล์ (non-structural protein หรือ NSm) (Knierim *et al.*, 2006) ซึ่งยีน NSm นี้จะมีผลต่อความสามารถในการปรับตัวเพื่อเข้าทำลายพืชของไวรัสในวงศ์ Bunyaviridae เช่น มีการศึกษาพบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน NSm ระหว่าง 6-9 วัน หลังการเข้าทำลายพืช โดยรวมกันเป็นโครงสร้างคล้ายหลอดยาว หรือ โครงสร้างอื่น ๆ ภายในเซลล์ (Kormelink *et al.*, 1994; Whitfield *et al.*, 2005)

S RNA เป็นสายพันธุกรรมแบบ ambisense เช่นเดียวกับ M RNA ปลายด้าน 3' ของสายอาร์เอ็นเอของไวรัส จะมีรหัสแบบสายลบของยีน ที่ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (โปรตีน N) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 30.6 กิโลดาลตัน (Knierim *et al.*, 2006) ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างห่อหุ้มสารพันธุกรรมของไวรัส โปรตีน N สามารถส่งเสริมให้เริ่มกระบวนการลอกรหัสเพื่อเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัส โดยรวมตัวเป็น dimer และจับกับอาร์เอ็นเอสายเดี่ยว เพื่อทำงานร่วมกับ ribonucleoprotein นอกจากนี้อาจเป็นตัวช่วยยั้งการเพิ่มปริมาณอาร์เอ็นเอของไวรัสได้เช่นกันถ้าโครงสร้างโปรตีน N เปลี่ยนแปลงไป (Richmond *et al.*, 1998; Whitfield *et al.*, 2005) ส่วนปลายด้าน 5' ของสายอาร์เอ็นเอของไวรัสเป็นรหัสแบบสายบวกของยีนที่สังเคราะห์โปรตีน NSs มีน้ำหนักโมเลกุล 49.6 กิโลดาลตัน (Knierim *et al.*, 2006) มีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการ RNA silencing ที่เกิดขึ้นในขณะที่เชื้อไวรัสเข้าทำลายพืช (Takeda *et al.*, 2002) ยีน NSs หรือโปรตีน NSs ของเชื้อทอสมโพไวรัส อาจเกี่ยวกับความรุนแรงของอาการโรคทั้งในพืชและสัตว์ (Okuda *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังมีบทบาทเกี่ยวกับการจำลองอาร์เอ็นเอทั้งในพืช และเพลี้ยไฟพาหะ เนื่องจาก S RNA จะถูกจำลองทั้งสายก่อนที่จะมีการลอกรหัสส่วนของยีน NSs (Ullman *et al.*, 1993)

ในกรณีของ M RNA และ S RNA ซึ่งอาร์เอ็นเอแต่ละสายมีอยู่ 2 ORF นั้น เมื่อลอกรหัสจะได้ mRNA สายยาว มีส่วนของ hairpin เป็น AU-rich ในส่วน intergenic region ทำหน้าที่เป็นสัญญาณหยุดการถอดรหัสพันธุกรรม (transcription terminator signal) (de Haan *et al.*, 1990; Whitfield *et al.*, 2005)



ภาพที่ 2 โครงสร้าง และการแสดงออกของสารพันธุกรรมของเชื้อ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)

- L = large RNA
M = medium RNA
S = small RNA
vRNA = viral strand RNA
vcRNA = viral complementary strand RNA
G_N/G_C = glycoprotein G_N and G_C
N = nucleoprotein
NSm = non-structural protein of M RNA
NSs = non-structural protein of S RNA

ที่มา: Whitfield *et al.*, 2005

4. อาการของโรคและโครงสร้างจุลภาคของเซลล์พืชอาศัยที่ติดเชื้อทอสโปไวรัส

เชื้อทอสโปไวรัสมักก่อให้เกิดอาการไหม้ (necrosis) ใบซีดเหลือง (chlorosis) ต่างวงแหวน (ring spot) ต่างประ (mottling) ใบเป็นสีเงิน (silvering) แผลจุดตาย (local lesion) บนส่วนต่าง ๆ ของพืช รวมทั้งอาการแคระแกร็น (stunting) ซึ่งอาการโรคจะแปรผันตามชนิดของไวรัส ชนิดและส่วนของพืชอาศัย ระยะเวลาที่เชื้อเข้าทำลาย และสภาพแวดล้อม (German *et al.*, 1992) เชื้อ CaCV ที่เข้าทำลายพริก พบว่าใบอ่อนจะปรากฏขอบใบหยัก ใบบิดงอเสียรูป ส่วนใบแก่จะสีซีด และมักพบแผลต่างวงแหวน (McMichael *et al.*, 2002) อาการบนมะเขือเทศจะคล้ายกัน คือใบเป็นจุดวงแหวนสีซีดหรือเป็นจุดสีน้ำตาล ใบไหม้ ส่วนยอดพบแผลสีน้ำตาล และแคระแกร็น ผลเป็นจุดสีซีดหรือมีบริเวณสีแดงหรือเขียว ล้อมรอบด้วย halo สีเหลือง มีแผลเป็นจ้ำสีน้ำตาลหรือมีลักษณะเป็นวงซ้อนกัน (Green and Kim, 1991) อาการของถั่วลิสง บนใบจะมีอาการเนื้อเยื่อตาย ยอดไหม้ ส่วนยอดโค้งลงมาคล้ายตะขอ หรืออาการใบต่างจุดวงแหวน ถ้าอาการรุนแรงจะตายทั้งต้น ต้นที่ไม่ตายมักจะติดฝักน้อย (ปิยาภรณ์ และคณะ, 2548)

การศึกษาโครงสร้างจุลภาคของเซลล์พืชที่เชื้อทอสโปไวรัสเข้าทำลาย พบว่ามีความแตกต่างกันตามชนิดของไวรัส และโครงสร้างของเซลล์พืช (Prins and Kormelink, 1998) อนุภาคของเชื้อทอสโปไวรัสแต่ละชนิดที่สมบูรณ์แล้วจะมีขนาดใกล้เคียงกัน และอยู่รวมกันในถุงหุ้มที่มาจากเยื่อหุ้มส่วนหนึ่งของ rough endoplasmic reticulum (RER) ซึ่งลักษณะนี้อาจมีความคงที่ในไวรัสบางชนิด เช่น เชื้อ TCSV และเชื้อ GRSV ที่โดยมากมีการเรียงตัวเป็น crystalline arrays ขนาดเล็ก นอกจากนี้อาจพบเป็นจุดหรือกลุ่มก้อนที่มีลักษณะทึบแสงอิเล็กตรอน รูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งมักใช้เป็นที่บ่งบอกว่าเซลล์บริเวณดังกล่าวถูกเชื้อไวรัสทำลาย (Prins and Kormelink, 1998) เช่น amorphous mass หรือ viroplasm และเมื่อใช้แอนติบอดีต่อ โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก (โปรตีน N) ศึกษาด้วยเทคนิค Immunostaining พบว่ากลุ่มก้อนที่มีลักษณะทึบแสงอิเล็กตรอนนี้ ประกอบด้วยโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก โดยอาจมีลักษณะเป็นรูปลูกบาศก์ (cubic) วงกลม (circular) หรือเป็นรูปวงรี (elliptic) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 30-120 นาโนเมตร (Kitajima *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังพบโครงสร้างอื่นในไซโตพลาสซึมที่บ่งบอกว่ามีเชื้อไวรัสเข้าทำลาย คือ โครงสร้างแบบ fibrous และ elongated flexible filament (พบในกรณีเชื้อ TSWV เข้าทำลาย) หรือ rigid rod (พบในกรณีเชื้อ INSV เข้าทำลาย) รวมตัวกันอยู่ในลักษณะ paracrystalline array โครงสร้างนี้เป็นการรวมกันของโปรตีน NSs ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ ซึ่งต่อมามีการศึกษาพบว่าโปรตีน NSs มีบทบาทในการเป็นตัวยับยั้งกระบวนการ RNA silencing ในพืช (Kormelink *et al.*, 1991; Kitajima *et al.*, 1992; Bandla *et al.*, 1994; Takeda *et al.*, 2002)

5. เกณฑ์การจำแนกชนิดของเชื้อทอสปอไวรัส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนเพื่อศึกษาสายสัมพันธ์ ใช้เป็นเกณฑ์หลักในการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัส โดยเชื้อทอสปอไวรัสจะใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนและโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก ซึ่งเชื้อทอสปอไวรัสชนิดเดียวกันมีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่ต่ำกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Goldbach and Kuo, 1996) เมื่อใช้ความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาเป็นเกณฑ์จะแบ่งเชื้อทอสปอไวรัสออกเป็น 6 ซีโรกรุป คือ ซีโรกรุป I, II, III, IV, V และ VI และมีเชื้อไวรัสอีกจำนวนหนึ่งที่ยังไม่ได้จัดเป็นซีโรกรุป เนื่องจากไม่พบความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยากับเชื้อทอสปอไวรัสชนิดอื่น ๆ ดังนั้นจึงจัดไว้เป็นซีโรไทป์ (serotype) เดี่ยว ๆ (ตารางที่ 1) (Lin *et al.*, 2005)

Satyanarayana *et al.* (1996b) ได้แยกความแตกต่างของเชื้อ PBNV จากเชื้อในซีโรกรุป I, II และ III โดยใช้ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิก และพบว่าเชื่อดังกล่าวมีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนกับเชื้อ PBNV-to จากมะเขือเทศ เพียง 82 เปอร์เซ็นต์ ปรียพรรณ (2543) เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ และกรดอะมิโนของยีน N ที่สังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของเชื้อ Thailand tomato tospovirus ไอโซเลต KS1.8 ที่แยกได้จากมะเขือเทศใน จ. กาฬสินธุ์ พบว่า complementary DNA (cDNA) ที่เพิ่มปริมาณได้มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีนสังเคราะห์โปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกกับเชื้อ *Gloxinia tospovirus*, PBNV, WSMoV และ WBNV ที่ระดับ 85, 80, 79 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ลำดับกรดอะมิโนมีความเหมือนกับเชื้อ *Gloxinia tospovirus*, PBNV, WSMoV, WBNV และ TSWV ที่ระดับ 89, 85, 83, 80 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เชื้อ CaCV จัดอยู่ในซีโรกรุป IV เช่นเดียวกับกับเชื้อ WSMoV โดยในซีโรกรุปนี้ มีเชื้อทอสปอไวรัสรวมอีก 5 ชนิด ทั้งหมดพบในทวีปเอเชีย ได้แก่ GBNV, WBNV (ทั้งคู่พบในประเทศอินเดีย) WSMoV (พบในประเทศญี่ปุ่น และไต้หวัน) CCSV (พบในประเทศไต้หวัน) และ CaCV (พบในประเทศออสเตรเลีย ไทย และจีน) เชื้อ CaCV เป็นสาเหตุโรคของพริก มะเขือเทศ และถั่วลิสง S RNA ของเชื้อ CaCV-CP ที่พบในประเทศจีนมีความยาว 3,399 นิวคลีโอไทด์ (Chen *et al.*, 2006a) ส่วนของเชื้อ CaCV-AIT ในประเทศไทยมีความยาว 3,477 นิวคลีโอไทด์ (Knierim *et al.*, 2006) เชื้อทั้งสองไอโซเลตประกอบด้วย 2 ORF ที่มีรหัสพันธุกรรมอยู่ในลักษณะ ambisense orientation ยีน NSs อยู่ทางปลาย 5' ของสายอาร์เอ็นเอของไวรัส (นิวคลีโอไทด์ที่ 67-1,383) ควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน NSs ที่มีกรดอะมิโน 439 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 49.6

กิโลดัลตัน ซึ่งเชื่อทุกชนิดในซีโรกรุปเดียวกับเชื้อ WSMoV ยกเว้น CCSV จะมีจำนวนกรดอะมิโนของโปรตีน NSs เท่ากัน ยีน NSs มีส่วนที่เรียกว่า intergenic region (IGR) ซึ่งมีลักษณะเป็น A/U rich คั่นอยู่ระหว่างยีน N ที่อยู่ทางปลาย 3' ของสายอาร์เอ็นเอ

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน IGR ของ S RNA ของเชื้อทอสโปไวรัสชนิดต่าง ๆ พบว่ามีความยาวที่แปรผันอย่างมาก ตั้งแต่ 461 (เชื้อ PCFV) ถึง 1,261 นิวคลีโอไทด์ (เชื้อ WSMoV) (Pappu *et al.*, 2000) หน้าที่ทางชีวภาพของ IGR ที่มีความยาวแตกต่างกันนี้ยังไม่ทราบ แต่อาจสัมพันธ์กับแหล่งกำเนิดของไวรัส หรือแหล่งกำเนิดของพืชอาศัย เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน IGR ของ S RNA ของเชื้อ CaCV หลาย ๆ ไอโซเลต โดยเฉพาะ ไอโซเลตจากประเทศออสเตรเลีย และไทย สามารถแยกกลุ่มเชื้อออกได้ตามแหล่งกำเนิดทางภูมิศาสตร์ และแหล่งกระจายตัว (Pappu *et al.*, 2000; Heinze *et al.*, 2001)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs และบริเวณ IGR ของเชื้อ PBNV และ PBNV-To พบว่ามีความเหมือนกัน 82 และ 52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ IGR ของเชื้อ PBNV (773 นิวคลีโอไทด์) สั้นกว่าเชื้อ PBNV-To (1,262 นิวคลีโอไทด์) อยู่ 489 นิวคลีโอไทด์ ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs และความแปรผันของ IGR นี้ ไม่เพียงใช้ประโยชน์เพื่อการจัดจำแนกเชื้อ PBNV และ PBNV-To ออกเป็นสองชนิดที่ต่างกันเท่านั้น แต่อาจสัมพันธ์กับคุณสมบัติทางชีววิทยากับเชื้อไวรัสในซีโรกรุป IV (Knierim *et al.*, 2006) โดยข้อสันนิษฐานนี้จะชัดเจนมากยิ่งขึ้นเมื่อมีข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของ S RNA เพิ่มมากขึ้น

6. ความสำคัญของยีนและโปรตีน NSs

6.1 การเกิดอาการของโรค

โปรตีน NSs อาจมีบทบาทในการเป็นโปรตีนองค์ประกอบ ระหว่างกระบวนการก่อให้เกิดโรค (pathogenesis) และการจำลองตัวของจีโนม (Kohl *et al.*, 1999) Okuda *et al.* (2003) ตรวจสอบชิ้นส่วนอาร์เอ็นเอที่ชักนำให้เกิดอาการโรคโดยเชื้อ WSMoV ไอโซเลต WS-Y สาเหตุอาการไหม้ที่มีความรุนแรงในพืชอาศัยชนิด *Tetragonia expansa* และไอโซเลต WS-O ที่เป็นสาเหตุอาการต่างประที่ไม่รุนแรงซึ่งแยกได้จาก *T. expansa* โดยศึกษาการแลกเปลี่ยนส่วนของจีโนม เนื่องจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs และ N ที่มีความคล้ายคลึงกัน 98.6 และ 98.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่สามารถบอกความแตกต่างได้ และยังไม่พบปัจจัยอื่นที่ทำให้เกิด

อาการ โรคต่างกัน ดังนั้นจึงใช้เทคนิคการเพิ่มปริมาณยีนด้วย RT-PCR และย่อยสายดีเอ็นเอที่ได้ด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ (RFLP) เพื่อให้ชิ้นส่วนยีนผลิตภัณฑ์ที่ขยายปริมาณได้มีความยาวลดลง พบว่าสามารถแยกชิ้นส่วนของยีนที่เกิดการแลกเปลี่ยนส่วนของจีโนมได้ 30 ชิ้นส่วน จากพีชอาศัย *T. expansa* ที่ทำการปลูกเชื้อ ทุกชิ้นส่วนมีการแลกเปลี่ยนยีนในส่วน S RNA ของไอโซเลต WS-Y (Sy) สาเหตุอาการรุนแรง กับ S RNA ของไอโซเลต WS-O (So) สาเหตุของอาการไม่รุนแรง โดยความแตกต่างของอาการอาจสัมพันธ์กับโปรตีน NSs หรือโปรตีน N ซึ่งต้องใช้เทคนิคการกลายพันธุ์ศึกษาต่อไป

6.2 โครงสร้างจุลภาคของโปรตีน NSs ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส

เซลล์พืชที่เชื้อ TSWV เข้าทำลายจะพบโปรตีน NSs จัดเรียงเป็นเส้นสายกระจัดกระจาย (Kormelink *et al.*, 1991) แต่ในกรณีของเชื้อ INSV กลับพบเป็นลักษณะ paracrystalline array เป็นแนวคล้ายเกลียวเส้นด้าย หรือเป็นจุด ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ TSWV ออกจากเชื้อ INSV ได้ (Prins and Kormelink, 1998) ลักษณะดังกล่าวจะสัมพันธ์กับปริมาณของ viroplasm และการจัดเรียงตัวของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค ลักษณะเส้นสายของโปรตีน NSs นี้จะพบมากถ้ามีการเข้าทำลายโดยเชื้อไวรัสชนิดเดียว แต่ถ้ามีหลายชนิดจะพบโปรตีนลักษณะดังกล่าวได้น้อย ซึ่งอาจขึ้นกับเวลา และชนิดพีชอาศัยด้วย (Kormelink *et al.*, 1991; Prins and Kormelink, 1998) นอกจากนี้โปรตีน NSs ยังมีการแสดงออกในเซลล์พืชที่ได้รับไวรัส (viruliferous) (Ullman *et al.*, 1992a; Wijkamp *et al.*, 1993) โดยในเนื้อเยื่อต่อมาทำลายจะพบเป็นลักษณะ paracrystalline array เป็นแนวคล้ายเกลียวเส้นด้ายเช่นกัน แต่อาจไม่พบลักษณะเช่นนี้ใน viroplasm, dense mass หรือ amorphous inclusion อื่น ๆ (Ullman *et al.*, 1993, 1995)

6.3 การยับยั้งกระบวนการ RNA silencing โดยโปรตีน NSs

กระบวนการ RNA silencing เป็นกระบวนการที่พืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสโรคพืช ซึ่งเป็นการ silence ยีนที่เกิดขึ้นหลังจากการถอดรหัสจีโนม (post-transcriptional gene silencing, PTGS) (Voinnet, 2001; Waterhouse *et al.*, 2001a) โดยกระบวนการดังกล่าวจะจดจำอาร์เอ็นเอซึ่งเป็นอนุพันธ์ของยีนที่ถูกส่งถ่ายเข้าไป และอาร์เอ็นเอของไวรัสใน ระยะที่มีการจำลองตัวได้โครงสร้างเป็นสายคู่ จากนั้นจะเกิดการทำลายอาร์เอ็นเอที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกัน ซึ่งอาร์เอ็นเอที่จะทำหน้าที่ในการจดจำนี้มีลักษณะเป็นนิวคลีโอไทด์สาย

สั้น ๆ ประมาณ 21-25 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่า small interfering RNA (siRNA) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์จะเป็นสายคู่สมกับ RNA เป้าหมาย (Waterhouse *et al.*, 2001b)

ไวรัสพืชบางชนิดจะมีตัวยับยั้ง PTGS ดังเช่น โปรตีน helper component ของเชื้อ *Tobacco etch virus* ซึ่งเป็นตัวยับยั้งกระบวนการ PTGS ตัวแรกที่ค้นพบ (Cogoni and Macino, 2000) หรือโปรตีน 2b ของเชื้อ *Cucumber mosaic virus* โปรตีน 19K (P19) ของ *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) เป็นต้น (Brigneti *et al.*, 1998; Voinnet *et al.*, 1999) โดยจะทำหน้าที่แตกต่างกันในวิถีของการ silencing และมีประโยชน์ต่อการจำแนกวิถี PTGS (Li and Ding, 2001) เนื่องจากในพืชจะมีวิถีที่แตกแขนงออกไป อันได้แก่ sense transgene-induced PTGS (S-PTGS) เกิดจากอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สร้างขึ้นโดย RdRp ของพืช หรืออาจเป็น invert-repeat transgene-induced PTGS (IR-PTGS) ที่เกิดโดยการเรียงตัวของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปในลักษณะ inverted repeat (Beclin *et al.*, 2002)

เชื้อ *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) มีโปรตีน NSs ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งกระบวนการ PTGS และเป็นชนิดแรกที่พบได้ในไวรัสชนิดที่มีจีโนมเป็นอาร์เอ็นเอสายลบ โดยโปรตีน NSs จะยับยั้งในวิถี S-PTGS ทั้งการเกิดอาการโรคแบบแผลจุดตาย และแบบแพร่กระจายทั่วทั้งต้นพืช แต่ไม่มีผลยับยั้งกระบวนการ IR-PTGS แสดงให้เห็นว่าโปรตีน NSs เป็นโปรตีนหลักในกระบวนการขั้นแรกของการเกิด RNA silencing ซึ่งรวมถึงการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอสายคู่โดยเอนไซม์ RdRp ของพืชในวิถี S-PTGS นอกจากนี้โปรตีน NSs อาจรบกวนในขั้นสุดท้ายหลังจากที่มีการสร้างอาร์เอ็นเอสายคู่เสร็จสิ้นแล้ว (Takeda *et al.*, 2002)

Sonoda and Tsumuki (2004) ทำการปลูกเชื้อ *Potato virus X* (PVX) ที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs ของเชื้อ TSWV บนใบยาสูบ *Nicotiana benthamiana* ที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs ของเชื้อ TSWV พบว่าจะมีการสะสมของอาร์เอ็นเอส่งข้อมูล (messenger RNA; mRNA) ของยีนที่ส่งถ่ายเข้าไปลดลง กระบวนการนี้เกิดจากกลไกของ RNA silencing อย่างไรก็ตามระดับของความต้านทานก็ยังคงต่ำกว่าที่พบในพืชถ่ายยีน N และปลูกเชื้อ PVX ที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีลำดับของยีน N ของเชื้อ TSWV (Sonoda, 2003) ข้อสรุปนี้แสดงให้เห็นว่าลำดับของยีนที่เหมือนกันจะมีผลค่อนข้างน้อยต่อเชื้อ TSWV นั่นคือความต้านทานต่อไวรัสที่มีอาร์เอ็นเอเป็นตัวกลาง (RNA-mediated virus resistance) จะเกิดขึ้นโดยยีนของไวรัสหรือความจำเพาะของลำดับนิวคลีโอไทด์ มากกว่าที่จะเป็นจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมือนกัน (Sonoda and Tsimuki, 2004)

