KHON KAEN AGR. J. 48 (5): 954-965 (2020)./doi:10.14456/kaj.2020.87.

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองพริกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

Complete genomes of begomovirus associated with pepper yellow leaf curl disease in the Northeastern Thailand

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

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

บทคัดย่อ: งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของไวรัสใบหงิกเหลืองพริก เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนการตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำและนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานโรคใบหงิกเหลืองต่อไป โดยเก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พ.ศ. 2561 รวม 5 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิ นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ และศรีสะเกษ เลือกตัวอย่างจากจังหวัดบุรีรัมย์ (BRM103) มาสกัดดีเอ็นและเพิ่มปริมาณจีโนมด้วยวิธี Rolling circle amplification (RCA) นำผลผลิตดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII สำหรับ DNA-A และ *Sph*I สำหรับ DNA-B เมื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า DNA-A มีขนาด 2,742 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 6 open reading frame (ORFs) คือ AV1, AV2, AC1, AC2, AC3 และ AC4 ส่วน DNA-B มีขนาด 2,731 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 2 ORFs คือ BC1 และ BV1 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCTHV) isolate KON-KG5 segment DNA-A (accession no.KT322141) สูงสุดที่ระดับ 98.58 % และ PepYLCTHV isolate KON-KG5B segment DNA-B (accession no. KX885224) สูงสุดที่ระดับ 97.44 % ตามลำดับ ตั้งชื่อว่า *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCTHV) isolate BRM103 และรายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank โดย DNA-A และ DNA-B มี accession no. MK946436 และ MK946435 ตามลำดับ และเมื่อนำ DNA-A ของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกในประเทศไทยจำนวน 6 ไอโซเลทมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกันด้วยวิธีการ pairwise sequence comparison พบว่าเชื้อ 5 ใน 6 ไอโซเลทเป็น species เดียวกัน โดยมี 4 ไอโซเลทที่จัดอยู่ใน strain เดียวกัน

คำสำคัญ: โรคใบหงิกเหลืองพริก, จีโนม, ดีเอ็นเอ-เอ, ดีเอ็นเอ-บี

Received December 9, 2019

Accepted April 15, 2020

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

[3] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

[3] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

*corresponding author: agrrat@ku.ac.th

แก่นเกษตร 48 ฉบับที่ 5: 954-965 (2563)./doi:10.14456/kaj.2020.87.

ABSTRACT: This research aims to study the complete genome of *Pepper yellow leaf curl virus* (PepYLCV) to support the development of accurate diagnosis and will benefit for the disease resistance breeding program afterward. Pepper symptoms associated with yellow leaf curl disease were collected in 2018 harboring 5 provinces including Chaiyaphum, Nakhon Ratchasima, Buriram, Surin and Sisaket. Total DNA of the samples from Buriram province (BRM103) was extracted and its genome was amplified by rolling circle amplification (RCA). Then single digestion was performed using *Hind*III for DNA-A and *Sph*I for DNA-B. Analysis of the nucleotide sequences showed that the DNA-A contained 2,742 nucleotides which comprised of 6 open reading frame (ORFs); AV1, AV2, AC1, AC2, AC3 and AC4 while the DNA-B contained 2,731 nucleotides and comprised of 2 ORFs; BC1 and BV1. Comparison of the nucleotide sequences obtained in this study with the GenBank database showed close relationship to *Pepper yellow leaf curl* Thailand *virus* (PepYLCTHV) isolate KON-KG5 segment DNA-A (accession no. KT322141) at 98.58 % and PepYLCTHV isolate KON-KG5B segment DNA-B (accession no. KX885224) at 97.44 %, respectively. The begomovirus in this study was designated *Pepper yellow leaf* curl *Thailand virus* (PepYLCTHV) isolate BRM103 and the sequences were submitted in the GenBank database (accession no. MK946436 and MK946435). Analysis of the genetic relationship among 6 reported isolates of begomoviruses associated with pepper yellow leaf curl disease in Thailand based on DNA-A, using pairwise sequence comparison program, showed that five reported isolates are the same species and four out of those are the same strain.