6.4 โพรตีน NSs สัมพันธ์กับการจำลองอาร์เอ็นเอในเพลี้ยไฟ

ในตัวอ่อนเพลี้ยไฟชนิด *F. occidentalis* ที่ได้รับเชื้อ TSWV จะพบโปรตีน NSs ในลักษณะ paracrystalline array ในขณะที่ไม่พบโปรตีน N, G_N และ G_C ในเซลล์แมลงดังกล่าว (Ullman *et al.*, 1995) Wijkamp *et al.* (1993) พบโปรตีน NSs ที่มีโครงสร้างในลักษณะ paracrystalline array ในไซโทพลาสซึมของเซลล์เพลี้ยไฟ แต่มีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับไอโซเลตของเชื้อไวรัส (Kormelink *et al.*, 1991) ชนิดของเพลี้ยไฟ ความสามารถในการตอบสนองต่อการติดเชื้อไวรัส หรือเวลาในการเพิ่มปริมาณของไวรัสที่แตกต่างกัน (Ullman *et al.*, 1995) โดยสิ่งยืนยันว่าเชื้อไวรัสมีการเพิ่มปริมาณในเซลล์แมลง คือ การพบโปรตีน NSs ในทางเดินอาหารส่วนกลาง เซลล์กล้ามเนื้อ และต่อมน้ำลายของเพลี้ยไฟ (Wijkamp *et al.*, 1993; Ullman *et al.*, 1995) แต่ตัวเต็มวัยของเพลี้ยไฟชนิด *T. setosus* เมื่อนำมาเลี้ยงให้ได้รับเชื้อ TSWV หลังจากนั้น 5 วันจะพบโปรตีน NSs เฉพาะในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลาง (Ohnishi *et al.*, 2001)

Nagata *et al.* (1997) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ (primary cell culture) เพลี้ยไฟชนิด *F. occidentalis* และ *T. tabaci* จากระยะเอ็มบริโอ (embryo) และทำการปลูกเชื้อ TSWV หลังจากนั้นชั่วโมงที่ 8 จะพบโปรตีน NSs ของเชื้อ TSWV มีการสะสมในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ช้ากว่าโปรตีน N ซึ่งลักษณะดังกล่าวพบเช่นกันกับกรณีเชื้อไวรัส Uukuniemi (UUK) ที่เข้าทำลายเซลล์ Baby Hamster Kidney Cell (BHK) (Simon *et al.*, 1992) โดยโปรตีน NSs ของเชื้อ UUK มีการแสดงออกเช่นเดียวกันกับโปรตีน NSs ของเชื้อ TSWV การพบโปรตีน NSs ในเซลล์เพลี้ยไฟนี้เหมือนกับที่พบในเซลล์ของยาสูบ *N. rustica* ที่ติดเชื้อ TSWV (Kormelink *et al.*, 1991) และเชื้อไวรัส UUK ที่เข้าทำลายเซลล์ BHK (Simon *et al.*, 1992) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีน NSs มีบทบาทเกี่ยวกับการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส และสัมพันธ์กับปัจจัยบางอย่างของพาหะ (Wijkamp *et al.*, 1993; Nagata *et al.*, 2002) ซึ่งน่าจะเหมือนกันทั้งในพืชและสัตว์ที่ติดเชื้อทอสโปไวรัส

6.5 การใช้ประโยชน์จากโปรตีน NSs ในทางชีววิทยา

Heinze *et al.* (1995) เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs ของเชื้อทอสโปไวรัสหลายชนิดจากซีโรกรุป I ถึง IV พบว่ากรดอะมิโน 24 เรซิดิวส์ ด้านปลายหมู่คาร์บอกซิลของสายเปปไทด์ (peptide) (ตำแหน่งที่ 398-421 ของเชื้อ TSWV) มีความคล้ายคลึงกัน 56-68 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อ Heinze *et al.* (2000) ผลิตแอนติบอดีต่อสายเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 24 เรซิดิวส์ ที่มีความอนุรักษ์ทางด้านปลายหมู่คาร์บอกซิลของโปรตีน NSs นี้ พบว่าแอนติบอดี

A338 สามารถตรวจเชื้อ TSWV, GRSV, TCSV และ INSV ซึ่งจัดอยู่ในซีโรกรุป I, II และ III ตามลำดับ ยกเว้นเชื้อ WSMoV ที่จัดอยู่ในซีโรกรุป IV เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค antigen coated plate (ACP-ELISA) แสดงว่าด้านปลายหมู่คาร์บอกซิลมีส่วนของลำดับเปปไทด์ที่มีความเหมือนกันในซีโรกรุป I, II และ III จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีกับทุกไอโซเลต ยกเว้นซีโรกรุป IV แสดงว่าการมี epitope บนไกลโคโปรตีนของเชื้อทอสโปไวรัสชนิดต่าง ๆ ในซีโรกรุป I, II และ III ที่คล้ายคลึงกัน (common epitope) ทำให้เกิดปฏิกิริยาข้ามกับแอนติบอดีชนิดเดียวกันได้ (Adam *et al.*, 1995) ข้อดีของการสังเคราะห์สายเปปไทด์เพื่อใช้ผลิตแอนติบอดี คือ ทำให้ผลิตแอนติบอดีได้ง่าย ได้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะค่อนข้างสูง ปลอดภัยต่อสัตว์ทดลอง และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาขั้นตอนอื่นได้ (Van Regenmortel, 1993)

7. ความสัมพันธ์ของเพลี้ยไฟพาหะกับเชื้อทอสโปไวรัส

แมลงในลำดับ Thysanoptera หลายชนิดเป็นเพลี้ยไฟศัตรูของพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และพบว่าไม่น้อยกว่า 10 ชนิดที่สามารถถ่ายทอดเชื้อทอสโปไวรัสได้ (Whittied *et al.*, 2005) ความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อทอสโปไวรัสของเพลี้ยไฟขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ปริมาณอาหาร ชนิดและลักษณะ โครงสร้างของพืช เนื่องจากเพลี้ยไฟหลายชนิดสามารถเป็นพาหะของเชื้อทอสโปไวรัสได้ ดังนั้นจึงก่อให้เกิดการระบาดของโรคไปทั่วโลก (Mound, 1996)

เชื้อทอสโปไวรัสสามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยไฟบางชนิดในวงศ์ Thripidae เท่านั้น (ตารางที่ 1) การได้รับเชื้อไวรัสจะเกิดขึ้นขณะที่เพลี้ยไฟดูดกินน้ำเลี้ยงจากพืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย ซึ่งมักเกิดขึ้นในระยะตัวอ่อน (larva) ดังเช่นตัวอ่อนระยะที่สอง (second larva) ของเพลี้ยไฟชนิด *F. occidentalis* ที่มีอายุ 24 ชั่วโมง สามารถที่จะรับเชื้อทอสโปไวรัสจากพืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายได้ดีที่สุด (Wijkamp and Peters, 1993) เพลี้ยไฟบางชนิดอาจใช้เวลา 10-15 นาที บางชนิดอาจใช้เวลา 2-3 ชั่วโมง หรือนานกว่า ในการได้รับเชื้อไวรัส และจากนั้น 80 และ 170 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27 หรือ 20 องศาเซลเซียส จะเป็นระยะที่ไวรัสมีการเพิ่มปริมาณได้สูงสุดในเพลี้ยไฟที่ได้รับเชื้อ และเริ่มถ่ายทอดสู่พืชได้ในระยะคักแค้ หรือวันแรกของระยะเต็มวัย แต่พบว่าตัวอ่อนระยะที่ 2 ก็สามารถถ่ายทอดได้เช่นกัน (Prins and Kormelink, 1998) เชื้อทอสโปไวรัสสามารถอยู่ในเพลี้ยไฟได้ประมาณ 20-40 วันแล้วแต่สภาวะแวดล้อม ซึ่งเพลี้ยไฟระยะตัวเต็มวัยเป็นระยะที่สามารถถ่ายทอดเชื้อทอสโปไวรัสได้ดีที่สุด แต่บางชนิดไม่พบว่ามี การถ่ายทอดจากพืชโดยตัวเต็มวัย (Ullman *et al.*, 1992b) Wijkamp and Peters (1993) ศึกษาเพลี้ยไฟชนิด *T. tabaci* พบว่าเพลี้ยไฟเพียงตัวเดียว สามารถถ่ายทอดเชื้อทอสโปไวรัสสู่พืชได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และทำให้พืช

ทดสอบเป็นโรคได้ นอกจากนี้เพลี้ยไฟชนิด *F. occidentalis* สามารถถ่ายทอดเชื้อ TSWV, INSV, GRSV และ TCSV ได้ แต่ความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อทอสปอไวรัสแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยสามารถถ่ายทอดเชื้อ INSV ได้ดีที่สุด ในขณะที่เชื้อ GRSV และ TCSV ถูกถ่ายทอดได้น้อยมาก (Wijkamp *et al.*, 1993; 1995) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของการถ่ายทอดเชื้อทอสปอไวรัสก็ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอาศัย (Prins and Kormelink, 1998)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. แหล่งของเชื้อไวรัสและการเก็บตัวอย่างพืช และเพลี้ยไฟ

เก็บใบถั่วลิสงที่แสดงอาการใบด่าง ดำวงแหวน ใบอ่อนโค้งงอ บิดเบี้ยว และจุดใบไหม้ ซึ่งคาดว่าติดเชื้อทอสปอไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) (วิมล และคณะ, 2547; ปิยาภรณ์ และคณะ, 2548) จากแปลงเพาะปลูก อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา ช่วงเดือนมกราคม ถึงมีนาคม พ.ศ. 2548 นำตัวอย่างใบมาตรวจวินิจฉัย ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของเชื้อทอสปอไวรัส ซีโรกรุป IV (PAb-A1) ตัวอย่างที่ให้ผลบวกนำมาแยกให้ได้ไอโซเลตเดี่ยว ๆ (single lesion isolation) โดยบดตัวอย่างใบใน 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0 ที่เติม 0.2% (v/v) 2-mercapto-ethanol และ 1% (w/v) carborundum ด้วยโกร่ง และเพิ่มปริมาณด้วยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล (mechanical inoculation) บนใบถั่วพุ่ม *Vigna sinensis* ซึ่งเป็นพืชอาศัยแบบแผลจุดตาย แยกแต่ละจุดมาเพิ่มปริมาณในต้นอ่อนถั่วลิสง *Arachis hypogaea* สายพันธุ์ไททานิก 9 ซึ่งเป็นพืชอาศัยแบบเชื้อกระจายทั่วทั้งต้น ให้ชื่อตัวอย่างเป็น PPT (peanut Pakthongchai) ส่วนไอโซเลต PKK 2UD (peanut Khon Khaen) แยกได้จากถั่วลิสง อ. เมือง จ. อุตรธานี เมื่อปี พ.ศ. 2547 (ปิยาภรณ์ และคณะ, 2548) ทั้งสองไอโซเลตเพาะเลี้ยงในต้นถั่วลิสงในเรือนทดลองเพื่อใช้ในการวิจัยขั้นตอนต่อไป

เก็บตัวอย่างเพลี้ยไฟที่พบบนใบอ่อนถั่วลิสงจากแปลงปลูกใน อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา และให้ชื่อตัวอย่างเป็น TPT (thrips Pakthongchai) จากนั้นใช้ฟู่กันขนาดเล็กเขี่ยเพลี้ยไฟใส่ลงในหลอด microcentrifuge ที่มีสารละลาย AGA (60% ethanol, glycerine และ acetic acid อัตราส่วน 10:1:1) (ศิริณี, 2544) โดยสารละลาย AGA จะรักษาสภาพเพลี้ยไฟ และทำให้อวัยวะอ่อนนุ่มเหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างเพื่อจัดจำแนกชนิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนเพลี้ยไฟตัวเต็มวัย ที่จะใช้ตรวจเชื้อ CaCV แยกเก็บในหลอด microcentrifuge ที่มี 70% ethanol แล้วเก็บตัวอย่างในตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. แอนติบอดีที่ใช้ตรวจสอบเชื้อทอสปอไวรัสด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยา

2.1 Rabbit polyclonal antibody Tospovirus (PAb-Tospo A1 และ A3) ใช้ตรวจโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรุป IV (WSMoV, CaCV และ TNSV) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อรประไพ คชนันท์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

2.2 PAb-WSMoV (PAb-P29) ใช้ตรวจโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของเชื้อ WSMoV และทำปฏิกิริยากับเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุป IV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. รัชณี สงประยูร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 PAb-MYSV (PAb-M7) ใช้ตรวจโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของเชื้อ MYSV และทำปฏิกิริยากับเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุป IV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. รัชณี สงประยูร

2.4 Mouse monoclonal antibody (MAb-SE7) ใช้ตรวจโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกของเชื้อ MYSV ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. อรประไพ กชนันท์

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

ใช้เทคนิค DAC-ELISA ในการตรวจสอบการติดเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุป IV (โสภณ, 2536) ในตัวอย่างใบพืช การทดสอบค่าไตเตอร์ (titer) และการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ในการศึกษาขั้นต่อไป ทุกขั้นตอนของการ coat plate ด้วยแอนติเจน การ blocking การเติมแอนติบอดี และการเติม substrate จะบ่มในกล่องขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ขั้นตอนการล้างใช้ PBS-T buffer (phosphate buffer saline ที่เติม 0.05% Tween 20) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

การตรวจสอบเชื้อทอสโปไวรัสในเนื้อเยื่อพืชเป็นโรค ทำโดยใช้เนื้อเยื่อพืช บดด้วย carbonate coating buffer (0.05 M sodium carbonate, pH 9.6) ที่เติม diethyldithiocarbamic acid (NaDICA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสัดส่วนเนื้อเยื่อพืชต่อบัฟเฟอร์เป็น 1:10 (w/v) จากนั้นเติมลงในหลุม ELISA plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้น (ขั้นนี้สามารถบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน) เมื่อครบเวลาเทน้ำคั้นตัวอย่างออก และล้างด้วย PBS-T buffer ขั้นตอน blocking ใช้ 2% (w/v) skim milk ซึ่งเตรียมใน PBS-T buffer เติมลงในหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้น ระหว่างนี้เตรียม primary antibody ที่จับกับแอนติเจนที่ต้องการตรวจ โดยเจือจางแอนติบอดีใน conjugate buffer (0.2% polyvinyl pyrrolidone 40T, 0.5% ovalbumin ใน PBS-T) กำจัดปฏิกิริยาไม่จำเพาะ (non-specific reaction) ของแอนติบอดีกับโปรตีนพืชปกติ โดยเติมน้ำคั้นจากใบพืชปกติซึ่งบดใน conjugate buffer ในแอนติบอดีที่เจือจางแล้ว ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำคั้นใบพืชเป็น 1:100 และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30-40 นาที เมื่อครบเวลาการ blocking ล้างด้วย PBS-T buffer จากนั้นเติม primary antibody หลุมละ 50

ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้น แล้วล้างด้วย PBS-T buffer จากนั้นเตรียม secondary antibody ซึ่งเป็น alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (AP conjugated-GAR IgG) เจือจาง 1:30,000 (v/v) ใน conjugate buffer หรือใช้ AP conjugated-goat anti-mouse immunoglobulin G (AP conjugated-GAM IgG) เจือจาง 1:30,000 (v/v) เป็น secondary antibody ในกรณีที่ใช้ monoclonal antibody เป็น primary antibody เมื่อล้าง ELISA plate แล้วเติม secondary antibody ที่เตรียมในหลุม ๆ ละ 50 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้น ล้างด้วย PBS-T buffer และเติม สารละลาย *p*-nitrophenyl phosphate ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมใน substrate buffer (10% Diethanolamine, pH 9.8) เติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องขึ้น และนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Original Multiskan EX ELISA reader (Labsystems, Finland) ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาที

4. การสกัดอาร์เอ็นเอ

4.1 การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบพืช

สกัดอาร์เอ็นเอรวมด้วยวิธีที่ปรับปรุงจาก Chang *et al.* (1993) ใช้ใบอ่อนถั่วลิสงที่แสดงอาการของโรคจากเชื้อทอสปอไวรัสทั้งไอโซเลต PKK 2UD และ PPT โดยชั่งใบพืชน้ำหนัก 0.1 กรัม บดให้ละเอียดใน 2% CTAB buffer (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.2% Na₂SO₃, 1% PVP40) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มใน waterbath อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ย้ายสารละลายส่วนบนใส่หลอด micro-centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และเติม Chloroform : Isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นนี้ทำ 2 รอบ และย้ายสารละลายส่วนบนมาเติม 4 M LiCl ปริมาตร 1 เท่า ผสมให้เข้ากันด้วยการกลับลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำตะกอนมาเติม 1% SDS ใน 1x TE buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าเบา ๆ แล้วเติม 5 M NaCl ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และ isopropanol จากอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 300 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จึงนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ล้างตะกอน 2 รอบด้วยการเติม 70% ethanol จากอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปล่อยตะกอนให้แห้งจึงเติมน้ำที่กำจัด RNase (diethyl-pirop carbonate-treated distilled water; DEPC-dH₂O) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ตรวจสอบด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที จากนั้นย้อมด้วย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และตรวจแถบอาร์เอ็นเอภายใต้แสง UV-transilluminator

4.2 การสกัดอาร์เอ็นเอจากเพลี้ยไฟ

สกัดอาร์เอ็นเอจากเพลี้ยไฟ โดยปรับปรุงจากวิธีการสกัดอาร์เอ็นเอจากเพลี้ยอ่อนของ He *et al.* (2006) โดยย้ายตัวอย่างเพลี้ยไฟเต็มวัยที่เก็บจากแปลงเพาะปลูกถั่วลิสงซึ่งเก็บใน 70% ethanol ลงในหลอด microcentrifuge หลอดละ 1 และ 5 ตัว บดให้ละเอียดด้วย micropestle แล้วเติม extraction buffer (0.1 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM MgCl₂ และ 6 Unit RNase-free DNase) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และบดให้ละเอียดในบัฟเฟอร์อีกครั้ง จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม 10% (w/v) SDS และ proteinase K ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และแยกอาร์เอ็นเอ โดยเติม Tris-HCl saturated-phenol และ phenol : chloroform : isoamyl alcohol ในสัดส่วน 25:24:1 (v/v/v) สารละลายละ 115 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบา ๆ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นเติม glycogen ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และตกตะกอนอาร์เอ็นเอด้วย absolute ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ที่มี sodium acetate, pH 5.2 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 M บ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นตกตะกอนอาร์เอ็นเอโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และปล่อยตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และเติม DEPC-dH₂O ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอน นำไปใช้ในปฏิกิริยา RT-PCR หรือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. ไพรมเมอร์ (primers)

ออกแบบสายไพรมเมอร์จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน NSs ของเชื้อ *Gloxinia tospovirus* เนื่องจากมีความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกกับเชื้อ CaCV มากที่สุด (วิมล และคณะ, 2547; พิศสุวรรณ และคณะ, 2548) และเพิ่มตำแหน่งของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

(restriction site) *Bam*HI ที่ปลาย 5' ของสายไพรเมอร์ Forward CaCV-NSsF ดังนี้ 5'GGATCCATG TCTAGTGTAAGAGTGC-3' ส่วนสายไพรเมอร์ Reverse CaCV-NSsR ทางด้านปลาย 3' จะเพิ่มลำดับนิวคลีโอไทด์สำหรับตำแหน่งตัดของเอนไซม์ *Hind*III ดังนี้ 5'-AAGCTTTATTGAAGC TCCACAATAAAATGTTG-3' ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการโคลนยีนเข้าสู่เวกเตอร์สังเคราะห์โปรตีน (expression vector) ในขั้นต่อไป

ไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณยีน N ของเชื้อ CaCV ได้แก่ CaCV-CP-NR2 Forward 5'-GTCGACTTACACCTCTATAGAAGT-3' และ 3'V Tospo gIV Reverse 5'-GTAAACACCA TGTCTA(CA)CGT-3' (วิมล และคณะ, 2547)

6. ปฏิกริยา Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

สังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยเติม DEPC-dH₂O อาร์เอ็นเอรวม และสายไพรเมอร์ Reverse ความเข้มข้น 2 ไมโครโมล ลงในหลอด PCR จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และวางในน้ำแข็งทันที นาน 5 นาที นำมาเติมสารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1x RT buffer และ 1 mM dNTPs บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม 200 Unit Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) reverse transcriptase (Bioneer) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

นำ cDNA ที่ได้มาสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยเติม dH₂O, cDNA 3 ไมโครลิตร เติมสารให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นดังนี้ 1x PCR buffer, 0.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTPs, ไพรเมอร์ละ 0.5 ไมโครโมล และ 0.05 Unit Taq polymerase จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิค PCR โดย pre-heating ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที และทำปฏิกริยาอีก 35 รอบโดยยีน NSs ใช้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ส่วนยีน N ใช้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที และ extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อให้ขั้น extension สมบูรณ์ จากนั้นนำมาตรวจสอบผลผลิตด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 40 นาที และย้อมด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV-transilluminator

7. การโคลนยีน

7.1 การโคลนยีนที่เพิ่มปริมาณได้จากปฏิกิริยา RT-PCR

โคลนยีน โดยเชื่อมต่อดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR เข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy (Promega) โดยเติมดีเอ็นเอผลิตภัณฑ์ 150 นาโนกรัม 1x T4 DNA ligase buffer, pGEM-T easy vector 50 นาโนกรัม และ 3 Unit T4 DNA ligase ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน หยดปฏิกิริยาด้วย 0.2 M EDTA ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำการส่งผ่านพลาสมิดสายผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α โดยวิธี Heat-shock และเติมอาหารเหลว LB ที่ปราศจาก ampicillin ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำส่วนผสม 100 ไมโครลิตร spread บนจานอาหารแข็ง LB ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่ง spread ด้วย 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับ Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 20 mM ไว้ก่อนแล้ว เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน สุ่มคัดเลือกพลาสมิดสายผสมโดยนำโคโลนีที่มีสีขาวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ที่เติม ampicillin นานข้ามคืน จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Boiling (Holmes and Quigley, 1981) และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อปริมาณ 30 ไมโครลิตร

ใช้เทคนิค PCR ในการคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นส่วนของยีน NSs ด้วยสายไพรเมอร์จำเพาะ CaCV-NSsF และ CaCV-NSsR หรือย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1-2 ชั่วโมง ส่วนยีน N ใช้เทคนิค PCR และไพรเมอร์ CaCV-CP-NR2 และ 3'V Tospo gIV ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนยีนที่ได้ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide และตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยใช้ UV-transilluminator