Keywords: pepper yellow leaf curl disease, genome, DNA-A, DNA-B

บทนำ

พริก (*Capsicum* spp.) เป็นพืชผักที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2561 มีมูลค่าการส่งออกพริกสดและพริกแห้งปริมาณรวม 28,894.73 ตัน คิดเป็นมูลค่าสูงถึง 974.35 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2562) แต่การผลิตพริกมักพบโรคที่สำคัญหลายชนิดซึ่งส่งผลกระทบต่อผลผลิตของพริก โรคที่เกิดจากเชื้อเบโกโมไวรัสเป็นอีกโรคหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตพริกเป็นวงกว้าง เครือพันธุ์และวันเพ็ญ (2545) รายงานว่า มีการวินิจฉัยโรคพริกใบหงิกเหลืองในพริกขี้หนู *Capsicum annuum* ครั้งแรกในปี พ.ศ. 2537 เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อ *Pepper yellow leaf curl virus* (PepYLCV) โดยพบการระบาดของโรคในแหล่งปลูกพริกทั่วทุกภาคของประเทศไทยจำนวนมากกว่า 20 จังหวัด ต่อมา พิสสวรรณ และบุณณดา (2558) ได้รายงานการสำรวจโรคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่าทำความเสียหายต่อการปลูกพริกอย่างรุนแรงถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะกล้า โดยพริกแสดงอาการใบด่างหงิกเหลือง ต้นแคระแกร็น และผลผลิตลดลงถึง 80 % นอกจากนี้ Kenyon et al. (2014) ได้รายงานว่าพบการระบาดของโรคนี้ในหลายประเทศของทวีปเอเชีย เช่น อินเดีย ปากีสถาน บังกลาเทศ อินโดนีเซีย รวมทั้งประเทศไทย โดยพริกแสดงอาการใบหงิก ใบเหลืองและด่างเหลืองอย่างรุนแรง ดอกร่วง ผลมีสีซีด ขนาดเล็กลงและหงิกงอ ต้นแคระแกร็น ซึ่งโรคนี้สามารถทำให้คุณภาพของผลผลิตลดลงและได้รับความเสียหายถึง 100 % (Marte and Wetter, 1986; Kumar et al., 2006)

การปรับปรุงพันธุ์พริกให้ต้านทานต่อโรคใบหงิกเหลืองเป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและลดการเกิดโรคนี้ได้ (Kumar et al., 2006) เนื่องจากยังไม่มีสารเคมีที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเชื้อไวรัสพืช โดยการปรับปรุงพันธุ์เริ่มจากการประเมินเชื้อพันธุกรรมพริกที่ต้านทานต่อโรคใบหงิกเหลือง นอกจากจะมีแหล่งพันธุกรรมพริกที่ใช้ทดสอบความต้านทานโรคแล้ว ยังควรข้อมูลความสัมพันธ์และความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกสำหรับใช้เป็นแหล่งของเชื้อทดสอบความต้านทาน เนื่องจากในสภาพแปลงปลูกในแต่ละพื้นที่อาจมีความรุนแรงและความหลากหลายของเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

แตกต่างกัน งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกซึ่งพบในแหล่งปลูกพริกที่สำคัญทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือและวิเคราะห์ความหลากหลายโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกที่เคยรายงานในประเทศไทย ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพในการต้านทานโรคและประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสชนิดนี้ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างโรคใบหงิกเหลืองพริก

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการของโรคใบหงิกเหลืองในพื้นที่ปลูกพริกภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัด ซึ่งดำเนินการศึกษาวิจัยในปี พ.ศ. 2561 ได้แก่ จังหวัดชัยภูมิ (CPM) นครราชสีมา (NRT) บุรีรัมย์ (BRM) สุรินทร์ (SRN) และศรีสะเกษ (SSK) โดยสุ่มเก็บแบบกระจายทั่วทั้งแปลง (stratified random sampling) ตามวิธีการของ Delp et al. (1986) นำมาตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพริกจากแอนติบอดีที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ ได้แก่ *Tobacco mosaic virus* (TMV) (ธนายุทธ์, 2547), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) (ธีร์วศิษฐ์ และคณะ, 2560), *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) (รัชนี และคณะ, 2556), *Potato virus Y* (PVY) (วรลักษณ์, 2555), *Tomato necrotic ring virus* (TNRV) (คนึงนิจ, 2553), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (รัชนี และคณะ, 2556) และ *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) (สรรชัย และรัชนี, 2560) ด้วยวิธี Indirect plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (Indirect PTA-ELISA) ดัดแปลงจากวิธีการของ รัชนี (2558)