7.2 การเชื่อมต่อยีน NSs เข้ากับพลาสมิด pQE-80L เพื่อสังเคราะห์โปรตีน

สกัดพลาสมิดจากโคลนแบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่มีชิ้นส่วนของยีนสอดแทรกอยู่ แยกชิ้นส่วนยีน NSs จาก pGEM-T easy vector โดยตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III ตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนยีนด้วย 1% agarose gel electrophoresis แยกดีเอ็นเอออกจากเจลเพื่อนำไปเชื่อมต่อเข้าสู่พลาสมิดพาหะสำหรับสังเคราะห์โปรตีน pQE-80L expression vector ใน

ตำแหน่งตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III การเชื่อมต่อทำโดยผสมชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน NSs 150 ไมโครลิตร พลาสมิด pQE-80L 50 นาโนกรัม 1x T4 DNA ligase buffer และ T4 DNA ligase 3 Unit ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ส่งถ่ายพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ *E. coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock และเติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง นำส่วนผสม 100 ไมโครลิตร spread บนจานวุ้นอาหารแข็ง LB ที่เติม ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน คัดเลือกพลาสมิดสายผสมโดยเพาะเลี้ยงโคโลนีในอาหารเหลว LB ที่เติม ampicillin นานข้ามคืน จากนั้นสกัดพลาสมิดด้วยวิธี Boiling และละลายตะกอนด้วยน้ำกลั่นหนึ่งมา เชื้อปริมาณ 30 ไมโครลิตร ทำการคัดเลือกโคลน และตรวจสอบทิศทางการเชื่อมต่อของยีน NSs กับพลาสมิด pQE-80L โดยเทคนิค PCR ด้วยสายไพรเมอร์จำเพาะ CaCV-NSsF และ CaCV-NSsR หรือย่อยพลาสมิดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และ *Hind*III แล้วนำโคลนที่ได้ไปทดสอบการสังเคราะห์โปรตีน NSs

8. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีน NSs

นำพลาสมิดสายผสมที่คัดเลือกได้ส่งวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs และ N ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer ที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs จึงออกแบบสายไพรเมอร์ เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงกลางยีน จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนด้วยโปรแกรม DNA Star แล้วเปรียบเทียบกับเชื้อทอสปอไวรัสที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (ตารางที่ 2) ด้วยโปรแกรม ClustalW จากนั้นสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA package version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004)

9. การตรวจสอบการสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ของโคลน pQE-80L ที่มียีน NSs

เพาะเลี้ยงโคลนจากพลาสมิด pQE-80L สายผสมที่มียีน NSs สอดแทรกอยู่ และโคลนที่ไม่มียีน NSs ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ปริมาณ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า นานข้ามคืน จากนั้นวัดค่า A_{600} ให้ได้ 0.5-0.7 และนำมา 2.5 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งเติมยาปฏิชีวนะไว้แล้ว และเติม IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เพื่อชักนำให้

มีการสร้างโปรตีน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่านาน 4-5 ชั่วโมง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ละลายตะกอนด้วย Lysis buffer, pH 8.0 (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติม Lysozyme ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในน้ำแข็งนาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-30 นาที จากนั้นละลายตะกอนด้วย Lysis buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร สารละลายโปรตีนที่ได้นำมา 5 ไมโครลิตร และเติม 2X SDS-PAGE buffer (90 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 2% SDS, 20 mM Bromophenol blue, 100 mM DTT) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที และตรวจน้ำหนักโปรตีนด้วย sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ใช้ 5% stacking gel และ 12% separating gel จากนั้นปล่อยให้กระแสไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ นาน 50 นาที และเปลี่ยนเป็น 100 โวลต์ นาน 100 นาที ย้อมเจดด้วย 0.2% coomassie brilliant blue-R250 นาน 10 นาที และล้างด้วย destaining solution นาน 15 นาที จำนวน 3 ครั้ง หรือจนกว่าจะเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

10. การสังเคราะห์โปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs และวิธีแยกสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์

คัดเลือกโคลนที่ให้ผลบวกจากข้อ 9 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร 2xYT ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin อัตรา 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า นานข้ามคืน จากนั้นเติมลงในอาหาร 2xYT ที่เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:30 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า นาน 2 ชั่วโมง หรือวัดค่า A_{600} ให้ได้ 0.5 และเติม IPTG ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 mM เพื่อชักนำให้สังเคราะห์โปรตีน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่า นาน 10 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้ง และเก็บตะกอนเซลล์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

เตรียม clear lysate จากตะกอนเซลล์ และสกัดโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วย native condition โดยนำตะกอนเซลล์จาก -20 องศาเซลเซียส มาแช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที เติม Lysis buffer ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และเติม lysozyme ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้ว sonicate ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ นาน 10 วินาที สลับกับหยุด 10 วินาที จำนวน 10 ครั้ง โดยต้องรักษาความเย็นตลอดเวลา จากนั้นปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นาน

10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนไว้วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE นำส่วนใสมาเติม 50% Ni-NTA agarose (Qiagen) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยวางในอ่างน้ำแข็ง และเขย่านาน 1 ชั่วโมง นำ Ni-NTA agarose ที่จับกับ recombinant protein มาใส่ลงใน column โดยปิดปลายไว้ก่อน จากนั้นนำฝาปิดออก และเก็บส่วนใสที่ไหลผ่าน column ไว้วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE หลังจากนั้นล้าง column ด้วย Wash buffer จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 8 มิลลิลิตร เก็บส่วนใสที่ไหลผ่าน column ไว้วิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ชะล้างโปรตีนออกจาก column ด้วย Elution buffer ปริมาตร 4 มิลลิลิตร โดยเก็บส่วนใสที่ไหลผ่าน column ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร รวมทั้งหมด 8 fractions นำไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และหาปริมาณโปรตีนโดย Bradford's method (Bradford, 1976)

11. การผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน 6xHis-NSs

11.1 การฉีดกระตุ้นสัตว์ทดลอง และเก็บแอนติบอดี

ผลิต polyclonal antibody ต่อโปรตีน 6xHis-NSs โดยใช้กระต่าย New Zealand white อายุประมาณ 2 เดือน จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ก่อนการกระตุ้น กระต่ายให้สร้างภูมิคุ้มกัน เก็บ normal serum โดยเข็ดหลังใบหูด้วย 70% ethanol และเจาะเลือด ปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อใช้เปรียบเทียบปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป เตรียมแอนติเจนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันครั้งแรกโดยใช้โปรตีน 6xHis-NSs บริสุทธิ์ปริมาณ 500 ไมโครกรัม ละลายใน phosphate-buffered saline (PBS) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (v/v) และผสมกับ complete Freund's adjuvant (CFA) ในสัดส่วน 1:1 (v/v) ฉีดกระตุ้นด้วยวิธี subcutaneous injection (SC) บริเวณต้นคอด้านหลัง 5 จุด ๆ ละ ประมาณ 200 ไมโครลิตร เว้นระยะห่างหนึ่งสัปดาห์จึงกระตุ้นภูมิคุ้มกันซ้ำด้วยการเตรียมแอนติเจน ปริมาณเท่าเดิมใน incomplete Freund's adjuvant (IFA) จากนั้น 2 สัปดาห์ เจาะเลือดใส่ปีเกอร์หลอดเชื้อเพื่อเก็บแอนติบอดีปริมาณ 30 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ นาน 5 สัปดาห์ แต่ละครั้งจะแยก แอนติบอดีจากเม็ดเลือดโดยวางเลือดในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และปั่นตกตะกอนที่ ความเร็วประมาณ 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเก็บแอนติบอดีซึ่งเป็นส่วนใสด้านบนในขวดซีรัม โดยเติม NaN_3 ความเข้มข้นสุดท้าย 0.2% (v/v) เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรีย เก็บแอนติบอดีที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11.2 การตรวจสอบค่าไตเตอร์

ตรวจสอบค่าความเจือจางสูงสุด (dilution end point) และค่าไตเตอร์ (titer) (<http://www.komabiotech.com/technical/protocol/ELISA.htm>) ของแอนติบอดีด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยเตรียมโปรตีน 6xHis-NSs ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วปริมาณ 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นแอนติเจนสำหรับ coat ในหลุม ELISA plate ทำการเจือจางแอนติบอดีแบบ 2-fold dilution เริ่มจาก 10^{-2} ถึง 10^{-6} เพื่อใช้เป็น primary antibody และ Alkaline phosphatase conjugated-Goat anti rabbit IgG เป็น secondary antibody ด้วยเทคนิค DAC-ELISA เปรียบเทียบกับ normal serum ที่ความเจือจาง 1:200

12. การทดสอบประสิทธิภาพของแอนติบอดีในการวินิจฉัยเชื้อทอสปอไวรัส

12.1 การหาค่าไตเตอร์ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs ในน้ำคั้นพืชเป็นโรค

ตรวจสอบค่า ELISA titer (<http://www.komabiotech.com/technical/protocol/ELISA.htm>) ของแอนติบอดีที่ผลิตได้ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs ในน้ำคั้นพืชเป็นโรค เปรียบเทียบกับพืชปกติ ด้วยเทคนิค DAC-ELISA

12.2 การทดสอบความจำเพาะต่อเชื้อ CaCV

ทดสอบประสิทธิภาพ และความจำเพาะ ของแอนติบอดีในการทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV ในน้ำคั้นพืชเป็นโรคร่วมกับพืชปกติ ด้วยเทคนิค DAC-ELISA เปรียบเทียบกับการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน N โดยพืชเป็นโรคที่ใช้ได้แก่ ใบถั่วลิสงติดเชื้อ CaCV ไอโซเลต PKK และ PPT ใบแดงโมติดเชื้อ WSMoV ได้รับจาก คุณเกื้อกุล บุญญานภาพวงศ์ บริษัท เจียไต๋ จำกัด จ.ราชบุรี และใบแคนตาลูปติดเชื้อ MYSV ได้รับจาก ผศ.ดร.รัชณี ธงประยูร ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

13. การจัดจำแนกชนิดเพลี้ยไฟ

เตรียมตัวอย่างเพลี้ยไฟเพื่อการทำสไลด์ (slide) กิ่งถาวร โดยย้ายเพลี้ยไฟตัวเต็มวัยซึ่งเก็บใน 70% ethanol ลงในสารละลาย AGA (60% ethanol, glycerine และ acetic acid อัตราส่วน

10:1:1) (ศิริณี, 2544) โดยสารละลาย AGA จะรักษาสภาพเพ็ลี่ยไฟ และทำให้วัยวะอ่อนนุ่ม เปลี่ยนสารละลาย AGA เป็น 60% ethanol แช่เพ็ลี่ยไฟไว้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนเป็น สารละลาย 5% NaOH เพื่อทำให้สีของเพ็ลี่ยไฟจางลง ในขั้นตอนนี้จะใช้เข็มขนาดเล็กเจาะบริเวณ ต้นขาหลังของเพ็ลี่ยไฟ เพื่อให้ของเหลวไหลออกจากตัวเพ็ลี่ยไฟ แล้วเปลี่ยนจากสารละลาย 5% NaOH เป็นน้ำกลั่น จากนั้นเปลี่ยนเป็นแช่ใน 50% ethanol นาน 30 ชั่วโมง 60% ethanol นาน 24 ชั่วโมง 70% ethanol นาน 1 ชั่วโมง และ 80, 95, 100% ethanol นาน 20, 10 และ 5 นาที ตามลำดับ แช่ตัวอย่างใน absolute ethanol อีกครั้ง นาน 5 นาที แล้วแช่ใน clove oil นาน 30 นาที เตรียมสไลด์ กิ่งถาวรภายใต้กล้อง stereo microscope โดยเขียนเพ็ลี่ยไฟที่ผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างแล้วลง บนสไลด์ หยด mineral oil ลงบนเพ็ลี่ยไฟ จัดหมวด ปีก และขาของเพ็ลี่ยไฟให้ตั้งฉากกับลำตัว แล้ว ประกบด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slip) ทาขอบกระจกปิดสไลด์ด้วยน้ำยาทาเล็บใส นำไปตรวจ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเพ็ลี่ยไฟภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope เพื่อจัด จำแนกชนิดตามวิธีการของศิริณี (2544) Palmer *et al.* (1989) และ Mound and Kibby (1998)

ตารางที่ 2 ชื่อย่อ accession number และชื่อโรกรูป ของเชื้อทอสโปไวรัส ที่ใช้วิเคราะห์สายสัมพันธ์ และสร้าง phylogenetic tree จากข้อมูลลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs และ N

เชื้อทอสโปไวรัส	ชื่อย่อ	Accession number	ชื่อโรกรูป
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	TSWV -BR-01	D00645	I
	TSWV-B	L12048	II
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	INSV-NL-07	X66972	III
<i>Watermelon silver mottle virus</i>	WSMoV-Germany	Z46419	IV
	WSMoV-DD6	AY864852	IV
	WSMoV-SL-Th	AY514624	IV
	WSMoV-SP29-Th	AY514625	IV
	WSMoV-T40-Th	AY514626	IV
	WSMoV-SN858-Th	AY514627	IV
	WSMoV-ML052-Th	AY514628	IV
	WSMoV-TK-Th	AY514629	IV
	WSMoV-PhNR-Th	AY626761	IV
	WSMoV-29246-Th	AY639644	IV
	WSMoV-Ph111-Th	AM113762	IV
	WSMoV-Ph113-Th	AM113763	IV
	WSMoV-W6411-Th	AM113764	IV
	WSMoV-W6412-Th	AM113765	IV
	<i>Capsicum chlorosis virus</i>	CaCV-CP	ABC86906
CaCV-AIT		NC_008301	IV
CaCV-Pepper		AY036057	IV
CaCV-PKK 2UD		AM087456	IV
CaCV-Pkk-Th		DQ022745	IV
CaCV-TD8-Th		AY647437	IV
<i>Thailand tomato tospovirus</i>	CaCV-ToK-Th	AY626762	IV
	CaCV-KS16	AF134400	IV

ตารางที่ 2 (ต่อ)

เชื้อทอสโปไวรัส	ชื่อย่อ	Accession number	ซีโรกรุ๊ป
<i>Gloxinia tospovirus</i>	Gloxinia	AF059577	IV
<i>Groundnut bud necrosis virus</i>	GBNV-Peanut	NC_003619	IV
	GBNV-Mungbean	AY871098	IV
<i>Calla lily chlorotic spot virus</i>	CCSV	AY867502	IV
<i>Iris yellow spot virus</i>	IYSV	AF001387	V
<i>Peanut yellow spot virus</i>	PYSV	AF013994	VI
<i>Melon yellow spot virus</i>	MYSV	NC_008300	unassigned
<i>Peanut chlorotic fan-spot virus</i>	PCFV	AF080526	unassigned
<i>Tomato yellow ring virus</i>	TYRV-S	DQ462163	unassigned
	TYRV-T	AY686718	unassigned
<i>Physalis severe mottle virus</i>	PSMoV	AF067151	unassigned

หมายเหตุ: unassigned คือ เชื้อทอสโปไวรัสที่ยังไม่ได้จัดซีโรกรุ๊ป

ผลและวิจารณ์

1. พีชที่ติดเชื้อ CaCV และการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส

จากการสำรวจแปลงเพาะปลูกถั่วลิสง อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา พบว่าถั่วลิสงมีอาการใบด่าง ค้างวงแหวน ใบอ่อนโค้งงอ บิดเบี้ยว จุดไหม้บนใบและลำต้น ทุกตัวอย่างให้ผลบวกกับแอนติบอดี PAb-A1 (ตารางที่ 3) หลังจากนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกมาปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนใบถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) แล้วประมาณ 3 วัน ปรากฏอาการจุดด่างสีเหลือง และประมาณ 5 วัน พบลักษณะค้างวงแหวนอย่างชัดเจน (ภาพที่ 3) และให้ผลบวกกับแอนติบอดี PAb-A1 (ตารางที่ 4) จากนั้นแยกจุดมาปลูกเชื้อหรือเพิ่มปริมาณไวรัสในต้นถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) สายพันธุ์ไททาน 9 ซึ่งเป็นพืชอาศัยแบบเชื้อไวรัสกระจายทั่วทั้งต้น ประมาณ 5-7 วัน ปรากฏอาการใบจุดด่างสีเหลือง ใบค้างวงแหวน และใบอ่อนโค้งงอ ให้ชื่อไอโซเลตเป็น PPT (ภาพที่ 3)

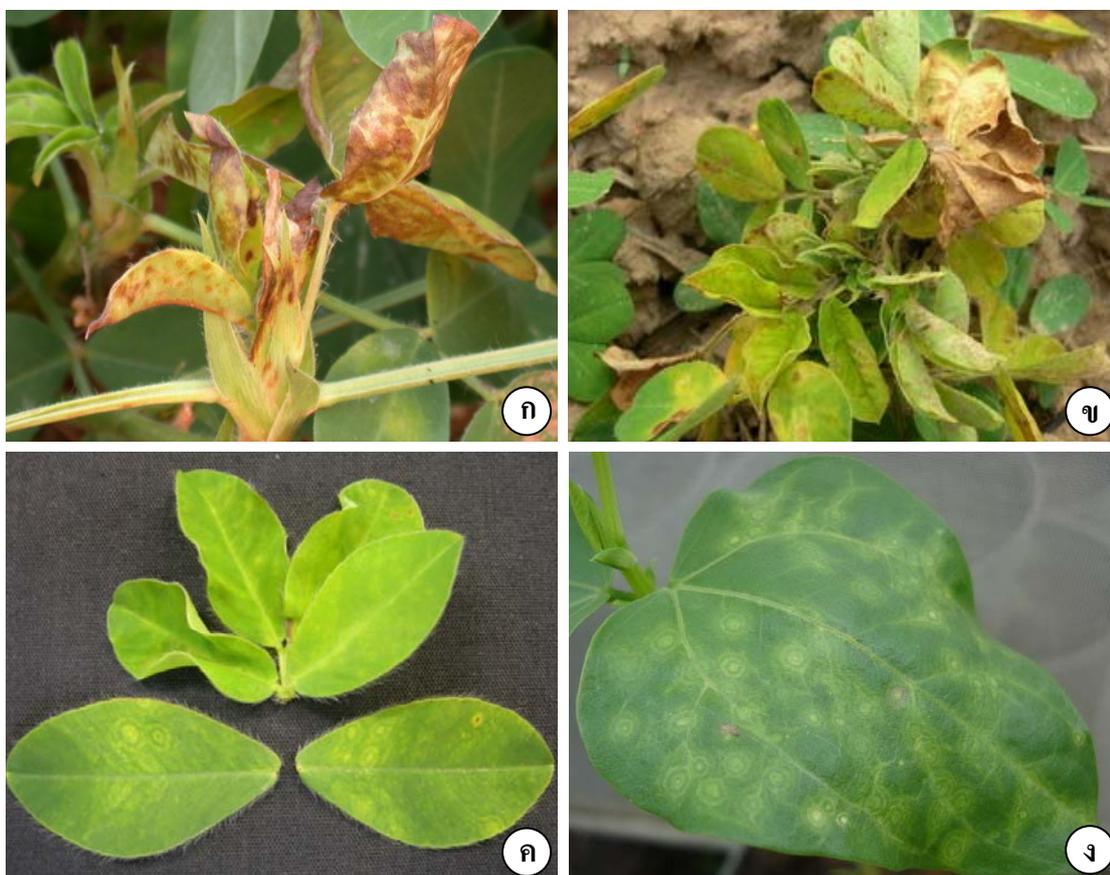
เชื้อ CaCV-PKK 2UD เพิ่มปริมาณในต้นถั่วลิสงสายพันธุ์ไททาน 9 ประมาณ 5-7 วัน ปรากฏอาการใบจุดด่างสีเหลือง ใบค้างวงแหวน และใบอ่อนโค้งงอ ส่วนต้นที่มีอาการรุนแรงจะยอดไหม้ และแห้งตายในเวลาประมาณ 20 วัน

ใบถั่วพุ่มที่ปลูกเชื้อทอสปอไวรัสไอโซเลต PPT แสดงอาการจุดด่างสีเหลือง และค้างวงแหวนเหมือนกันกับการปลูกด้วยเชื้อ CaCV-PKK เช่นกันกับต้นถั่วลิสงที่ปลูกเชื้อทอสปอไวรัสไอโซเลต PPT และเชื้อ CaCV-PKK 2UD ซึ่งแสดงอาการส่วนยอดโค้งลงมาคล้ายตะขอ หรืออาการใบค้างจุดวงแหวน ยอดไหม้ (ปิยาภรณ์ และคณะ, 2548; พิศสุวรรณ และคณะ, 2548)

2. การโคลนยีน และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโน

2.1 ยีน NSs

สายไพรเมอร์ CaCV-NSsF และ CaCV-NSsR สามารถเพิ่มปริมาณยีน NSs ของเชื้อ CaCV ซึ่งมีขนาดประมาณ 1,320 คู่เบส จากทั้งอาร์เอ็นเอรวมของเนื้อเยื่อใบถั่วลิสงไอโซเลต PKK 2UD และ PPT ได้ (ภาพที่ 4) เมื่อทราบลำดับนิวคลีโอไทด์จึงออกแบบสายไพรเมอร์ CaCV-303F (5'-AACACAGGCTGCTGCAAGTTCTCAATGC-3') เพื่อใช้ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงกลางของยีน NSs วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน NSs ของทั้งเชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-



ภาพที่ 3 อาการโรคบนใบถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) สายพันธุ์ไทนาน 9 และใบถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*)

- ก. อาการยอดไหม้ของถั่วลิสง ในแปลงปลูก อ. เมือง จ. อุตรธานี (PKK 2UD)
- ข. อาการยอดไหม้ของถั่วลิสง ในแปลงปลูก อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา (PPT)
- ค. อาการต่างวงแหวนสีเหลือง ยอดใบหงิก ของถั่วลิสง หลังการปลูกเชื้อที่พบในถั่วลิสง PPT นาน 7 วัน
- ง. อาการต่างวงแหวนสีเหลืองบนใบถั่วพุ่ม หลังการปลูกเชื้อที่พบในถั่วลิสง PPT นาน 7 วัน

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรุ๊ป IV ในตัวอย่างถั่วลิสง ที่เก็บจากแปลง
เพาะปลูกของเกษตรกร อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา (PPT) และไอโซเลต PKK 2UD
ด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยใช้แอนติบอดี PAb-A1 ที่ความเจือจาง 1:1,000

ตัวอย่างพืช	อาการ	ค่า A_{405}
ถั่วลิสง PPT-1	จุดสีเหลือง ใบไหม้	0.267
ถั่วลิสง PPT-2	ด่างเหลือง ใบไหม้	0.205
ถั่วลิสง PPT-3	ด่างวงแหวนสีเหลือง ยอดใบหงิก	0.272
ถั่วลิสง PPT-4	ด่างวงแหวนสีเหลือง ยอดใบหงิก	0.338
ถั่วลิสง PKK 2UD	จุดสีเหลือง ยอดใบหงิก ใบไหม้	0.467
ถั่วลิสงปกติ	-	0.084
Coating buffer	-	0.083