เคลือบหลุม ELISA ด้วยตัวอย่างพืชที่บดใน coating buffer อัตราส่วน 1:10 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ล้าง plate ด้วย PBS-T (Phosphate-buffered Saline + 0.1% Tween® 20) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม blocking buffer (5% Skim milk) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมแอนติบอดีแต่ละชนิดที่เจือจาง 1:1,000 ใน blocking buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม goat anti-rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (GAR) ที่เจือจางอัตราส่วน 1:30,000 ใน blocking buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการล้าง plate ในแต่ละขั้นตอน ด้วย PBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตรวจสอบปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย *p*-Nitrophenyl phosphate (PNPP) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน substrate buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ELISA reader (Labsystems, Finland)

การโคลนจีโนมของไวรัสใบหงิกเหลืองพริก

นำตัวอย่างพริกที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีดังกล่าวมาจัดกลุ่มลักษณะอาการของโรคและตรวจวิเคราะห์ต่อไปว่ามีสาเหตุจากเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองหรือไม่ โดยนำตัวอย่างใบพริกมาสกัดดีเอ็นเอรวมดัดแปลงจากวิธีการของ Doyle and Doyle (1987) บดใบพริก 100 มิลลิกรัมในไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เติม 2X CTAB buffer (2% CTAB + 2% PVP + 100 mM Tris-HCl pH 8.0 + 20 mM EDTA pH 8.0 + 1.4 M NaCl และ 2% 2-Mercaptoethanol) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร อัตราส่วนใบพืช:บัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:6 (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติม Chloroform:Isoamyl Alcohol (24:1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 2 รอบ จากนั้นเติม Isopropanol 600 ไมโครลิตรเพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol และ 70% Ethanol ตามลำดับ ตากตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้องและละลายใน Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0 + 1 mM EDTA pH 8.0) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

นำดีเอ็นเอรวมจากตัวอย่างพริกที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี มาเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสด้วยวิธี rolling circle amplification

(RCA) โดยใช้ TempliPhi DNA Kit (GE Healthcare, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต นำ Total genomic DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อให้เกิดการตัดเพียง 1 ตำแหน่ง โดยทดสอบเอนไซม์ต่างๆ รวมทั้งหมด 11 ชนิด ดังนี้ *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Not*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*I, และ *Stf*I (Fermentas, USA) แยกชิ้นจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสซึ่งมีขนาดประมาณ 2,700 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นขนาดของ DNA-A และ DNA-B (Hanley-Bowdoin et al., 1999) ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ใน Tris borate buffer (TBE) ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นำไปย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (LONZA, USA) เปรียบเทียบกับ 100 bp Plus DNA ladder (Fermentas, USA) ตัดแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV สกัดชิ้นจีโนมออกจากเจลด้วย FavoPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit (Favorgen, Taiwan) ตามวิธีการของผู้ผลิต และตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer เพื่อนำไปเชื่อมกับ pQE-80L vector (Qiagen, USA) ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกัน ด้วยเอนไซม์ ligase ตามวิธีการของบริษัท (Invitrogen, USA) ถ่ายฝาก recombinant plasmid กับเชื้อ *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ Heat shock (Sambrook et al., 1989) นำเซลล์ *E. coli* ไปเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani (LB) broth ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง คัดเลือกเซลล์ *E. coli* ที่มี recombinant plasmid นำไปตรวจหาชิ้นยีนด้วยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับ recombinant pQE-80L plasmid สกัดพลาสมิดที่ถูกคัดเลือกโดยใช้ FravoPrep™ Plasmid Purification Mini kit และส่งดีเอ็นเอไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Sanger sequencing method (Sanger and Coulson, 1975) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเบโกโมไวรัสในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) ด้วยโปรแกรม Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/ Blast.cgi?PAGE_TYPE= BlastSearch)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกจากตัวอย่างกับรายงานเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกที่มีรายงานใน Genbank ด้วยวิธีการชีวสารสนเทศศาสตร์