หมายเหตุ: - อ่านค่า A_{405} ที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

- ค่า A_{405} ของตัวอย่างที่มากกว่าพืชปกติ 2 เท่า ให้ผลเป็นบวก

ตารางที่ 4 ผลการตรวจวินิจฉัยเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุป IV ในตัวอย่างถั่วพุ่มที่ได้รับการปลูกเชื้อ
ทอสโปไวรัส ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA โดยใช้แอนติบอดี PAb-A1 ที่ความ
เจือจาง 1:1,000

พืชทดสอบ	อาการ	วันที่แสดงอาการ	ค่า A_{405}
ถั่วพุ่ม PPT-1	ค้างวงแหวนสีเหลือง	3-5 วัน	0.337
ถั่วพุ่ม PPT-2	ค้างวงแหวนสีเหลือง	3-5 วัน	0.251
ถั่วพุ่ม PPT-3	ค้างวงแหวนสีเหลือง	3-5 วัน	0.267
ถั่วพุ่มปกติ	-	-	0.060
Coating buffer	-	-	0.086

หมายเหตุ: - อ่านค่า A_{405} ที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

- ค่า A_{405} ของพืชทดสอบที่มากกว่าพืชปกติ 2 เท่า ให้ผลเป็นบวก

PKK 2UD มีความยาว 1,320 นิวคลีโอไทด์ สังเคราะห์โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 439 เรซิดิวส์ มีน้ำหนักโมเลกุล 49.6 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 5)

เชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-PKK 2UD มีระดับความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs กับเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรู๊ป IV อยู่ระหว่าง 76% (เชื้อ WSMoV-Germany) ถึง 90% identities (เชื้อ *Gloxinia tospovirus*) โดยเชื้อ *Gloxinia tospovirus* มีระดับความคล้ายคลึงกันสูงสุด ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV-PPT มีค่าความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 85% และ 88% identities ส่วนเชื้อ CaCV-PKK 2UD มีค่าความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 86% และ 89% identities กับเชื้อ CaCV-AIT และ CaCV-CP ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ส่วนเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรู๊ปอื่น ๆ และเชื้อที่ยังไม่ได้จัดซีโรกรู๊ปอยู่ในช่วง 10% (เชื้อ PYSV) ถึง 51% identities (เชื้อ TYRV-T)

ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์จาก phylogenetic tree ของเชื้อทอสโปไวรัสไอโซเลตต่าง ๆ จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs พบว่าสามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่มใหญ่ โดยกลุ่มแรกเป็นกลุ่มเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรู๊ป IV และเชื้อ CCSV, PSMoV และ MYSV กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มเชื้อซีโรกรู๊ป V และเชื้อ TYRV กลุ่มที่สามเป็นเชื้อซีโรกรู๊ป I, II และ III และกลุ่มที่สี่เป็นเชื้อซีโรกรู๊ป VI (ภาพที่ 8) ซึ่งเชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-PKK 2UD จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรู๊ป IV ที่ประกอบด้วย 2 กลุ่มย่อย โดยทั้งสองไอโซเลตจับกลุ่มสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *Gloxinia tospovirus*, CaCV-CP และ CaCV-AIT ในกลุ่มย่อยแรก แยกจากกลุ่มย่อยที่สองที่มีอีก 2 กิ่งย่อย คือ กิ่งย่อยของเชื้อ GBNV กับกิ่งย่อยของเชื้อ WSMoV นอกจากนี้พบว่าทั้งสองกลุ่มย่อยนี้จับกลุ่มแยกจากเชื้อ CCSV, PSMoV และ MYSV

ในการวิจัยครั้งนี้จัดเชื้อ CCSV เป็น outgroup ของเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรู๊ป IV เนื่องจากมีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs กับเชื้อในซีโรกรู๊ป IV เพียง 62-66% identities เท่านั้น แต่สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ CCSV ได้ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อในซีโรกรู๊ป IV (Lin *et al.*, 2005) เช่นเดียวกับรายงานของ Warin *et al.* (2005) ที่พบว่าเชื้อ MYSV มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อในซีโรกรู๊ป IV เพียง 47-50% identities แต่สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ CaCV และ WSMoV ได้ด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ MYSV

ยีน NSs ของเชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-PKK 2UD มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับยีน NSs ของเชื้อ CaCV-AIT จากมะเขือเทศ (Knierim *et al.*, 2006) และเชื้อ CaCV-CP จากถั่วลิสง

ในประเทศจีน (Chen *et al.*, 2006a) ค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-PKK 2UD กับเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรูป IV ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เชื้อ WSMoV, GBNV และเชื้อ *Gloxinia tospovirus* อยู่ที่ระดับ 76-90% identities ผลการวิเคราะห์ สอดคล้องกับรายงานของ Knierim *et al.* (2006) และ Chen *et al.* (2006a) ที่มีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs กับเชื้อ WSMoV, GBNV และ *Gloxinia tospovirus* ที่ระดับ 81-86% identities และ 80-82% identities กับเชื้อ CaCV-AIT และ CaCV-CP ตามลำดับ

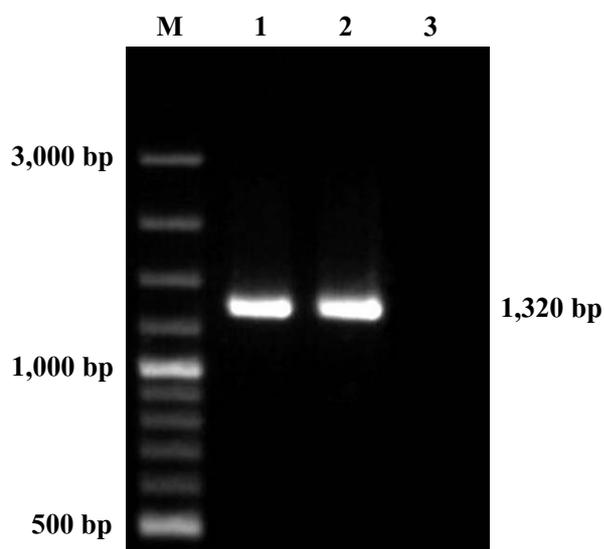
นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์จาก phylogenetic tree ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs สามารถจัดเชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-PKK 2UD ไว้ในซีโรกรูป IV (ภาพที่ 8) โดยจับกลุ่มกับเชื้อ *Gloxinia tospovirus*, CaCV-CP และ CaCV-AIT สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N

2.2 ยีน N

สายไพรเมอร์ CaCV-CP-NR2 และ 3'V Tospo gIV สามารถเพิ่มปริมาณยีน N ที่มีขนาด 828 คู่เบส ของเชื้อ CaCV จากอาร์เอ็นเอรวมของเนื้อเยื่อใบถั่วลิสงไอโซเลต PPT ได้ (ภาพที่ 6) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน N ของเชื้อ CaCV-PPT มีความยาว 828 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้กรดอะมิโน 275 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 7)

เชื้อ CaCV-PPT มีระดับความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N จากการจัดทำ multiple alignment กับเชื้อทอสปอไวรัสในซีโรกรูป IV อยู่ระหว่าง 81% (เชื้อ GBNV) ถึง 96% identities (เชื้อ *Gloxinia tospovirus*) โดยมีค่าความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ CaCV-PKK 2UD, CaCV-AIT และ CaCV-CP ที่ระดับ 98, 92 และ 90% identities (ตารางที่ 6)

ผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ของเชื้อ CaCV-PPT กับเชื้อทอสปอไวรัสชนิดต่าง ๆ ในซีโรกรูป IV และซีโรกรูปอื่น ๆ จาก phylogenetic tree ที่สร้างขึ้นจากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N จัดเชื้อ CaCV-PPT อยู่ในกลุ่มเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรูป IV ซึ่งเชื้อ CaCV เกาะกลุ่มใกล้ชิดกัน แยกจากเชื้อ WSMoV และ GBNV โดยทั้งสามเชื้อแยกจากเชื้อ CCSV, MYSV และ PSMoV (ภาพที่ 8) สอดคล้องกับรายงานของ Chen *et al.* (2006a) และ Knierim *et al.* (2006) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 4 เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,320 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้น NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ไอโซเลต CaCV-PKK 2UD และ CaCV-PPT ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ CaCV-NSsF และ CaCV-NSsR และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากใบถั่วลิสงเป็นต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)

ช่อง 1 = อาร์เอ็นเอของไอโซเลต PKK 2UD

ช่อง 2 = อาร์เอ็นเอของไอโซเลต PPT

ช่อง 3 = อาร์เอ็นเอของถั่วลิสงปกติ

	M S T A K S A A S E F V K S Y G T R D N R A I N D C Y S V F N G E G V N F L N L	
PKK 2UD	ATGTCTACTGCAAAGAGTGTGCTTTCAGAAATTTGTGAAGAGCTATGGAACAAGGGATAATAGAGCTATCAATGATTGCTATTCTGTATTCAATGGAGAAGGTGTCAA TTTCTT CAATCTG	120
PPT	ATGTCTACTGCAAAGAGTGTGCTTTCAGAAATTTGTGAAGAGCTATGGAACAAGGGATAATAGAGCTATCAATGATTGCTATTCTGTATTCAATGGAGAAGGTGTCAA CTTTC CAATCTG	120
	M S T A K S A A S E F V K S Y G T R D N R A I N D C Y S V F N G E G V N F P N L	
	F M H N N A G I K S A F S I N D L G R N E D I K I H E A E V V D T C H D Y N Y F	
PKK 2UD	TTCATGCATAACAATGCAGGTATTAATCTGCATTCAGCATCAATGATTTGGGAAGGAATGAAGATATCAAAATCCATGAAGCTGAGGTT G TGATACATGCCATGATTATAATTACTTT	240
PPT	TTCATGCATAACAATGCAGGTATTAATCTGCATTCAGCATCAATGATTTGGGAAGGAATGAAGATATCAAAATCCATGAAGCTGAGGTT A TGATACATGCCATGATTATAATTACTTT	240
	F M H N N A G I K S A F S I N D L G R N E D I K I H E A E V I D T C H D Y N Y F	
	E K F G L D I T F C E H V M S L V V R K P G I K N T G C K F S M H N Q I F N P N	
PKK 2UD	GAGAAATTTGGTTTAGACATAACATTCTGTGAACAT G TGATGAGTTTGGTCGTAAGGAAACCTGGCATAAAGAACACAGGCTGCAAGTTCTCAATGCATAATCAGATCTTCAATCCAAT	360
PPT	GAGAAATTTGGTTTAGACATAACATTCTGTGAACAT G AATGAGTTTGGTCGTAAGGAAACCTGGCATAAAGAACACAGGCTGCAAGTTCTCAATGCATAATCAGATCTTCAATCCAAT	360
	E K F G L D I T F C E H E M S L V V R K P G I K N T G C K F S M H N Q I F N P N	
	A N T L S I A P G T T L E E G F Y E K S K I K P I E L L P S D W C L D E C W K N	
PKK 2UD	GCC A ATACCTTGTCTATTGCTCCGGGAAC G ACCCTAGAGGAAGGTTT CT ATG A AAAAAGTAAGATAAAACCCATCGAGCTCCTTCCCTCAGACTGGTGCTTGGATGAATGCTGGAAGAAC	480
PPT	GCC G ATACCTTGTCTATTGCTCCGGGAAC A ACCCTAGAGGAAGGTTT TC ATG A AAAAAGTAAGATAAAACCCATCGAGCTCCTTCCCTCAGACTGGTGCTTGGATGAATGCTGGAAGAAC	480
	A D T L S I A P G T T L E E G F H E K S K I K P I E L L P S D W C L D E C W K N	
	N F Y I A T N G D F A L D Y G F S V M G K T T S Y W R E N I S R E K I L S F K H	
PKK 2UD	AAATTTTACATAGTACTAATGGAG A CTTTG C TTGGATTATGGATTCTCTG T AATGGGTAAACAACCTT C TACTGGAGAGAGAACATCTCT A GGGAAAAGAT C TTATCTTTCAAACAT	600
PPT	AAATTTTACATAGTACTAATGGAG G CTTTG C ATTGGATTATGGATTCTCTG T ATGGGTAAACAACCTT C TACTGGAGAGAGAACATCTCT G GGGAAAAGAT T TTATCTTTCAAACAT	600
	N F Y I A T N G G F A L D Y G F S V M G K T T S Y W R E N I S G E K I L S F K H	
	K S L P D N T V P T N R L L S P S T V K G I Q L G S E L A P E T T I I C H A N K	
PKK 2UD	AAAAGTCTCCCTGATA A TACT G TCCAACCAATAGGTTGTTATCC CC ATCTACTG T AAAGGCATTCAGTTGGTTCTGAGCTAGCTCCTGAACTACAATTATTTGTCATGCAAACAAA	720
PPT	AAAAGTCTCCCTGATA A ACT G TCCAACCAATAGGTTGTTATCC AC ATCTACTG T AAGAGGCATTCAGTTGGTTCTGAGCTAGCTCCTGAACTACAATTATTTGTCATGCAAACAAA	720
	K S L P D K T G P T N R L L S T S T V R G I Q L G S E L A P E T T I I C H A N K	

ภาพที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ไอโซเลต CaCV-PKK 2UD และ CaCV-PPT ที่วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNA star อักษรสีแดง คือ นิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน และสีน้ำเงิน คือ กรดอะมิโนที่ต่างกัน

N L S I D L K S Q Y R I S F H G I Q E E G A F A R T F C I P F E N K S R M I C F
 PKK 2UD AATCTT**A**GTATTGATCTAAAATCTCAGTATCGCATTT**C**ATT**C**CATGG**A**ATTCAAGAGGAAGGTGCTTTT**G**CTAGAAC**T**TTCTGCATTCCCTTTGAAAACAAATCTAGAATGATTTGCTTT 840
 |||
 PPT AATCTT**G**GTATTGATCTAAAATCTCAGTATCGCATTT**T**CATGG**T**ATTCAAGAGGAAGGTGCTTTT**G**CTAGAAC**T**TTCTGCATTCCCTTTGAAAACAAATCTAGAATGATTTGCTTT 840
 N L G I D L K S Q Y R I S F H G I Q E E G A F A R T F C I P F E N K S R M I C F

 Y A K T V A D N S N E R T T L I I K I V T K T V D S H S M R P N K N L F N C N K
 PKK 2UD TATGCAAAGACAGTTGCTGACAA**T**AGCAATGAAAGAACA**A**CTTTAATTATAAAAATAGTCACAAAGACTGTTGACTCTCATTCAATGAGACCTAAC**A**AAAAT**C**TTTCAACTGCAATAAA 960
 |||
 PPT TATGCAAAGACAGTTGCTGACAA**C**AGCAATGAAAGAACA**A**CTTTAATTATAAAAATAGTCACAAAGACTGTTGACTCTCATTCAATGAGACCTAAC**G**AAAT**C**ATCAACTGCAATAAA 960
 Y A K T V A D N S N E R T T L I I K I V T K T V D S H S M R P N R N H I N C N K

 L L G A K I G L I D F C D S D P N Y N Q M I V K E L L S V H T Q F A L N L S G T
 PKK 2UD CTGTT**G**GGAGCAA**A**AATTGGTTT**G**ATTGATTTTGTGATTCTGATCCAAATTATAATCAGATGATTGT**T**AAAGAGCTGTTAAGTGTT**C**ATA**C**CAATTTGCACTCA**C**CTATCT**G**GGACA 1080
 |||
 PPT CTGTT**A**GGAGCAA**G**AATTGGTTT**A**GTGATTTTGTGATTCTGATCCAAATTATAATCAGATGATTGT**A**AGGAGCTGTTAAGTGTT**C**ATA**C**CAATTTGCACTCA**A**TCTATCT**A**GGACA 1080
 L L G A R I G L V D F C D S D P N Y N Q M I V K E L L S V H T Q F A L N L S R T

 L E K P I I V F K M Y D K E L I N G H V E V S G R I L N Y Q V D A D G N V Y F L
 PKK 2UD TTGGAAAAAC**A**ATCATTGTATTCAAGATGTATGATAAGGAATTGATAAATGGGCATGTAGAAGTTT**C**AG**G**AGGATTCTGAATTACCAGGTAGATGCTGACGGAAATGTTTATTTTCTC 1200
 |||
 PPT TTGGAAAAAC**T**ATCATTGTATTCAAGATGTATGATAAGGAATTGATAAATGGGCATGTAGAAGTTT**C**AG**G**AGGATTCTGAATTACCAGGTAGATGCTGACGGAAATGTTTATTTTCTC 1200
 L E K P I I V F K M Y D K E L I N G H V E V S G R I L N Y Q V D A D G N V Y F L

 S K T L E V L P R S L S T L S Y L N S V A P T L W K E S L E H Q H F I V E L K Stop
 PKK 2UD TC**A**AAAAAC**C**CT**G**GAG**G**T**C**CTCCCAAGATCCCTATCA**A**C**T**TTAAGTTACTTAAATAGTGTGCACCAACACTATGGAAAGAATCCTTAGAGCATCAACACTTTTATTGTGGAGCTTAAATAA 1320
 |||
 PPT TC**G**AAAAAC**C**CT**T**GAG**G**T**A**CTCCCAAGATCCCTATCA**A**C**T**TTAAGTTACTTAAATAGTGTGCACCAACACTATGGAAAGAATCCTTAGAGCATCAACACTTTTATTGTGGAGCTTAAATAA 1320
 S K T L E V L P R S L S T L S Y L N S V A P T L W K E S L E H Q H F I V E L K Stop

ภาพที่ 5 (ต่อ)

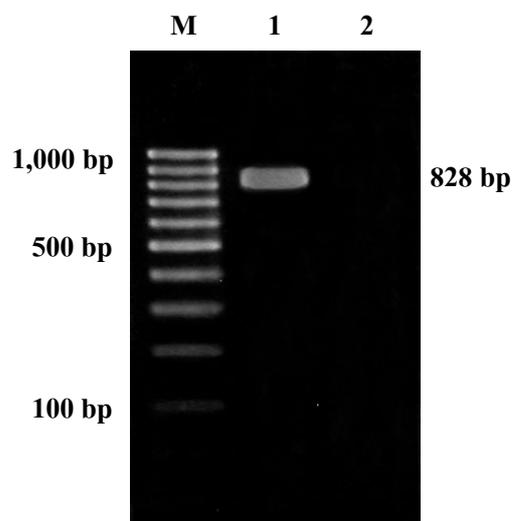
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ไอโซเลต CaCV-PKK 2UD และ CaCV-PPT กับเชื้อทอสโปไวรัสชนิดอื่น ๆ

Serogroup	I		II		III		IV						V		VI		Unassigned								
	TSWV- BR-01	TSWV- B	INSV- NL-07	GBNV- Muangb	GBNV- Peanut	Gloxinia	WSMoV- Germany	WSMoV- DD6	CaCV- AIT	CaCV- CP	CaCV- PKK2UD	CaCV- PPT	CCSV	IYSV	PYSV	PSMoV	MYSV	PCFV	TYRV-S	TYRV- T					
TSWV-BR-01		77	51	14	13	13	11	12	14	14	14	13	14	13	8	13	13	9	16	16					
TSWV-B			53	18	17	17	15	16	17	17	15	15	19	21	12	13	16	11	22	22					
INSV-NL-07				15	17	17	15	16	17	15	15	15	14	18	12	17	18	12	18	21					
GBNV-Mungbean					98	81	82	83	81	82	80	79	65	48	12	49	50	12	50	48					
GBNV-Peanut						80	82	83	80	81	79	79	66	49	11	49	50	14	50	49					
Gloxinia							76	77	86	89	90	90	61	50	10	47	47	12	51	51					
WSMoV-Germany								95	78	77	78	76	62	47	8	49	49	11	49	48					
WSMoV-DD6									80	79	79	77	64	48	12	49	50	12	50	49					
CaCV-AIT										88	86	85	64	52	9	48	48	13	52	52					
CaCV-CP											89	88	64	50	9	48	48	16	51	51					
CaCV-PKK 2UD																94	62	51	12	47	48	15	51	51	
CaCV-PPT																	62	50	10	47	47	14	50	51	
CCSV																									
IYSV																									
PYSV																									
PSMoV																									
MYSV																									
PCFV																									
TYRV-S																									

ในการศึกษาครั้งนี้จัดเชื้อ CCSV เป็น outgroup ของเชื้อทอสโพอไวรัสซีโรกรู๊ป IV เนื่องจากมีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N กับเชื้อในซีโรกรู๊ป IV เพียง 62-66% identities เท่านั้น แต่สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ CCSV ได้ด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อในซีโรกรู๊ป IV (Lin *et al.*, 2005) เช่นเดียวกันกับรายงานของ Warin *et al.* (2005) ที่พบว่าเชื้อ MYSV มีความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อในซีโรกรู๊ป IV เพียง 57-59% identities แต่สามารถตรวจวินิจฉัยเชื้อ CaCV และ WSMoV ได้ด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อ MYSV

การจัดทำ multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อ CaCV-PPT กับเชื้อทอสโพอไวรัสซีโรกรู๊ป IV ไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในประเทศไทย พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N อยู่ระหว่าง 81-97% identities และมีค่าความคล้ายคลึงกันในระดับสูงกับเชื้อ CaCV ไอโซเลตที่พบในประเทศไทย (89-97% identities) (ตารางที่ 7) พบว่าเชื้อ CaCV-PTT มีค่าความคล้ายคลึงสูงสุดกับเชื้อ CaCV อีก 3 ไอโซเลต จากถั่วลิสง จ. อุรธานี (PKK 2UD) และ จ. ขอนแก่น (Pkk) และไอโซเลตจากมะเขือเทศ จ. กาฬสินธุ์ (ToK) ที่ระดับ 97% identity รองลงมา ได้แก่ เชื้อ *Gloxinia tospovirus* และ CaCV ไอโซเลตจากพริก ประเทศออสเตรเลีย ที่ระดับ 96% identity นอกจากนี้ยังมีความคล้ายคลึงกับไอโซเลตจากมะเขือเทศ (KS16, TD8 และ AIT) ที่ระดับ 89-92% identities และถั่วลิสงจากประเทศจีน ที่ระดับ 90% identity แสดงให้เห็นว่าเชื้อ CaCV มีความหลากหลาย

phylogenetic tree ของเชื้อทอสโพอไวรัสซีโรกรู๊ป IV ไอโซเลตต่าง ๆ ที่พบในประเทศไทย ที่มีรายงานในปัจจุบัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อทอสโพอไวรัสซีโรกรู๊ป IV จัดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มเชื้อ WSMoV ที่พบจากแคนตาลูป มะเขือเทศ พริกหวาน แตงโม และโทงเทง โดยมีเชื้อ GBNV จากถั่วลิสงประเทศอินเดีย เป็น outgroup และกลุ่มเชื้อ CaCV (ภาพที่ 9) ที่มีเชื้อ CaCV ไอโซเลต CP จากถั่วลิสง ประเทศจีน แยกตัวออกจากกลุ่มของเชื้อ CaCV ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ในกลุ่มย่อยแรก มีเชื้อ 3 ไอโซเลต ทั้งหมดพบในมะเขือเทศในประเทศไทย และกลุ่มย่อยที่สอง ซึ่งประกอบด้วยไอโซเลต PPT จับกลุ่มใกล้ชิดกับไอโซเลต PKK 2UD, Pkk และ ToK ที่พบในถั่วลิสง มะเขือเทศ ในประเทศไทย รวมทั้งเชื้อ *Gloxinia tospovirus* จากประเทศสหรัฐอเมริกา และเชื้อ CaCV จากพริก ของประเทศออสเตรเลีย กลุ่มเชื้อ CaCV นี้ แยกออกจากกลุ่มเชื้อ WSMoV