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกจากตัวอย่างพริกกับรายงานเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกที่มีรายงานในประเทศไทยในส่วนของ DNA-A มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Sequence Demarcation Tool (SDT) version 1.2 (http://web.cbio.uct.ac.za/~brejnev/) เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกจากตัวอย่างในงานวิจัยนี้กับเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริกซึ่งพบในทวีปเอเชียที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi .nlm.nih.gov/genbank/) ในส่วนของ DNA-A ด้วยโปรแกรม MEGA version X version 10.0.5 (http://www.megasoftware.net/) เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกที่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank ด้วยวิธี Neighbor joining (NJ) method (Saitou and Nei, 1987)

ผลการทดลอง

การเก็บตัวอย่างพริกที่เป็นโรคใบหงิกเหลือง

เก็บตัวอย่างพริกที่แสดงอาการใบด่าง ใบหงิก ใบเหลือง ใบลดรูป และใบที่ไม่แสดงอาการ จากแปลงปลูกใน 5 จังหวัด จำนวนทั้งสิ้น 225 ตัวอย่าง ผลการตรวจสอบเบื้องต้นด้วยวิธี ELISA พบว่า มีตัวอย่างที่ติดเชื้อไวรัสจำนวนทั้งสิ้น 220 ตัวอย่าง ได้แก่ ติดเชื้อ CMV 87 ตัวอย่าง, ChiVMV 45 ตัวอย่าง, PMMoV 42 ตัวอย่าง, ToLCNDV 26 ตัวอย่าง, WSMoV 15 ตัวอย่าง, PVY 3 ตัวอย่าง, TMV 1 ตัวอย่าง และ TNRV 1 ตัวอย่าง และพบพริก 5 ตัวอย่างที่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทั้ง 8 ชนิด แต่แสดงอาการของโรคใบหงิกเหลือง ได้แก่ ตัวอย่าง BRM103, CPM28, NRT55, SRN153 และ SSK212 เลือกตัวอย่าง BRM103 ซึ่งเก็บจากจังหวัดบุรีรัมย์ (**Figure 1**) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

Figure 1 Begomovirus-like symptoms on the pepper sample BRM103 from Burirum province.

การโคลนจีโนมและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสใบหงิกเหลืองพริก

นำ templiPhi products จากตัวอย่าง BRM103 มาเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสและสุ่มตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะทั้งหมด 11 ชนิด พบว่า *Hind*III และ *Sph*I สามารถตัด templiPhi products จากตัวอย่าง BRM103 ได้ 1 ตำแหน่ง โดยผลจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบ DNA-A ที่ถูกตัดด้วย *Hind*III ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 70 และ DNA B ที่ถูกตัดด้วย *Sph*I ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 303 โดย DNA-A มีขนาด 2,742 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 6 open reading frames (ORFs) คือ AV1 (coat protein), AV2 (pre–coat protein), AC1 (replication–associated protein), AC2 (transcriptional activator protein), AC3 (replication enhancer), AC4 (AC4 protein) (**Table 1** และ **Figure 2**) และ DNA-B มีขนาด 2,732 นิวคลีโอไทด์ ประกอบด้วย 2 ORFs คือ BC1 (movement protein) และ BV1 (nuclear shuttle protein) (**Table 2** และ **Figure 2**) จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อเบโกโมไวรัสที่ศึกษากับฐานข้อมูล GenBank พบว่า DNA-A มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ PepYLCTHV isolate KON-KG5 segment DNA-A (accession no. KT322141) สูงสุดที่ระดับ 98.58 % และ DNA-B มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ PepYLCTHV isolate KON-KG5B segment DNA-B (accession no. KX885224) สูงสุดที่ระดับ 97.44 % ตั้งชื่อว่า *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCTHV) isolate BRM103 ตามคำแนะนำการตั้งชื่อของ Brown et al.,(2015) และได้รายงานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank โดย DNA-A และ DNA-B มี accession no. MK946436 และ MK946435 ตามลำดับ

แก่นเกษตร 48 ฉบับที่ 5: 954-965 (2563)./doi:10.14456/kaj.2020.87.