ภาพที่ 6 เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 828 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณชิ้น N ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ไอโซเลต CaCV-PPT ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ CaCV-CP-NR2 และ 3'V Tospo gIV และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากใบถั่วลิสงเป็นต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder, Fermentas)

ช่อง 1 = อาร์เอ็นเอของถั่วลิสงเป็นโรค

ช่อง 2 = อาร์เอ็นเอของถั่วลิสงปกติ

M S T V R Q L T E K K I R E L L A G G T ATGCTACCGTGAGGCAGCTTACCGAGAAGAAAATTAGAGAACTTTTGGCTGGTGGA	60
A D V E I E T E D S T P G F S F K T F Y GCAGATGTTGAAATTGAGACTGAGGATTCAACTCCTGGATTCAAGACATTCTAT	120
D N N K S V E M T F T N C L N I L K C R GATAATAACAAGAGCGTTGAAATGACTTTCACAACTGTCTTAATATTTGAAGTGTAGA	180
K Q I F A A C K S G K Y K F C E K T I V AAGCAGATTTTGTGCTTGCAAAAGTGAAAGTATAAGTTCGTGAAAAACAATTGTT	240
S T D A N V G P E D W T F K R T E A L I TCTACTGACGCTAATGTTGGTCCAGAGATTGGACTTTAAGAGAACAGAAGCTTTAATA	300
R V K M I N M V E K S K N E S A K Q E M AGAGTTAAGATGATCAACATGGTAGAAAAGTAAGAATGAAAGTGCTAAGCAAGAGATG	360
Y A K V M E L P L V A A Y G L N I P A L TATGCAAAGGTGATGGAATTACCTTTAGTGGCAGCATATGGATTGAACATACCTGCTTTG	420
F D S C A L R M M L C I G G P L P L L S TTTGATTCATGTGCTCTCAGGATGATGTTATGTATTGGTGGTCTCTACCCTATTATCC	480
S I K G L A P I F F P L A F S Q S V K K AGTATTAAGGCCTTGCCCCAATTTTTTCCATTAGCTTTTCCCAAAGTGTTAAAAA	540
E K L G I K N F S T Y E Q V C K V A K V GAAAAATTGGGCATCAAAAACCTTCTCTACCTATGAACAGGTTTGCAAAGTGGCTAAAGTT	600
L S A S Q I E F K E D L N T L F K Q A V CTTTCGCTTCTCAAATAGAATTTAAAGAAGATCTGAACACATTGTTCAAACAGGCTGTT	660
K L L S E S N P G T A S S I S L K K Y D AAGTTGCTTAGTGAAAGCAACCCTGGTACTGCTAGTTCTATCTCACTTAAGAAGTATGAT	720
E Q V K Y M D K A F S A N L S V D D Y G GAGCAAGTCAAGTATATGGACAAAGCGTTTAGTGCCAATTTGTCTGTGGATGATTATGGT	780
V H S K K S S K A S T S I E V Stop GTTCAATCAAAGAAGAGCTCAAAGGCTAGTACTTCTATAGAGGTGTAA	828

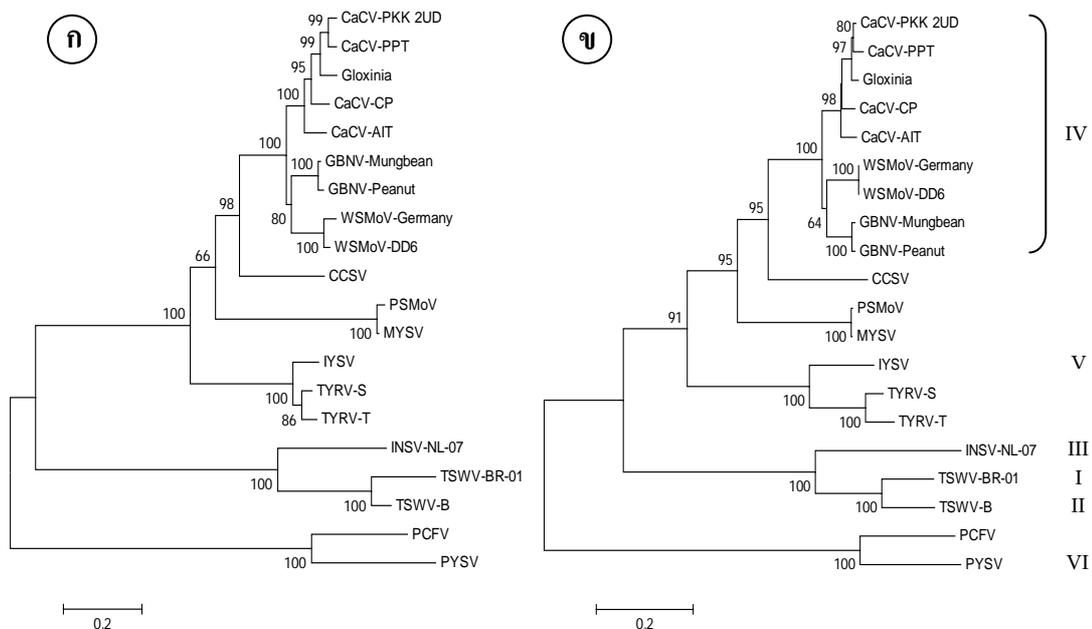
ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน N ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ไอโซเลต CaCV-PPT

ยีน N ของเชื้อ CaCV-PPT จากการวิจัยครั้งนี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับยีน N ของเชื้อ CaCV-PKK 2UD จากถั่วลิสง จ. อุครธานี และเชื้อ CaCV ไอโซเลตอื่น ๆ ที่พบในประเทศไทย (วิมล และคณะ, 2547; พิศสุวรรณ และคณะ, 2548; Knierim *et al.*, 2006) รวมทั้ง CaCV จากพริก ในประเทศออสเตรเลีย และเชื้อ CaCV-CP จากถั่วลิสงในประเทศจีน (Chen *et al.*, 2006a) ค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อ CaCV-PPT กับเชื้อ CaCV ไอโซเลตต่าง ๆ อยู่ที่ระดับ 90-97% identities ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (วิมล และคณะ, 2547; พิศสุวรรณ และคณะ, 2548; Chen *et al.*, 2006a; Knierim *et al.*, 2006) นอกจากนี้ค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อ CaCV-PPT กับเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรูป IV ได้แก่ เชื้อ GBNV, WSMoV และเชื้อ *Gloxinia tospovirus* ที่ระดับ 81-96% identities สอดคล้องกับรายงานของ Knierim *et al.* (2006) และ Chen *et al.* (2006a) ที่มีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs กับเชื้อ WSMoV, GBNV และ *Gloxinia tospovirus* ที่ระดับ 85-92% identities และ 82-92% identities กับเชื้อ CaCV-AIT และ CaCV-CP ตามลำดับ

มีรายงานที่เสนอข้อสังเกตว่า การจับกลุ่มสายสัมพันธ์ของทอสปอไวรัสด้วยข้อมูลยีนและโปรตีน N คล้อยตามแหล่งที่มาของไวรัส ทำให้แบ่งเชื้อทอสปอไวรัสได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ในภูมิภาค Eurasian และ Asian (Silva *et al.*, 2001) ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นแนวโน้มการจับกลุ่มย่อยของเชื้อ CaCV ตามแหล่งที่พบเชื้อ มากกว่าจะแบ่งตามพืชอาศัย อย่างไรก็ตาม สำหรับเชื้อ *Gloxinia tospovirus* นั้น ตรวจพบในถั่วลิสงชนิดที่ประเทศสหรัฐอเมริกา แต่เชื่อนี้มีความใกล้เคียงกับเชื้อ WSMoV ของประเทศไต้หวัน (Hsu *et al.*, 1996)

3. การสังเคราะห์โปรตีน NSs และการแยกให้บริสุทธิ์

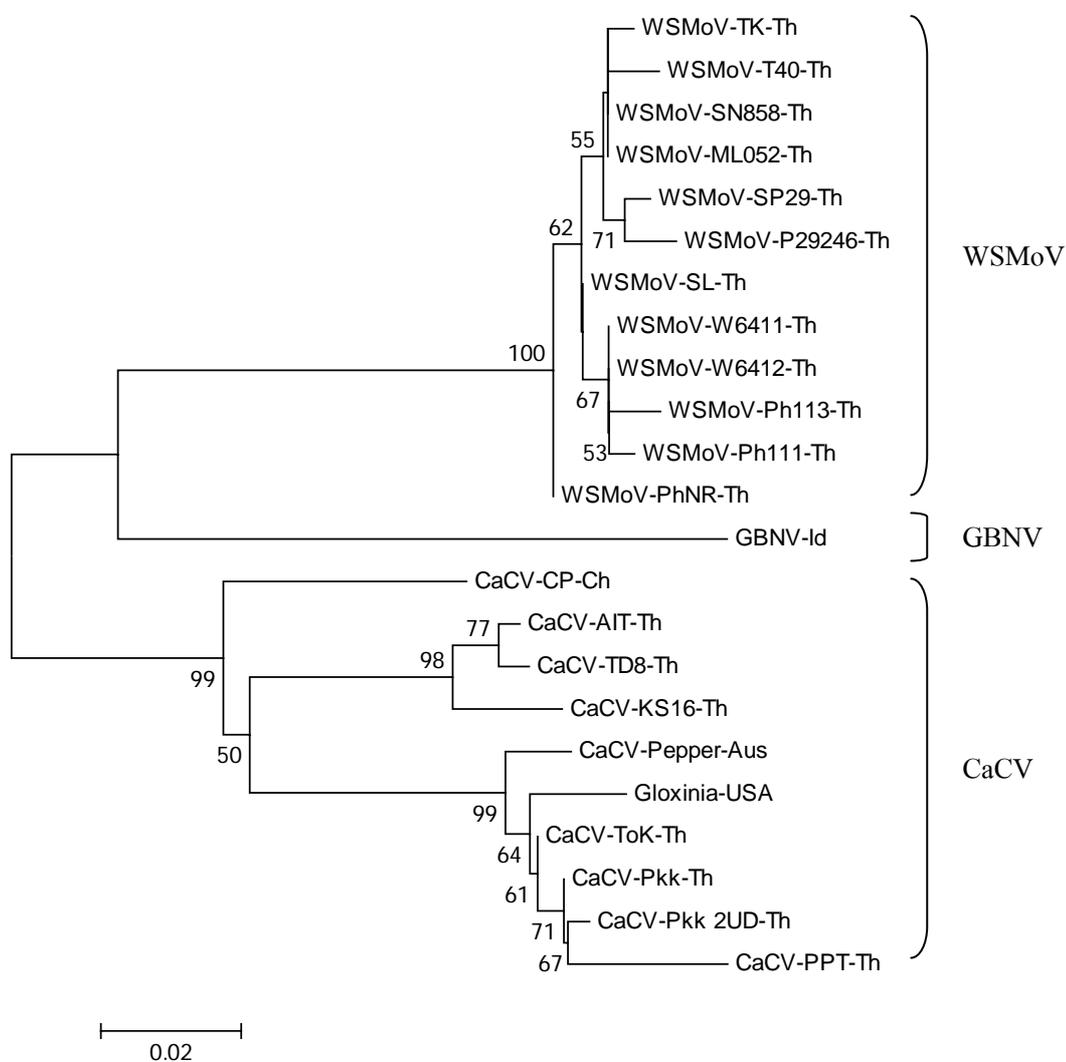
เลี้ยงเซลล์แบคทีเรีย *E. coli* DH5 α ที่มีพลาสมิด pQE-80L สายผสมของยีน NSs ในอาหารเหลวนาน 10 ชั่วโมง สกัดโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs จากเซลล์แบคทีเรียในสภาวะ native condition และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column พบว่าโปรตีนบริสุทธิ์จะถูกชะล้างออกจาก column ปริมาณมากใน fraction ที่ 4 และ 5 (ภาพที่ 10) ตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนลูกผสมของ Histidine และ NSs ด้วย SDS-PAGE พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน โดยที่โปรตีน 6xHis มีน้ำหนักประมาณ 1 กิโลดาลตัน และโปรตีน NSs ประมาณ 49 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 11) โปรตีน 6xHis-NSs บริสุทธิ์ที่แยกได้ มีความเข้มข้น 2.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 12) น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV-PPT ที่สังเคราะห์ได้ใกล้เคียงกับน้ำหนัก



ภาพที่ 8 Neighbor-joining phylogenetic tree วิเคราะห์จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs (ก) และ N (ข) ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ไอโซเลต CaCV-PPT และ CaCV-PKK 2UD กับเชื้อทอสโปไวรัสชนิดอื่น ๆ โดยโปรแกรม ClustalW คำนวณค่า Bootstrap percentage จาก 1,000 replications โดยใช้โปรแกรม MEGA package version 3.1 และแสดงค่าที่กิ่งของ tree เลขโรมันแสดงชื่อโรครูป

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ไอโซเลต CaCV-PPT กับเชื้อทอสปอไวรัสที่พบในประเทศไทย

Species	CaCV									WSMoV										GBNV	Gloxinia		
	Isolate	AIT	CP	PPT	Pkk	Pkk	TD8	KS	ToK	TK	ML	SN	T	SP	SL	W	W	Ph	Ph	P29	Ph	Id	USA
					2UD		16			052	858	40	29		6412	6411	113	111	246	NR			
Pepper	92	92	96	97	98	92	90	98	84	84	84	84	84	85	84	84	84	84	84	84	85	82	97
AIT		92	92	93	93	99	97	93	84	85	85	84	84	85	85	85	84	84	84	84	85	83	92
CP			90	92	92	92	90	93	85	86	86	85	85	86	86	86	85	85	85	86	82	92	
PPT				97	97	91	89	97	82	82	82	82	82	82	82	82	81	82	82	83	81	96	
Pkk 2UD					99	92	91	99	84	84	84	84	84	84	84	84	83	84	83	85	82	97	
Pkk						92	91	99	84	84	84	84	84	85	84	84	84	84	84	84	85	83	98
TD8							97	92	84	85	85	84	84	85	85	85	84	84	84	85	83	91	
KS16								91	84	85	85	84	84	85	85	85	84	84	84	85	83	90	
ToK									84	85	85	85	84	85	85	85	84	84	84	85	82	98	
TK										99	99	98	98	99	98	98	98	98	98	98	98	83	83
ML052											100	99	99	99	99	99	99	98	98	98	99	83	84
SN858												99	99	99	99	99	98	98	98	99	83	84	
T40													98	98	98	98	97	98	98	98	83	83	
SP29														98	98	98	97	98	98	98	83	83	
SL															99	99	98	99	98	99	84	84	
W6412																100	99	99	98	99	83	84	
W6411																	99	99	98	99	83	84	
Ph113																		98	97	98	82	83	
Ph111																			97	98	83	83	
P29246																				98	83	83	
PhNR																					84	84	
GBNV																							81



ภาพที่ 9 Neighbor-joining phylogenetic tree แสดงสายสัมพันธ์ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ไอโซเลต CaCV-PPT กับเชื้อทอสปอไวรัสไอโซเลตที่พบในประเทศไทย (Th) จีน (Ch) ออสเตรเลีย (Aus) สหรัฐอเมริกา (USA) และอินเดีย (Id) วิเคราะห์จากลำดับ กรดอะมิโนของโปรตีน N ด้วยโปรแกรม ClustalW จำนวนค่า Bootstrap percentag จาก 1,000 replications โดยใช้โปรแกรม MEGA package version 3.1 และแสดงค่าที่ กิ่งของ tree

โมเลกุลโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV ที่คำนวณจากลำดับกรดอะมิโนซึ่งเท่ากับ 49.6 กิโลดาลตัน ใกล้เคียงกับเชื้อ CaCV-CP, *Gloxinia tospovirus*, และ CaCV-AIT ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 49.9, 49.8, และ 49.5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Chen *et al.*, 2006a; Knierim *et al.*, 2006)

4. ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs

แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV (PAb-NSs) เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีน 6xHis-NSs บริสุทธิ์ ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่าความเจือจางสูงสุดของ PAb-NSs ในการเจาะเลือดครั้งที่ 3 และ 4 (1:409,600) สูงกว่าครั้งที่ 1, 2 และ 5 (1:204,800) (ตารางที่ 8) ส่วนค่าไตเตอร์ของ PAb-NSs ซึ่งหาจาก inflection point ของกราฟ (ภาพที่ 13) พบว่าค่าไตเตอร์จากการเจาะเลือดครั้งที่ 3, 4 และ 5 มีค่าเท่ากับ 12,800 และมากกว่าแอนติบอดีจากครั้งที่ 1 และ 2 ที่มีค่าเท่ากับ 6,400

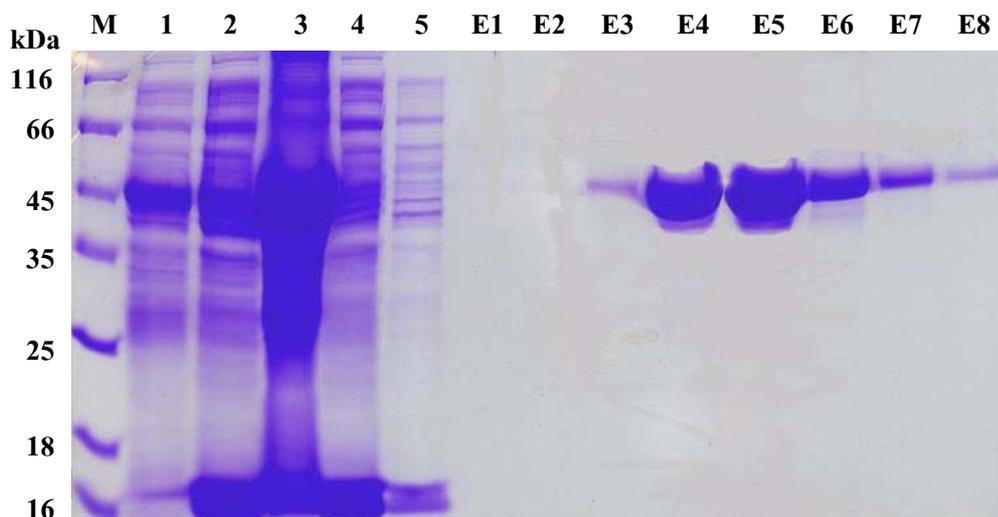
5. ประสิทธิภาพและความจำเพาะของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs

5.1 ค่าไตเตอร์ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs ในน้ำคั้นพืชเป็นโรค

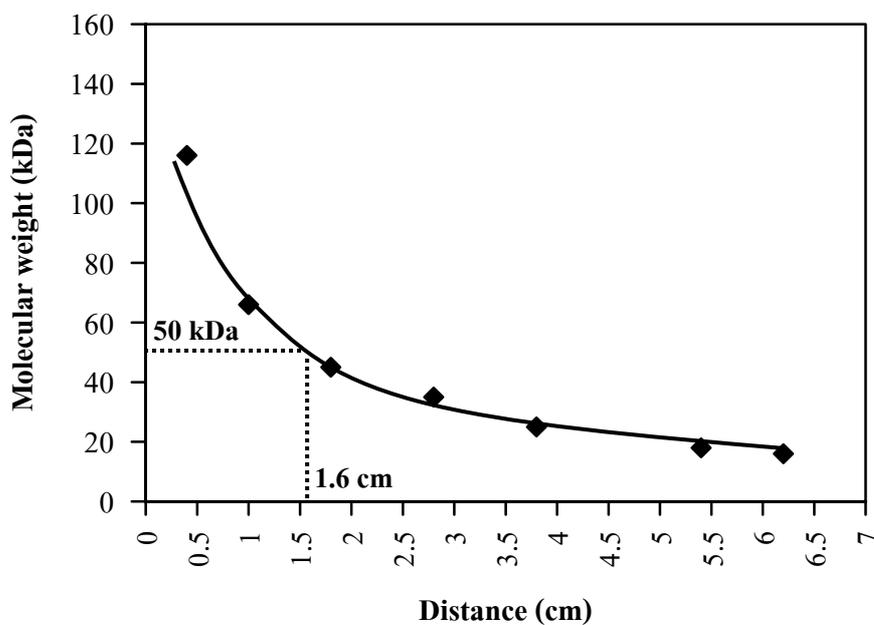
แอนติบอดี PAb-NSs ครั้งที่ 5 ที่เจือจาง 1:100 เท่า เกิดปฏิกิริยากับโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV ในน้ำคั้นใบถั่วลิสงติดเชื้อ PPT ให้ค่า ELISA สูงสุด (1.936) จากกราฟค่า ELISA titer ซึ่งได้จาก inflection point ในการทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs ในน้ำคั้นพืชเป็นโรค เท่ากับ 2,000 (ภาพที่ 14) และแอนติบอดี PAb-NSs ที่ผลิตได้ไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นของถั่วลิสงปกติ

5.2 ความจำเพาะของแอนติบอดี PAb-NSs ในการตรวจสอบเชื้อ CaCV

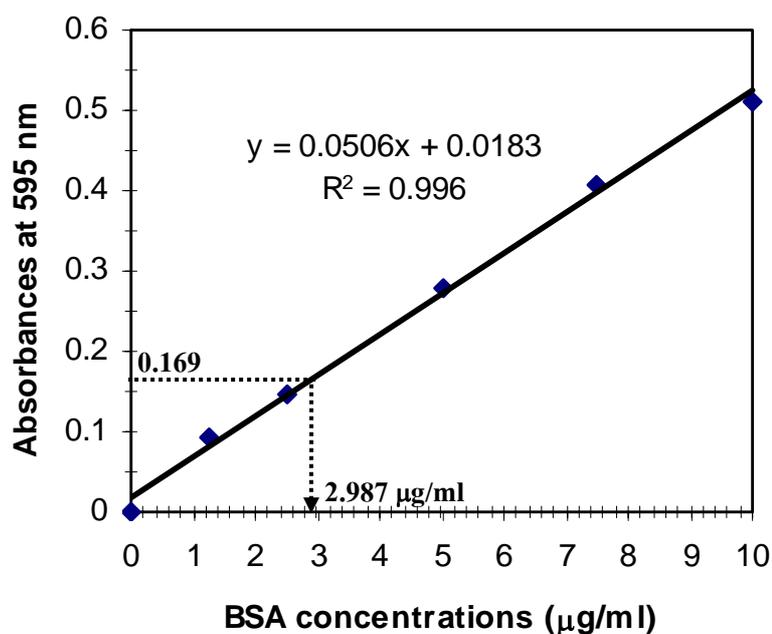
แอนติบอดี PAb-NSs ที่ได้จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 (PAb-NSs5) ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบถั่วลิสงที่ติดเชื้อ CaCV ไอโซเลต PKK และ PPT ที่ใช้เป็นแอนติเจนได้อย่างจำเพาะ โดยไม่ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบแดงโมที่ติดเชื้อ WSMoV และน้ำคั้นใบแคนตาลูปที่ติดเชื้อ MYSV (ตารางที่ 9, ภาพที่ 15) แอนติบอดี PAb-A3 ที่ใช้ตรวจสอบโปรตีน N ของเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรุป IV ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบถั่วลิสง CaCV และน้ำคั้นใบแดงโมที่ติดเชื้อ WSMoV ส่วน PAb-WSMoV ทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบถั่วลิสง CaCV และน้ำคั้นใบแคนตาลูปที่ติดเชื้อ MYSV และ PAb-MYSV ทำ



ภาพที่ 10 เจลผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีน 6xHis-NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ไอโซเลต CaCV-PPT เมื่อสกัดในสภาวะ native condition และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Ni-NTA column ตรวจสอบด้วย 12% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis
 ช่อง M = โปรตีนมาตรฐาน (Fermentas)
 ช่อง 1 = ตะกอนของเซลล์ *E. coli* ที่เลี้ยงในอาหาร และชักนำการสังเคราะห์โปรตีนด้วย IPTG นาน 10 ชั่วโมง
 ช่อง 2 = ตะกอนที่ได้หลังการย่อยเซลล์ด้วย Lysis buffer
 ช่อง 3 = ของเหลวใสก่อนการเติม Ni-NTA agarose
 ช่อง 4 = ของเหลวใสที่แยกหลังจากการ pack Ni-NTA column
 ช่อง 5 = ของเหลวใสผ่าน column หลังจากล้างด้วย Washing buffer
 ช่อง E1-E8 = โปรตีนในสารละลาย ที่ถูกชะล้างออกจาก Ni-NTA column ด้วย Elution buffer fraction ที่ 1-8



ภาพที่ 11 Calibration curve ที่สร้างขึ้นจากค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน (cm) และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (kDa) เมื่อแยกขนาดโปรตีนด้วย 12% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis และ โปรตีน NSs เคลื่อนที่ได้ระยะทาง 1.6 cm ซึ่งเทียบน้ำหนักโมเลกุลได้ประมาณ 50 kDa



ภาพที่ 12 Standard curve ที่สร้างขึ้นจากค่า Absorbance ที่ 595 nm ของโปรตีน BSA ที่ทราบความเข้มข้น (ตั้งแต่ 1.25-10 µg/ml) วัดด้วยวิธี Bradford's เพื่อหาความเข้มข้นของโปรตีนลูกผสม 6xHis-NSs ที่แยกให้บริสุทธิ์ ซึ่งวัดค่า Absorbance ได้ 0.169 คิดเป็นความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 2.987 µg/ml

ปฏิกิริยากับน้ำคั้นของถั่วลิสงที่ติดเชื้อ CaCV ในระดับสูง นอกจากนี้ยังทำปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นใบแดงโมที่ติดเชื้อ WSMoV ด้วย ส่วนแอนติบอดี MAb-SE7 ทำปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะกับน้ำคั้นใบแคณดาอุปที่ติดเชื้อ MYSV (ตารางที่ 9, ภาพที่ 15)

การเกิดปฏิกิริยาในระดับสูงเมื่อวินิจฉัยพืชติดเชื้อด้วยแอนติบอดี PAb-NSs และ MAb-SE7 แสดงว่าแอนติบอดีทั้งสองชนิดมีความจำเพาะต่อการตรวจสอบเชื้อไวรัสจากพืชติดเชื้อที่ใช้ทดสอบ ซึ่งแตกต่างจากการใช้แอนติบอดี PAb ต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ WSMoV แม้จะทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะกับโปรตีน NSs ในน้ำคั้นของพืชที่ติดเชื้อไวรัสที่ใช้เป็นแอนติเจน แต่ทำปฏิกิริยาข้ามเล็กน้อยกับโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV ที่ใช้เป็นแอนติเจน (Chen *et al.*, 2006b) และถึงแม้จะผลิตเป็น MAb ก็ยังคงเกิดปฏิกิริยาข้ามในการตรวจสอบเชื้อ CaCV และเชื้อ CCSV ในพืชติดเชื้อไวรัส แสดงว่า MAb สามารถทำปฏิกิริยากับ epitope ที่คล้ายคลึงกัน (common epitopes) บนโปรตีน NSs ของเชื้อ WSMoV, CaCV และ CCSV (Chen *et al.*, 2006b) เช่นเดียวกับการเกิดปฏิกิริยาข้ามเมื่อใช้แอนติบอดี PAb-A3, PAb-WSMoV และ PAb-MYSV ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งสัมพันธ์กับค่าความคล้ายคลึงกันในระดับสูง ของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรุป IV (81-100% identities) (ตารางที่ 6 และ 7) แสดงว่าเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรุป IV มีความใกล้เคียงกันทางสายสัมพันธ์ (Lin *et al.*, 2005)

อย่างไรก็ตามจากการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อการทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs สามารถชักนำให้ผลผลิตขึ้นได้ในกระต่าย และใช้เป็นแอนติบอดีที่มีประสิทธิภาพได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยเชื้อ CaCV จากเชื้อ WSMoV ซึ่งเป็นเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรุป IV และเชื้อ MYSV ในพืชติดเชื้อได้

6. การจัดจำแนกชนิดเพลี้ยไฟ

จัดจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้อง compound microscope พบว่าเพลี้ยไฟที่เก็บจากแปลงปลูกถั่วลิสง จัดอยู่ในอันดับ *Thysanoptera* อันดับย่อย *Terebrantia* วงศ์ *Thripidae* วงศ์ย่อย *Thripinae* สกุล *Scirtothrips* ชนิด *Scirtothrips dorsalis* (ภาพที่ 16 และ 17) ซึ่งเป็นเพลี้ยไฟขนาดเล็ก ลำตัวสีเหลืองอ่อน มีหนวด (antenna) 8 ปล้อง ที่ข้อหนวดมีอวัยวะรับความรู้สึก (sense cone) ที่ส่วนหัว (head) และอกปล้องที่หนึ่ง (prothorax) มีลวดลายที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงบาง ๆ ตามขวาง (transverse striate sculpture) ไม่สานกันเป็นร่างแห ที่ด้านล่าง (venter) ของอกปล้องที่สอง (mesothorax) และปล้องที่สาม (metathorax) มีลักษณะคล้าย

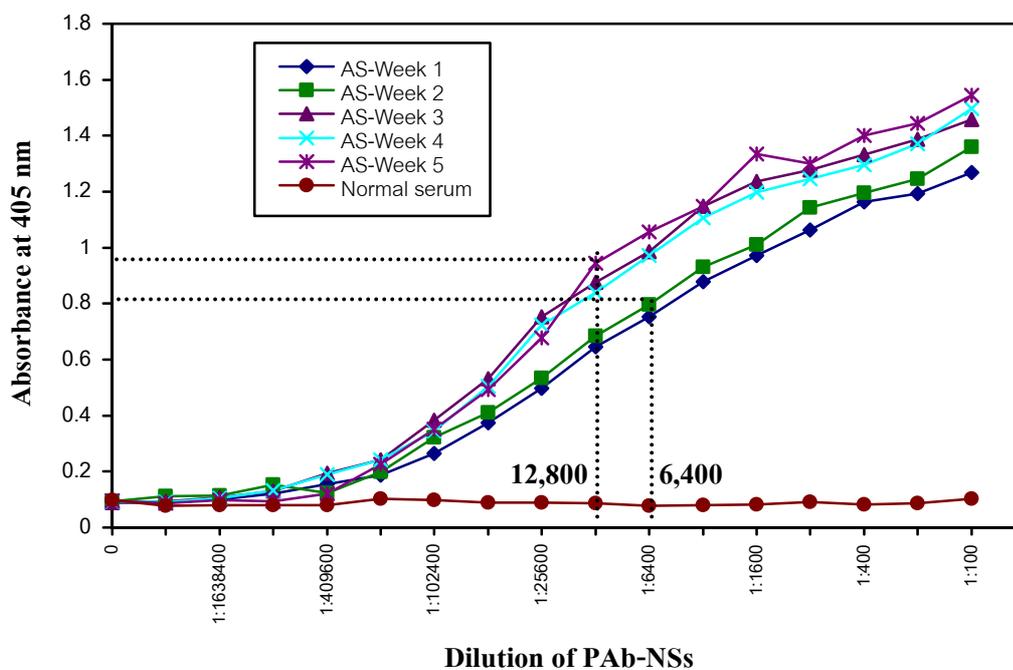
ตารางที่ 8 ค่าความเจือจางสูงสุด (dilution end point) ของแอนติบอดี PAb-NSs เมื่อใช้โปรตีน 6xHis-NSs บริสุทธิ์ปริมาณ 3 $\mu\text{g/ml}$ เป็นแอนติเจน ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA

ค่าความเจือจางของ แอนติบอดี	ค่า A_{405} เมื่อใช้แอนติบอดีครั้งที่				
	1	2	3	4	5
1 : 100	1.268	1.359	1.458	1.497	1.544
1 : 200	1.194	1.245	1.387	1.372	1.445
1 : 400	1.163	1.195	1.333	1.295	1.401
1 : 800	1.063	1.142	1.277	1.245	1.300
1 : 1,600	0.972	1.010	1.236	1.197	1.335
1 : 3,200	0.878	0.930	1.148	1.106	1.147
1 : 6,400	0.752	0.797	0.985	0.973	1.057
1 : 12,800	0.646	0.685	0.875	0.839	0.944
1 : 25,600	0.498	0.533	0.752	0.724	0.677
1 : 51,200	0.374	0.411	0.532	0.504	0.493
1 : 102,400	0.265	0.322	0.384	0.345	0.352
1 : 204,800	0.187	0.199	0.242	0.242	0.226
1 : 409,600	0.154	0.123	0.193	0.190	0.121
1 : 819,200	0.122	0.153	0.131	0.133	0.094
1 : 1,638,400	0.101	0.114	0.107	0.105	0.098
1 : 3,276,800	0.090	0.112	0.093	0.092	0.086
Coating buffer	0.089	0.094	0.088	0.093	0.095

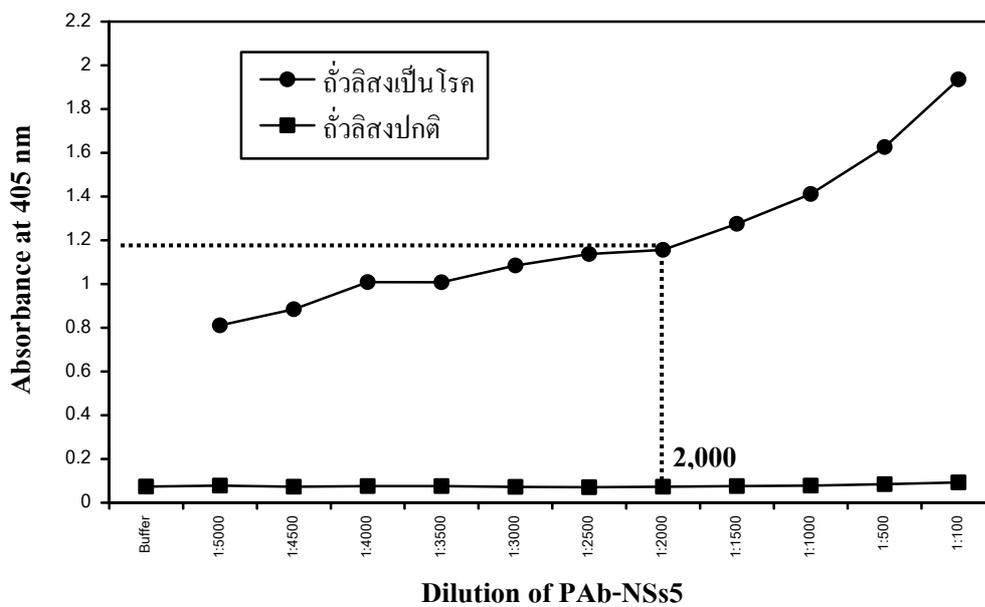
หมายเหตุ: - ค่า A_{405} เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

- Normal serum ที่ความเจือจาง 1:200 วัดค่า A_{405} ได้ 0.087

- ค่า A_{405} ของตัวอย่างที่มากกว่า normal serum 2 เท่า ให้ผลเป็นบวก



ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs (PAb-NSs) จากการเจาะเลือด 5 ครั้ง ใช้โปรตีน 6xHis-NSs ความเข้มข้น 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ เป็นแอนติเจนตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่า ELISA ที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที



ภาพที่ 14 กราฟแสดงค่า ELISA Titer ของแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 (PAb-NSs5) เมื่อทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs ในน้ำคั้นใบลิสงที่เป็นโรค (PPT) ตรวจสอบด้วยเทคนิค DAC-ELISA วัดค่าที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที

ตารางที่ 9 ค่า DAC-ELISA ของการตรวจสอบเชื้อ CaCV ในน้ำคั้นใบถั่วลิสง (*Arachis hypogaea*) เชื้อ WSMoV ในน้ำคั้นใบแตงโม (*Citrullus lanatus*) และเชื้อ MYSV ในน้ำคั้นใบแคนตาลูป (*Cucumis melo*) เมื่อตรวจสอบด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน NSs จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 (PAb-NSs5) เปรียบเทียบกับแอนติบอดีต่อโปรตีน N

ตัวอย่างพืช	ชนิดแอนติบอดี / ค่า $A_{405}^{1/}$				
	PAb	PAb	PAb	PAb	MAb
	CaCV- NSs5 ^{2/}	toSpoIV- N ^{3/}	WSMoV- N ^{4/}	MYSV- N ^{5/}	MYSV- N ^{6/}
<i>Arachis hypogaea</i> -CaCV-PKK	3.021	2.653	0.896	2.163	0.143
<i>Arachis hypogaea</i> -CaCV-PPT	3.056	3.076	1.325	2.858	0.123
<i>Arachis hypogaea</i> -Healthy	0.102	0.094	0.099	0.102	0.128
<i>Citrullus lanatus</i> -WSMoV	0.156	2.090	1.200	0.866	0.114
<i>Citrullus lanatus</i> -Healthy	0.101	0.097	0.102	0.105	0.135
<i>Cucumis melo</i> -MYSV	0.098	0.117	0.273	2.783	3.041
<i>Cucumis melo</i> -Healthy	0.113	0.100	0.114	0.113	0.121
Coating buffer	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094

หมายเหตุ: ^{1/} ค่าเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ อ่านค่า A_{405} ที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

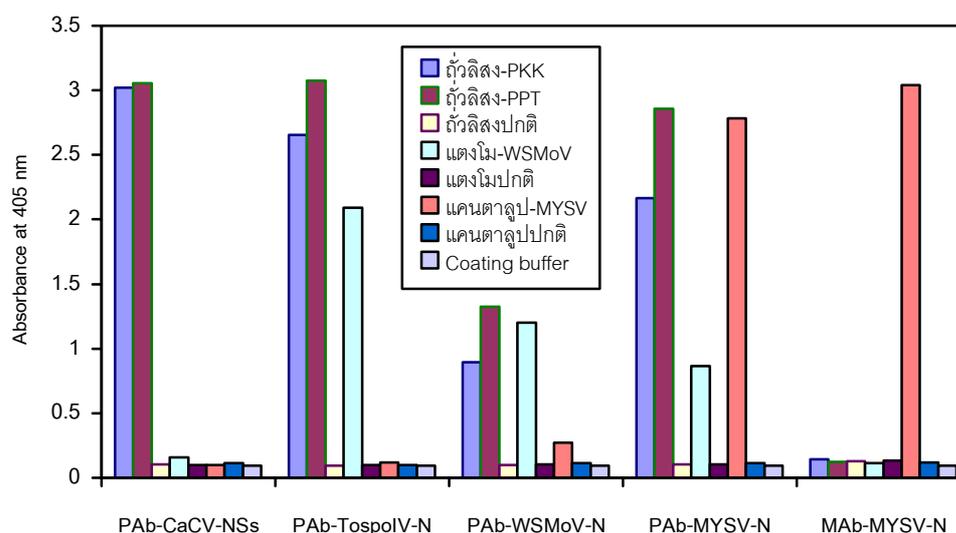
^{2/} แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV ที่ความเจือจาง 1:1,000

^{3/} แอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรูป IV (A3) ที่ความเจือจาง 1:5,000

^{4/} แอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ WSMoV ที่ความเจือจาง 1:2,500

^{5/} แอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV ที่ความเจือจาง 1:5,000

^{6/} แอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV ที่ความเจือจาง 1:200



ภาพที่ 15 กราฟแสดงปฏิกิริยาจำเพาะในการใช้แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 (PAb-NSs5) ตรวจเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ในน้ำคั้นใบถั่วลิสง เปรียบเทียบกับแอนติบอดีต่อโปรตีน N โดยใช้เชื้อ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ในน้ำคั้นใบแดงโม และเชื้อ *Melon yellow spot virus* (MYSV) ในน้ำคั้นใบแคนตาลูป เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ วิเคราะห์ด้วย DAC-ELISA วัดค่าที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที

PAb CaCV-NSs = แอนติบอดีต่อโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV ที่ความเจือจาง 1:1,000

PAb tospoIV-N = แอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุ๊ป IV ที่ความเจือจาง 1:5,000

PAb WSMoV-N = แอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ WSMoV ที่ความเจือจาง 1:2,500

PAb MYSV-N = แอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV ที่ความเจือจาง 1:5,000

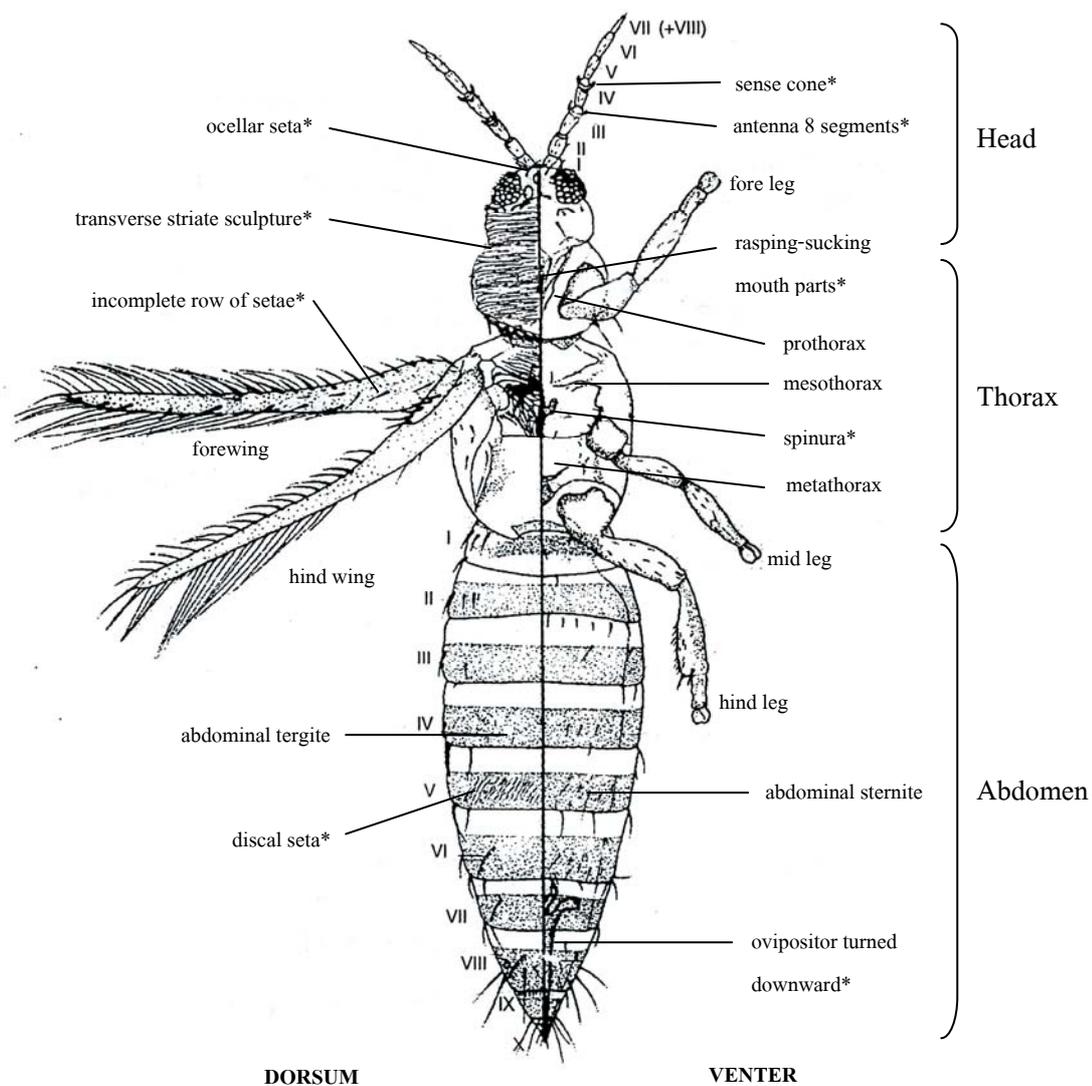
MAb MYSV-N = แอนติบอดีต่อโปรตีน N ของเชื้อ MYSV ที่ความเจือจาง 1:200

แท่งกระดูกยื่นออกมาเรียกว่ามีสปินูรา (spinura) ไม่มีรูหายใจ (spiracle) ที่อกปล้องที่สาม เส้นขนบนปีกคู่หน้ามีการเรียงตัวตามแนวปีกแบบไม่สมบูรณ์ (incomplete row of setae) ด้านบนของปล้องท้องที่ 2-7 มีขน 3 เส้น และด้านข้างมีกลุ่มขนขนาดเล็กหนาแน่น ด้านบนปล้องท้องที่ 5 มีขนขนาดเล็กปกคลุมหนาแน่น และขน 2 เส้นที่กลางปล้องท้องปล้องที่ 5 อยู่ใกล้กัน ปล้องท้องปล้องที่ 10 เป็นรูปกรวยปลายแหลม อวัยวะวางไข่ มีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย และโค้งงอออกจากส่วนท้อง (ovipositor turned downward) ผลการจัดจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟเหมือนกับการศึกษาโดยพิศสุวรรณ และคณะ (2548) แต่แตกต่างจากเพลี้ยไฟชนิด *Ceratothripoides claratris* พาหะของเชื้อ CaCV-AIT ในมะเขือเทศ ซึ่งพบที่สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (Premachandra *et al.*, 2005) และ *Thrips palmi* ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อ CaCV ในประเทศออสเตรเลีย (Clift and Tesoriero, 2001) ส่วนเพลี้ยไฟชนิดอื่นที่เป็นพาหะของเชื้อทอสปอไวรัส ได้แก่ *S. dorsalis* และ *Frankliniella schultzei* ที่เป็นพาหะเชื้อ TSWV สาเหตุ bud necrosis ของถั่วลิสงในประเทศอินเดีย (Amin *et al.*, 1981) ข้อสรุปเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างทางด้านสภาพภูมิศาสตร์ ชนิดของพืชอาศัย ชนิดของเชื้อทอสปอไวรัส และชนิดของเพลี้ยไฟพาหะ ในแถบเอเชีย รวมทั้งประเทศออสเตรเลีย

7. ยีน NSs ของเชื้อ CaCV ที่พบในตัวเพลี้ยไฟ

ตรวจพบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 1,320 คู่เบส จากปฏิกิริยา RT-PCR แบบ two-step ของอาร์เอ็นเอรวมซึ่งสกัดจากตัวอย่างเพลี้ยไฟ 5 ตัว แต่ไม่พบดีเอ็นเอดังกล่าวเมื่อใช้เพลี้ยไฟ 1 ตัว (ภาพที่ 18) เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอนี้ พบว่าเป็นยีน NSs ของเชื้อ CaCV ที่มีขนาด 1,320 นิวคลีโอไทด์ แพลรหัสได้กรดอะมิโน 439 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเท่ากับ 49.8 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 19) และมีความคล้ายคลึงกันกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน NSs ของเชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-PKK 2UD ที่ระดับ 97% และ 96% identities ตามลำดับ

เพลี้ยไฟเพียง 1 ตัว อาจมีปริมาณเชื้อน้อยมาก จึงตรวจไม่พบด้วยเทคนิค two-step RT-PCR แต่ตรวจพบได้เมื่อใช้อาร์เอ็นเอจากเพลี้ยไฟ 5 ตัว รวมกัน หรือในระยะตัวอ่อนซึ่งเป็นระยะที่สามารถรับไวรัสจากพืชที่เป็นโรคได้ (acquiring stage) เพลี้ยไฟเจริญเติบโตในบริเวณปลอดโรคเมื่อโตเต็มวัยจึงไม่มีไวรัส (Mason *et al.*, 2003) การที่สามารถตรวจ และเพิ่มปริมาณยีน NSs ของเชื้อ CaCV ได้จากเพลี้ยไฟนี้ แสดงว่ามีไวรัสในตัวของเพลี้ยไฟ (Ullman *et al.*, 1992a) แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่ามีการถ่ายทอดเชื้อ CaCV จากเพลี้ยไฟชนิดนี้ไปสู่ต้นถั่วลิสง



ภาพที่ 16 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (*) ที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเพลี้ยไฟชนิด *Scirtothrips*

dorsalis

ที่มา: ศิริณี, 2544

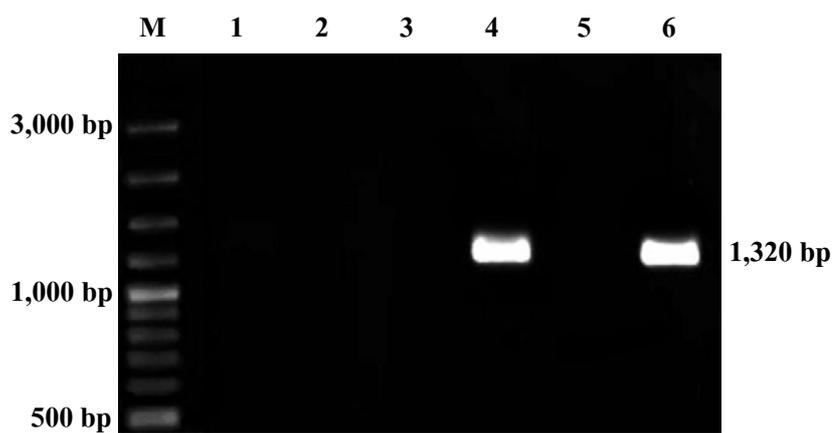


ภาพที่ 17 สัณฐานวิทยาของเพี้ยไฟ *Scirtothrips dorsalis* ที่เก็บจากแปลงปลูกถั่วลิสงใน
 อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา และลักษณะสำคัญทางที่ใช้จำแนกชนิด
 ก. ตัวเต็มวัย หนวคมี 8 ปล้อง
 ข. ที่ส่วนหัวและอกปล้องที่หนึ่งมีลวดลายที่มีลักษณะเป็นเส้นตรงบาง ๆ ตามขวาง
 ค. ขน 1 คู่ ปรากฏอยู่ที่ตาเดี่ยวที่สาม ภายนอกกรอบสามเหลี่ยมของตาเดี่ยว 3 ตา
 ง. ปากเป็นแบบ rasping-sucking type



ภาพที่ 17 (ต่อ)

- จ. ที่ด้านล่างของอกปล้องที่สองและปล้องที่สามมีลักษณะคล้ายแท่งกระดูกยื่นออกมา เรียกว่า spinura
- ฉ. เส้นขนบนปีกคู่หน้ามีการเรียงตัวตามแนวปีกแบบไม่สมมาตร
- ช. ด้านบนของปล้องท้องปล้องที่ 5 มีขนขนาดเล็ก เรียกว่า discal seta ปกคลุมหนาแน่น และขน 2 เส้นที่กลางปล้องอยู่ห่างกัน
- ซ. อวัยวะวางไข่คล้ายฟันเลื่อย และโค้งงอออกจากส่วนท้อง



ภาพที่ 18 เจลแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 1,320 คู่เบส ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* ด้วยเทคนิค two-step RT-PCR ใช้ไพรเมอร์ CaCV-NSsF และ CaCV-NSsR และใช้อาร์เอ็นเอรวมจากเพลี้ยไฟ 1 และ 5 ตัว เป็นต้นแบบ แยกขนาดดีเอ็นเอด้วย 1% agarose gel electrophoresis

ช่อง M = ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp DNA ladder plus, Fermentas)

ช่อง 1-3 = อาร์เอ็นเอของเพลี้ยไฟ 1 ตัว

ช่อง 4-6 = อาร์เอ็นเอของเพลี้ยไฟ 5 ตัว

CaCV-PPT	M S T A K S A A S E F V K S Y G T R D N R A I N D C Y S V F N G E G V N F P N L ATGTCTACTGCAAAGAGTGCCTGCTTCAGAATTTGTGAAGAGCTATGGAACAAGGGATAATAGAGCTATCAATGATTGCTATCTGTATTCAATGGAGAAGGTGTCAA CTTTC CCAATCTG	120
CaCV-TPT	ATGTCTACTGCAAAGAGTGCCTGCTTCAGAATTTGTGAAGAGCTATGGAACAAGGGATAATAGAGCTATCAATGATTGCTATCTGTATTCAATGGAGAAGGTGTCAA TTTCCT CAATCTG M S T A K S A A S E F V K S Y G T R D N R A I N D C Y S V F N G E G V N F L N L	120
CaCV-PPT	F M H N N A G I K S A F S I N D L G R N E D I K I H E A E V I D T C H D Y N Y F TTCATGCATAACAATGCAGGTATTAATCTGCATTGAGCATCAATGATTTGGGAAGGAATGAAGATATCAAAATCCATGAAGCTGAGGTT AT TGATACATGCCATGATTATAATTACTTT	240
CaCV-TPT	TTCATGCATAACAATGCAGGTATTAATCTGCATTGAGCATCAATGATTTGGGAAGGAATGAAGATATCAAAATCCATGAAGCTGAGGTT GT TGATACATGCCATGATTATAATTACTTT F M H N N A G I K S A F S I N D L G R N E D I K I H E A E V V D T C H D Y N Y F	240
CaCV-PPT	E K F G L D I T F C E H E M S L V V R K P G I K N T G C K F S M H N Q I F N P N GAGAAATTTGGTTTAGACATAACATTCTGTGAACATG AG ATGAGTTTGGTCGTAAGGAAACCTGGCATAAA GA AACACAGGCTGCAAGTTCTCAATGCATAATCAGATCTTCAATCCAAAT	360
CaCV-TPT	GAGAAATTTGGTTTAGACATAACATTCTGTGAACATG T GATGAGTTTGGTCGTAAGGAAACCTGGCATAAA AA AACACAGGCTGCAAGTTCTCAATGCATAATCAGATCTTCAATCCAAAT E K F G L D I T F C E H V M S L V V R K P G I K N T G C K F S M H N Q I F N P N	360
CaCV-PPT	A D T L S I A P G T T L E E G F H E K S K I K P I E L L P S D W C L D E C W K N GCCGATACCTTGCTATTGCTCCGGGAAC AA CCCTAGAGGAAGGTTTTCATGAG AA AAAGTAAGATAAAACCCATCGAGCTCCTTCCCTCAGACTGGTGCTTGGATGAATGCATGGAAGAAC	480
CaCV-TPT	GCC AA TACCTTGCTATTGCTCCGGGAAC G ACCCTAGAGGAAGGTTTTCATG AA AAAGTAAGATAAAACCCATCGAGCTCCTTCCCTCAGACTGGTGCTTGGATGAATGCATGGAAGAAC A N T L S I A P G T T L E E G F H E K S K I K P I E L L P S D W C L D E C W K N	480
CaCV-PPT	N F Y I A T N G G F A L D Y G F S V M G K T T S Y W R E N I S G E K I L S F K H AATTTTACATAGCTACTAATGGAG G CTTTG C ATTGGATTATGGATTCTCTGT G ATGGGTA AA ACA ACTT C G TACTGGAGAGAGAATCTCT G GGG AA AGAT T TATCTTTCAACAT	600
CaCV-TPT	AATTTTACATAGCTACTAATGGAG A CTTTG C TTTGGATTATGGATTCTCTGT A ATGGGTA AA ACA ACTT C T TACTGGAGAGAGAATCTCT A GGG AA AGAT C TATCTTTCAACAT N F Y I A T N G D F A L D Y G F S V M G K T T S Y W R E N I S R E K I L S F K H	600
CaCV-PPT	K S L P D K T G P T N R L L S T S T V R G I Q L G S E L A P E T T I I C H A N K AAAAGTCTCCCTGATA AA ACT GG TCC AA CCAATAGG T GTATCCACATCTACTGTAAGAGGCAT T CAGTTGGGTTCTGAGCTAGCTCCTGAAACT ACA TATTTGTGCATGCAAAACAAA	720
CaCV-TPT	AAAAGTCTCCCTGATA T ACTG T TCC AA CCAATAGG G GTATCCACATCTACTGTAAGAGGCAT C CAGTTGGGTTCTGAGCTAGCTCCTGAAACT AA TATTTGTGCATGCAAAACAAA K S L P D N T V P T N R W L S T S T V R G I Q L G S E L A P E T K F I C H A N K	720

ภาพที่ 19 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของยีน NSs ของเชื้อ *Capsicum chlorosis virus*, CaCV ที่พบในถั่วลิสง PPT และในเปลือยไฟ TPT เปรียบเทียบกันโดยใช้โปรแกรม DNA star อักษรสีแดง คือ นิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน และสีน้ำเงิน คือ กรดอะมิโนที่ต่างกัน

```

CaCV-PPT      N L G I D L K S Q Y R I S F H G I Q E E G A F A R T F C I P F E N K S R M I C F
AATCTTGGTATTGATCTAAAATCTCAGTATCGCATTTCATTTTCATGGTATTCAAGAGGAAGGTGCTTTTGC TAGAACTTTCGCATGCCCTTTGAAAACAAATCTAGAATGATTTGCTTT 840
CaCV-TPT      AATCTTAGTATTGATCTAAAATCTCAGTATCGCATTTCATTTTCATGGTATTCAAGAGGAAGGTGCTTTTGC TAGAACTTTCGCATGCCCTTTGAAAACAAATCTAGAATGATTTGCTTT 840
               N L S I D L N S Q Y R I S F H G I Q E E G A F A R T F C I P F E N K S R M I C F

CaCV-PPT      Y A K T V A D N S N E R T T L I I K I V T K T V D S H S M R P N R N H I N C N K
TATGCAAAGACAGTTGCTGACAAACAGCAATGAAAGAACAACCTTAATTATAAAAATAGTCACAAGACTGTTGACTCTCATTCAATGAGACCTAACAGAAATCATATCAACTGCAATAAA 960
CaCV-TPT      TATGCAAAGACAGTTGCTGACAAATAGCAATGAAAGAACAACCTTAATTATAAAAATAGTCACAAGACTGTTGACTCTCATTCAATGAGACCTAACAGAAATCATATCAACTGCAATAAA 960
               Y A K T V A D N S N E R T T L I I K I V T K T V D S H S M R P N R N H I N C N K

CaCV-PPT      L L G A R I G L V D F C D S D P N Y N Q M I V K E L L S V H T Q F A L N L S R T
CTGTTAGGAGCAAGAATTGGTTTAGTTGATTTTGTGATTCTGATCCAAATTATAATCAGATGATTGTAAAGGAGCTGTTAAGTGTTCATACTCAATTTGCACTCAATCTATCTAGGACA 1080
CaCV-TPT      CTGTTGGGAGCAAGAATTGGTTTAGTTGATTTTGTGATTCTGATCCAAATTATAATCAGATGATTGTAAAGGAGCTGTTAAGTGTTCATACTCCAATTTGCACTCAACCTATCTGGGACA 1080
               L L G A R I G L V D F C D S D P N Y N Q M I V K E L L S V H T Q F A L N L S G T

CaCV-PPT      L E K P I I V F K M Y D K E L I N G H V E V S G R I L N Y Q V D A D G N V Y F L
TTGAAAAACCTATCATTGTATTCAAGATGTATGATAAGGAATTGATAAATGGGCATGTAGAAGTTTCAGGAGAGGATTCTGAATTACCAGGTAGATGCTGACGGAAATGTTTATTTTCTC 1200
CaCV-TPT      TTGAAAAACCAATCATTGTATTCAAGATGTATGATAAGGAATTGATAAATGGGCATGTAGAAGTTTCAGGAGAGGATTCTGAATTACCAGGTAGATGCTGACGGAAATGTTTATTTTCTC 1200
               L E K P I I V F K M Y D K E L I N G R V E V S G R I L N Y Q V D A D G N V Y F L

CaCV-PPT      S K T L E V L P R S L S T L S Y L N S V A P T L W K E S L E H Q H F I V E L K Stop
TCGAAAACCTTGAGGTACTCCCAAGATCCCTATCAACTTTAAGTTACTTAAATAGTGTGGCACCAACACTATGGAAAGAATCCTTAGAGCATCAACACTTTATTGTGGAGCTTAAATAA 1320
CaCV-TPT      TCAAAAACCTTGAGGTCCTCCCAAGATCCCTATCAACTTTAAGTTACTTAAATAGTGTGGCACCAACACTATGGAAAGAATCCTTAGAGCATCAACACTTTATTGTGGAGCTTAAATAA 1320
               S K T L E V L P R S L S T L S Y L N S V A P T L W K E S L E H Q H F I V E L K Stop

```

ภาพที่ 19 (ต่อ)

สรุปผล

พบอาการของการติดเชื้อทอสโปไวรัสในแปลงเพาะปลูกถั่วลิสงของเกษตรกร อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา และตัวอย่างใบให้ผลบวกเมื่อวินิจฉัยโดยเทคนิค DAC-ELISA ด้วยแอนติบอดีต่อเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุ๊ป IV เมื่อปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนใบถั่วพุ่ม และถั่วลิสง จะปรากฏอาการจุดด่างสีเหลือง และด่างวงแหวน ต้นที่มีอาการรุนแรงจะเหี่ยว และตายไปในที่สุด

ยีน NSs ของเชื้อ CaCV ไอโซเลต PKK 2UD และ PPT มีขนาด 1,320 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 439 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุล 49.6 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับยีน และโปรตีน NSs ของเชื้อ CaCV ไอโซเลตอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโน พบว่ามีระดับความคล้ายคลึงกันกับเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุ๊ป IV อยู่ระหว่าง 76-90% identities และทั้งสองไอโซเลตมีความคล้ายคลึงกันกับเชื้อ CaCV-AIT กับ CaCV-CP ที่ระดับ 86-89% identities การวิเคราะห์สายสัมพันธ์จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs พบว่าเชื้อ CaCV-PPT และ CaCV-PKK 2UD จับกลุ่มสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *Gloxinia tospovirus*, CaCV-CP และ CaCV-AIT จึงจัดเชื้อทั้งสองไอโซเลตอยู่ในซีโรกรุ๊ป IV เช่นเดียวกับการเปรียบเทียบด้วยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N

ยีน N ของเชื้อ CaCV ไอโซเลต PPT มีขนาด 828 นิวคลีโอไทด์ แปลรหัสได้โปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 เรซิดิวส์ น้ำหนักโมเลกุล 30.5 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับยีน และโปรตีน N ของเชื้อ CaCV ไอโซเลตอื่น ๆ เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีระดับค่าความคล้ายคลึงกันกับเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุ๊ป IV อยู่ระหว่าง 81-96% identities และมีค่าความคล้ายคลึงกันของลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ในระดับสูง (89-97% identities) กับเชื้อ CaCV ไอโซเลตที่พบในประเทศไทย โดยมีค่าความคล้ายคลึงสูงสุดกับเชื้อ CaCV-PKK 2UD จากถั่วลิสง จ. อุตรดิตถ์ เชื้อ CaCV-Pkk จาก จ. ขอนแก่น และ CaCV-ToK จากมะเขือเทศ จ. กาฬสินธุ์

การวิเคราะห์สายสัมพันธ์จากลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน N ของเชื้อทอสโปไวรัส ไอโซเลตต่าง ๆ พบว่าเชื้อ CaCV-PPT จับกลุ่มสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ CaCV-PKK 2UD เชื้อ CaCV-Pkk และเชื้อ CaCV-ToK ที่พบในประเทศไทย เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ด้วยลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน NSs จึงจัดเชื้อ CaCV-PPT อยู่ในกลุ่มเชื้อทอสโปไวรัสซีโรกรุ๊ป IV

โปรตีน 6xHis-NSs ของเชื้อ CaCV-PPT ที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50 กิโลดาลตัน และมีความเข้มข้น 2.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เป็นแอนติเจนต่อแอนติบอดี PAb-NSs พบว่าค่าความเจือจางสูงสุดที่ยังคงให้ผลบวกจากการเจาะเลือดครั้งที่ 3 และ 4 มากกว่าครั้งที่ 1, 2 และ 5 ส่วนค่าไตเตอร์พบว่าการเจาะเลือดครั้งที่ 3, 4 และ 5 มีค่าสูงกว่าครั้งที่ 1 และ 2 เมื่อนำแอนติบอดี PAb-NSs จากการเจาะเลือดครั้งที่ 5 ค่าไตเตอร์เมื่อทำปฏิกิริยากับน้ำคั้นใบถั่วลิสงติดเชื้อ เท่ากับ 2,000

แอนติบอดี PAb-NSs ที่ผลิตได้มีความจำเพาะอย่างสูงในการตรวจสอบเชื้อ CaCV ในน้ำคั้นจากใบถั่วลิสงติดเชื้อ และไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับโปรตีน NSs ของเชื้อ WSMoV ในน้ำคั้นใบแดงโมติคเชื้อ และเชื้อ MYSV ในน้ำคั้นใบแคนตาลูปติดเชื้อ แสดงว่า polyclonal antibody ที่จำเพาะต่อการทำปฏิกิริยากับโปรตีน NSs สามารถชักนำให้มีการผลิตขึ้นได้ในกระต่าย และใช้เป็น PAb ที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยเชื้อ CaCV ในพืชติดเชื้อได้อย่างจำเพาะ รวมทั้งการจำแนกเชื้อ CaCV ออกจากเชื้อทอสปอไวรัสซีโรกรูป IV ในพืชติดเชื้อได้

เพลี้ยไฟในแปลงปลูกถั่วลิสง อ. ปักธงชัย จ. นครราชสีมา เป็นชนิด *Scirtothrips dorsalis* แตกต่างจากเพลี้ยไฟชนิด *Ceratohripoides claratrix* พาหะของเชื้อ CaCV-AIT ในมะเขือเทศ ซึ่งพบที่สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย และชนิด *Thrips palmi* ซึ่งเป็นพาหะของเชื้อ CaCV ในประเทศออสเตรเลีย

สามารถตรวจ และเพิ่มปริมาณยีน NSs ของเชื้อ CaCV ขนาด 1,320 คู่เบส จากเพลี้ยไฟ และมีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันที่ระดับ 96% identity กับลำดับกรดอะมิโนของเชื้อ CaCV ไอโซเลต PPT แสดงว่ามีไวรัสในตัวเพลี้ยไฟ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน, พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ, วิมล สีเทา และ อนุรักษ์ สันป่าเป้า. 2548. การตรวจสอบทอสปอไวรัสซีโรกรุ๊ป IV ในส่วนของพืชและผลผลิตด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา. ใน รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปรียพรรณ พงศาพิชณ์. 2543. การพัฒนากรดนิวคลีอิกตัวตรวจสำหรับวินิจฉัยทอสปอไวรัสในมะเขือเทศและพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 71 น.

พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ, อรประไพ คชนันท์, รัชณี สงประยูร, อัญญา บุญชด, วิมล สีเทา, นุชนาด วารินทร์, ชาญณรงค์ ศรีภิบาล, และ ปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน. 2548. ความหลากหลายของทอสปอไวรัสที่พบในประเทศไทยและเปลือกไฟที่เป็นพาหะนำโรค. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 43 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิมล สีเทา, พิศสุวรรณ เจียมสมบัติ, อรประไพ คชนันท์, อัญญา บุญชด, นุชนารด วารินทร์, ปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน และ ชาญณรงค์ ศรีภิบาล. 2547. การจำแนกทอสปอไวรัสที่พบในพริก มะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง, น. 445-451. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 42 (สาขาพืช). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิริณี พูนไชยศรี. 2544. เปลือกไฟ *Terebrantia*. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

โสภณ วงศ์แก้ว. 2536. โรคของถั่วลิสงในประเทศไทย. กลุ่มพืชน้ำมัน กองส่งเสริมพืชไร่ กรมส่งเสริมการเกษตร, กรุงเทพฯ. 44 น.

- โสภณ วงศ์แก้ว และ จุฑารัตน์ เชื้อพงษ์. 2536. ไวรัสสาเหตุโรคมอดไหม้ของถั่วลิสง และการสำรวจการแพร่ระบาดของโรคนี้ของโรควิสาของถั่วลิสง ปี 2535-2536, น. 233-238. ใน รายงานการสัมมนางานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 11, 17-21 พฤษภาคม 2536. กรมวิชาการเกษตร, ระนอง.
- Adam, G., P. Roggero, F. Malavasi, R.G. Milne and G. Papa. 1995. Approach to a general tospovirus assay using antibodies to purified tomato spotted wilt tospovirus G protein. **EPPO Bull.** 25: 247-257.
- Adkins, S. 2000. Tomato spotted wilt virus-positive steps towards negative success. **Mol. Plant Path.** 1: 151-157.
- Amin, P.W., D.V.R. Reddy and A.M. Ghanekar. 1981. Transmission of Tomato spotted wilt virus, the causal agent of bud necrosis of peanut, by *Scirtothrips dorsalis* and *Frankliniella schultzei*. **Plant Dis.** 65: 663-665.
- Bandla, M.D., D.M. Westcot, K.D. Chenault, D.E. Ullman, T.L. German and J.L. Sherwood. 1994. Use of monoclonal antibody of the nonstructural protein encoded by the small RNA of tomato spotted wilt tospovirus to identify viruliferous thrips. **Phytopathol.** 84: 1427-1431.
- Bandla, M.D., L.R. Campbell, D.E. Ullman and J.L. Sherwood. 1998. Interaction of Tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. **Phytopathol.** 88: 98-104.
- Beclin, C., S. Boutet, P. Waterhouse, and H. Vaucheret. 2002. A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. **Curr. Biol.** 12: 684-688.
- Bhunchoth, A., N. Warin, P. Chiemsombat, C. Seepiban, S. Wongyam, R. Hongprayoon and O. Gajanandana. 2005. Molecular characterization of Melon yellow spot virus infecting cucurbits in Thailand. **BioThailand 2005.** November 2-5, 2005. Bangkok, Thailand.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 12: 248-254.
- Brigneti, G., O. Voinnet, W.X. Li, L.H. Ji, S.W. Ding and D.C. Baulcombe. 1998. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. **EMBO J.** 17: 6739-6746.
- Chang, S., J. Puryear and J. Cairney. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine. **Plant Mol. Biol. Rep.** 11: 113-116.
- Chen, K., Z. Xu and L. Yan. 2006a. Identification of a new strain of *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) infecting peanut in China. **Virologica Sinica.** 21: 506-509.
- Chen, T.C., C.W. Huang, Y.W. Kuo, F.L. Liu, C.H.H. Yuan, H.T. Hsu and S.D. Yeh. 2006b. Identification of common epitopes on a conserved region of NSs proteins among tospoviruses of *Watermelon silver mottle virus serogroup*. **Phytopathol.** 96: 1296-1304.
- Chiemsombat, P. and S. Adkins. 2007. Tospoviruses. pp. 1-37. **In Characterization, Diagnosis & Management of Plant Viruses Vol. 3: Vegetable and Pulse Crops.** Studium Press, USA.
- Chift, A.D. and L. Tesoriero. 2001. Aspects of vector thrips biology and epidemiology of tospoviruses in Australia. pp. 87-91. **In Thrips and Tospoviruses: Proceeding of The 7th International Symposium on Thysanoptera.** Reggio Calabria, Italy.
- Cogoni, C. and G. Macino. 2000. Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 10: 638-643.

- de Avila, A.C., C. Huguenot, R. de O. Resende, E.W. Kitajima, R.W. Goldbach and D. Peters. 1990. Serological differentiation of 20 isolates of tomato spotted wilt virus. **J. Gen. Virol.** 71: 2801-2807.
- de Avila, A.C., P. de Haan, R. Kormelink, R. de O. Resende, R.W. Goldbach and D. Peters. 1993. Classification of tospoviruses based on the phylogeny of nucleocapsid gene sequences. **J. Gen. Virol.** 74: 153-159.
- de Haan, P., L. Wagemaker, D. Peters and R. Goldbach. 1990. The S RNA segment of *Tomato spotted wilt virus* has an ambisense character. **J. Gen. Virol.** 71: 1001-1007.
- de Haan, P., R. Kormelink, R.O. Resende, F. van Poelwijk, D. Peters and R. Goldbach. 1991. Tomato spotted wilt virus L RNA encodes a putative RNA polymerase. **J. Gen. Virol.** 71: 2207-2216.
- Elliott, R.M. 1990. Molecular biology of Bunyaviridae. **J. Gen. Virol.** 71: 501-522.
- German, T.L., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. Tospoviruses: diagnosis, molecular biology, phylogeny, and vector relationships. **Annu. Rev. Phytopathol.** 30: 315-348.
- Gitaitis, R.D., C.C. Dowler and R.B. Chalfant. 1998. Epidemiology of tomato spotted wilt in pepper and tomato in Southern Georgia. **Plant Dis.** 82: 752-756.
- Goldbach, R. and G. Kuo. 1996. Introduction: Proceeding of the international symposium on tospoviruses and thrips of floral and vegetable crops. **Acta. Hortic.** 431: 21-26.
- Goldbach, R. and D. Peters. 1994. Possible causes of the emergence of tospovirus disease. **Sem. Virol.** 5: 113-120.

- Green, S.K. and J.S. Kim. 1991. Characteristic and control of viruses infecting pepper: A literature review. **AVRDC Tech. Bull.** No. 18. 60 p.
- Hanssani-Mehraban, A., J. Saaijer, D. Peters, R. Goldbach and R. Kormelink. 2005. A new tomato-infecting tospovirus from Iran. **Phytopathol.** 95: 852-858.
- He, C., T.A. Molen, X. Xiong, G. Boiteau and X. Nie. 2006. Cytochrome C oxidase mRNA as an internal control for detection of Potato virus Y and Potato leafroll virus from single aphids by a co-amplification RT-PCR assay. **J. Virol. Methods.** 138: 152-159.
- Heinze, C., B. Letschert, D. Hristova, M. Yankulova, O. Kauadjouor, P. Willingmann, A. Atanassov and G. Adam. 2001. Variability of the N-protein and the intergenic region of the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV). **New Microbiol.** 24: 175-187.
- Heinze, C., E. Maiss, G. Adam and R. Casper. 1995. The complete nucleotide sequence of the S RNA of a new tospovirus species, representing serogroup IV. **Phytopathol.** 85: 683-690.
- Heinze, C., P. Roggero, M. Sohn, A.M. Vaira, V. Masenga and G. Adam. 2000. Peptide-derived broad-reacting antisera against tospovirus NSs-protein. **J. Virol. Methods.** 89: 137-146.
- Holmes, S.D. and Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. **Anal. Biochem.** 114: 193-197.
- Hsu, H.T., R.H. Lawson, S.D. Yeh and R.J. Chiu. 1996. Serological relationship of a high temperature-recovered tospovirus in the USA and watermelon silver mottle virus in Taiwan. **Phytopathol.** 86: (Suppl) 843.

- Jain, R.K., H.R. Pappu, S.S. Pappu, M.R. Krishna and A. Vani. 1998. Watermelon bud necrosis tospovirus is a distinct virus species belonging to serogroup IV. **Arch. Virol.** 143: 1637-1644.
- Jones, R.A.C. and M. Sharman. 2005. Capsicum chlorosis virus infecting *Capsicum annuum* in the east Kimberley region of western Australia. **Aust. Plant. Path.** 34: 397-399.
- Kitajima, E.W., A.C. de Avila, R. de O. Resende, R.W. Goldbach and D. Peters. 1992. Comparative cytological and immunogold labelling studies on different isolates of tomato spotted wilt virus. **J. Submicrosc. Cyto. Pathol.** 24: 1-14.
- Knierim, D., R. Blawid and E. Maiss. 2006. The complete nucleotide sequence of a capsicum chlorosis virus isolate from *Lycopersicon esculentum* in Thailand. **Arch. Virol.** 151: 1761-1782.
- Kohl, A., V. de Bartolo and M. Bouloy. 1999. The Rift valley fever virus nonstructural protein NSs is phosphorylated at serine residues located in casein kinase II consensus motifs in the carboxyl-terminus. **Virology.** 263: 517-525.
- Kormelink, R., E.W. Kitajima, P. de Hann, D. Zuidema, D. Peters and R. Goldbach. 1991. The nonstructural protein (NSs) encoded by the ambisense S RNA segment of tomato spotted wilt virus is associated with fibrous structures in infected plant cells. **Virology.** 181: 459-468.
- Kormelink, R., M. Storms, J. van Lent, D. Peters and R. Goldbach. 1994. Expression and subcellular location of the NS(M) protein of tomato spotted wilt virus (TSWV), a putative viral movement protein. **Virology.** 200: 56-65.

- Kumar S., K. Tamura and M. Nei. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**. 5: 150-163.
- Li, W.X. and S.W. Ding. 2001. Viral suppressors of RNA silencing. **Curr. Opin. Biotechnol.** 12: 150-154.
- Lin, Y.H., T.C. Chen, H.T. Hsu, L.F. Liu, F.H. Chu, C.C. Chen, L.Z. Lin and S.D. Yeh. 2005. Serological comparison and molecular characterization for verification of Calla lily chlorotic spot virus as a new tospovirus species belonging to *Watermelon silver mottle virus* serogroup. **Phytopathol.** 95: 1482-1488.
- Mason, G., P. Roggero and L. Tavella. 2003. Detection of *Tomato spotted wilt virus* in its vector *Frankliniella occidentalis* by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J. Virol. Methods.** 109: 69-73.
- McMichael, L.A., D.M. Persley and J.E. Thomas. 2002. A new tospovirus serogroup IV species infecting capsicum and tomato in Queensland, Australia. **Aust. Plant Path.** 31: 231-239.
- Mound, L.A. 1996. The Thysanoptera vector species of Tospoviruses. **Acta. Hortic.** 431: 298-309.
- Mound L.A. and G. Kibby. 1998. **Thysanoptera an Identification Guide**. 2nd ed. Oxon, UK.
- Nagata, T., A.K. Inoue-Nagata, J. van Lent, R. Goldbach and D. Peters. 2002. Factors determining vector competence and specificity for transmission of *Tomato spotted wilt virus*. **J. Gen. Virol.** 83: 663-671.

- Nagata, T., M.M.H. Storms, R. Goldbach and D. Peters. 1997. Multiplication of tomato spotted wilt virus in primary cell cultures derived from two thrips species. **Virus Research**. 49: 59-66.
- Ohnishi, J, L.M. Knight, D. Hosokawa, I. Fujisawa and S. Tsuda. 2001. Replication of *Tomato spotted wilt virus* after ingestion by adult *Thrips setosus* is restricted to midgut epithelial cells. **Phytopathol.** 91: 1149-1155.
- Okuda, M., S. Taba and K. Hanada. 2003. The S RNA segment determines symptom differences on *Tetragonia expansa* between two *Watermelon silver mottle virus* isolates. **Physio. Mol. Plant Path.** Available source: <http://www.elsevier.com/locate/pmpp>, June 25, 2005.
- Okuda, M., S. Takeuchi, S. Taba, K. Kato and K. Hanada. 2002. Melon yellow spot virus and Watermelon silver mottle virus: outbreak of cucurbit infecting tospovirus in Japan. **Acta Hort.** 588: 143-148.
- Palmer, J.M., L.A. Mound and G.J. du Heaume. 1989. **CIE Guide to Insects of Importance to Man: 2. Thysanoptera.** Aberystwyth, UK.
- Pappu, S.S., A.I. Bhat, H.R. Pappu, C.M. Deom and A.K. Culbreath. 2000. Phylogenetic studies of tospoviruses (Family: *Bunyaviridae*) based on intergenic region sequence of small and medium genomic RNAs . **Arch. Virol.** 145: 1035-1045.
- Peters, D., A.C. de Avila, E.W. Kitajima, R. de O. Resende, P. de Haan and R.W. Goldbach. 1991. An overview of tomato spotted wilt virus. pp. 1-14. *In* **Virus-Thrips-Plant Interaction of Tomato spotted wilt virus.** Proc. USDA. Beltsville Maryland, USA.

- Pongsapich, P. and P. Chiemsombat. 2002. Characterization of tospovirus infecting tomatoes in Thailand revealed the presence of serogroup IV-tospovirus but not serogroup I-tomato spotted wilt virus. Page 92. *In The First International Conference on Tropical and Subtropical Plant Disease*. Chaing Mai, Thailand.
- Premachandra, W.T.S.D., C. Borgemeister, E. Maiss, D. Knierim and H.M. Poehling. 2005. *Ceratothripoides claratris*, a new vector of a Capsicum chlorosis virus isolate infecting tomato in Thailand. **Phytopathol.** 95: 659-663.
- Prins M. and R. Kormelink. 1998. **Molecular and biological aspects of Tospoviruses**. Available source: <http://www.dpw.wau.nl/viro/research/tospo.html>, June 25, 2005.
- Prins, M. and R. Glodbach. 1998. The emerging problem of tospovirus infection and conventional methods of control. **Trends Microbiol.** 6: 31-35.
- Reddy, D.V.R., A.S. Ratana, M. R. Sudarshana, F. Poul and I.K. Kumar. 1992. Serological relationships and purification of bud necrosis virus, a tospovirus occurring in peanut (*Arachia hypogaea* L.) in India. **Ann. Appl. Biol.** 120: 279-286.
- Satyanarayana, T., K.L. Reddy, A.S. Ratana, C.M. Deom, S. Gowda and D.V.R. Reddy. 1996a. *Peanut yellow spot virus*: a distinct tospovirus species based on serology and nucleic acid hybridization. **Ann. Appl. Biol.** 129: 237-245.
- Satyanarayana, T., S. Gowda, K.L. Reddy, S.E. Michell, W.O. Dawson and D.V.R. Reddy. 1998. Peanut yellow spot virus is a member of a new serogroup of the *Tospovirus* genus based on small (S) RNA sequence and organization. **Arch. Virol.** 143: 353-364.

- Satyanarayana, T., S.E. Mitchell, D.V.R. Reddy, S. Brown, S. Kresovich, R. Jarret, R.A. Naidu and J. W. Demski. 1996b. Peanut bud necrosis virus S RNA: complete nucleotide sequence, genome organization and homology to other tospoviruses. **Arch. Virol.** 141: 85-98.
- Silva, M.S., C.R.F. Martins, I.C. Bezerra, T. Nagata, A.C. de Avila and R.O. Resende. 2001. Sequence diversity of NSm movement protein of tospoviruses. **Arch Virol.** 146: 1267-1281.
- Richmond, K.E., K. Chenault, J.L. Sherwood and T.L. German. 1998. Characterization of the nucleic acid binding properties of Tomato spotted wilt virus nucleocapsid protein. **Virology.** 248: 6-11.
- Simon, J.F., R. Persson and R.F. Pettersson. 1992. Association of the nonstructural protein NSs of Uukuniemi virus with the 40S ribosomal subunit. **J. Virol.** 66: 4233-4241.
- Sonoda, S. 2003. Analysis of the nucleocapsid protein gene from Tomato spotted wilt virus as target and inducer for posttranscriptional gene silencing. **Plant Sci.** 164: 717-725.
- Sonoda, S. and H. Tsumuki. 2004. Analysis of RNA-mediated virus resistance by NSs and NSm gene sequences from *Tomato spotted wilt virus*. **Plant Sci.** 166: 771-778.
- Takeda, A., K. Sugiyama, H. Nagano, M. Mori, M. Kaido, K. Mise, S. Tsuda and T. Okuno. 2002. Identification of a novel RNA silencing suppressor, NSs protein of *Tomato spotted wilt virus*. **FEBS Lett.** 532: 75-79.
- Ullman, D.E., D.M. Westcot, F.A. Cantone, J.L. Sherwood and T.L. German. 1992a. Immunocytochemical evidence for tomato spotted wilt virus (TSWV) replication on cell of the flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). **Phytopathol.** 82: 1087.

- Ullman, D.E., D.M. Westcot, K.D. Chenault, J.L. Sherwood, T.L. German, M.D. Bandla, F.A. Cantone and H.L. Duer. 1995. Compartmentalization, intracellular transport, and autophagy of Tomato spotted wilt tospovirus proteins in infected thrips cells. **Phytopathol.** 85: 644-654.
- Ullman, D.E., J.J. Cho, R.F.L. Mau, D.M. Westcot, and D.M. Custer. 1992b. A midgut barrier to tomato spotted wilt virus acquisition by adult western flower thrips. **Phytopathol.** 82: 1333-1342.
- Ullman, D.E., T.L. German, J.L. Sherwood, D.M. Westcot and F.A. Cantone. 1993. *Tospovirus* replication in insect vector cells: immunocytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S RNA of Tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. **Phytopathol.** 83: 456-463.
- Van Regenmortel, M.H. 1993. Synthetic peptides versus natural antigens in immunoassays. **Ann. Biol. Clin. Paris.** 51: 39-41.
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends Genet.** 17: 449-459.
- Voinnet, O., Y.M. Pinto and D.C. Baulcombe. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 96: 14147-14152.
- Warin, N., A. Bhunchoth, P. Chiemsombat, P. Petchsoongnern, C. Seepiban and O. Gajanandana. 2005. The occurrence of Capsicum chlorosis virus in peanut in Thailand. **BioThailand 2005.** November 2-5, 2005. Bangkok, Thailand.
- Waterhouse, P.M., M.B. Wang and T. Lough. 2001a. Gene silencing as an adaptive defense against viruses. **Nature.** 411: 834-842.

- Waterhouse, P.M., M.B. Wang and E.J. Finnegan. 2001b. Role of short RNAs in gene silencing. **Trends Plant Sci.** 6: 297-302.
- Whitfield, A.E., D.E. Ullman and T.L. German. 2005. Tospovirus-thrips interaction. **Annu. Rev. Phytopathol.** 43: 459-489.
- Wijkamp, I. and D. Peters. 1993. Determination of the median latent period of two tospoviruses in *Frankliniella occidentalis*, using a novel leaf disc assay. **Phytopathol.** 83: 618-622.
- Wijkamp, I., J. van Lent, R. Kormelink, R. Goldbach and D. Peters. 1993. Multiplication of tomato spotted wilt virus in its insect vector, *Frankliniella occidentalis*. **J. Gen. Virol.** 74: 341-349.
- Wijkamp, I., R. Almaraz, R. Goldbach and D. Peters. 1995. Distinct levels of specificity in thrips transmission of tospoviruses. **Phytopathol.** 85: 1069-1074.
- Yeh, S.D. and T.F. Chang. 1995. Nucleotide sequence of the N gene of watermelon silver mottle virus, a proposed new member of the genus *Tospovirus*. **Phytopathol.** 85: 58-64.

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. LB broth

Thyptone	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
NaCl	5	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร และนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 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 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

การเตรียมสารเคมีในการตรวจสอบโปรตีน

1. Bradford's reagent

0.01% Coomassie brilliant blue G250	0.1	กรัม
10% Phosphoric acid	100	มิลลิลิตร

ชั่ง Coomassie brilliant blue G250 และละลายด้วย 95% ethanol ปริมาตรเล็กน้อยก่อน และตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร จากนั้นกรองผ่านกระดาษ Whatman No. 1 และห่อด้วย aluminium foil เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. 2X SDS-PAGE sample buffer

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

ชั่ง และตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกัน และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

3. 5X SDS-PAGE running buffer

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

ชั่ง และตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

4. Tris-glycine SDS-PAGE 5% Stacking

H ₂ O	2.7	มิลลิลิตร
1 M Tris, pH 6.8	0.5	มิลลิลิตร
30% Polyacrylamide	0.67	มิลลิลิตร
10% SDS	0.04	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.04	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

ดวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาณเป็น 4 มิลลิลิตร

5. Tris-glycine SDS-PAGE 12% Separating

H ₂ O	3.3	มิลลิลิตร
1 M Tris, pH 8.8	2.5	มิลลิลิตร
30% Polyacrylamide	4.0	มิลลิลิตร
10% SDS	0.1	มิลลิลิตร
10% Ammonium persulfate	0.1	มิลลิลิตร
TEMED	0.004	มิลลิลิตร

ดวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาณเป็น 10 มิลลิลิตร

6. Protein staining solution

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

ชั่ง และดวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาณเป็น 1 ลิตร

7. Destaining solution

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

ดวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาณเป็น 1 ลิตร

8. Lysis buffer

50 mM NaH ₂ PO ₄	6.90	กรัม
300 mM NaCl	17.54	กรัม
10 mM Imidazole	0.68	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาณ 1 ลิตร

9. Wash buffer

50 mM NaH ₂ PO ₄	6.90	กรัม
300 mM NaCl	17.54	กรัม
20 mM Imidazole	1.36	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาณ 1 ลิตร

10. Elution buffer

50 mM NaH ₂ PO ₄	6.90	กรัม
300 mM NaCl	17.54	กรัม
250 mM Imidazole	17.0	กรัม

ซึ่งส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 8.0 ด้วย NaOH และเติมน้ำให้ได้ปริมาณ 1 ลิตร

11. Protein staining solution

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

ชั่ง และตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

12. Destaining solution

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

ตวงส่วนประกอบตามปริมาณข้างต้น ละลายเข้าด้วยกันจะได้ปริมาตรเป็น 1 ลิตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายสุรศักดิ์ ชันคำ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	24 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2522
สถานที่เกิด	จังหวัดอุบลราชธานี
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2540 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเบ็ญจะมะมหาราช จ. อุบลราชธานี พ.ศ. 2544 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2550 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	พนักงานของรัฐ ตำแหน่งอาจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย มหาสารคาม ต. ขามเรียง อ. กันทรวิชัย จ. มหาสารคาม 44150 E-mail address: skhankhum@yahoo.com
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	พ.ศ. 2550 การนำเสนอผลงานภาคบรรยาย ประเภทดี ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับ บัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 7
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	พ.ศ. 2546 ทุนนิสิตบัณฑิตศึกษา ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน พ.ศ. 2548 ทุนพัฒนาอาจารย์สำนักงานการอุดมศึกษา โดยมหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2549 ทุนโครงการนักเรียนแลกเปลี่ยนมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ และ Louisiana State University, The United State of America