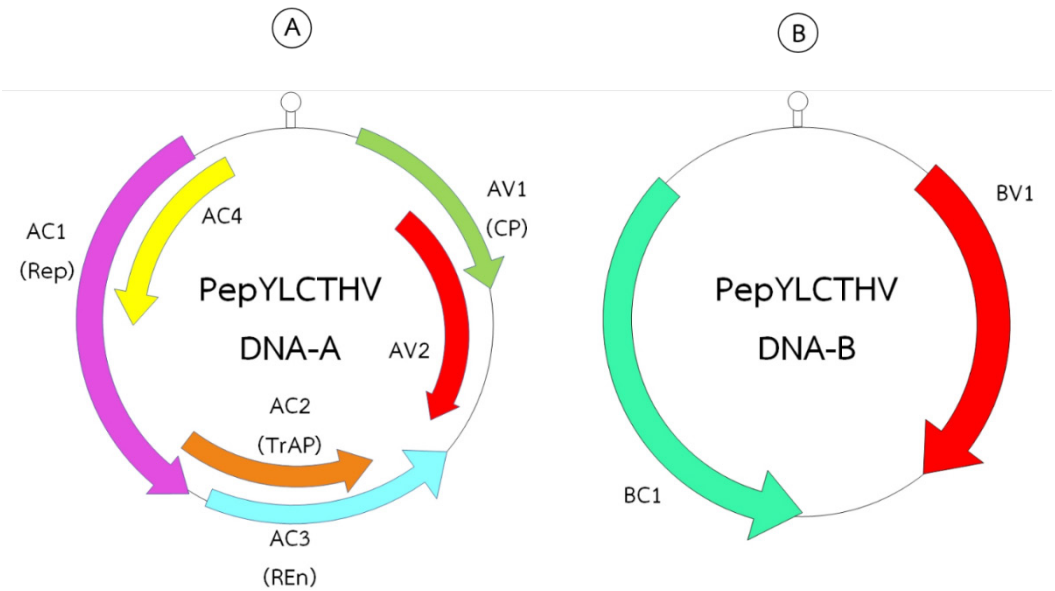

Figure 2 Diagrammatic representation of PepYLCTHV isolate BRM103 complete genome comprising DNA-A and DNA-B components:

A = DNA-A encodes two proteins in the virion-sense strand; AV1 (coat protein) and AV2 (pre-coat protein), and four proteins in the complementary-sense strand; AC1 (replication associated protein), AC2 (transcriptional activator protein), AC3 (replication enhancer protein), and AC4.

B = DNA-B encodes two proteins, one in the virion-sense; BV1 (nuclear shuttle protein) and one in the complementary sense; BC1 (movement protein).

Table 1 Characterization of the open reading frames (ORFs) of *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCTHV) isolate BRM103 DNA-A genome

ORF	Frame	Protein name	Nucleotide position	Number of nucleotides	Number of amino acids
AV1	+2	coat protein	290-1063	774	257
AV2	+1	pre coat protein	130-480	351	116
AC1	-2	replication–associated protein	2597-1527	1071	356
AC2	-3	transcriptional activator protein	1609-1205	405	134
AC3	-1	replication enhancer protein	1464-1060	405	134
AC4	-3	AC4 protein	2440-2102	339	112

Table 2 Characterization of the open reading frames (ORFs) of *Pepper yellow leaf curl Thailand virus* (PepYLCTHV) isolate BRM103 DNA-B genome

ORF	Frame	Protein name	Nucleotide position	Number of nucleotides	Number of amino acids
BV1	+3	movement protein	84-794	711	236
BC1	-1	nuclear shuttle protein	1858-1185	684	227

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกจากตัวอย่างพริกกับเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกที่มีรายงานในประเทศไทยด้วยวิธีการชีวสารสนเทศศาสตร์

จากการรายงานครั้งที่ 9 ของ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (http://ictvonline.org/) ซึ่งเสนอให้จำแนก species และ strain ของเบโกโมไวรัสด้วยวิธีการ pairwise sequence comparison เพื่อการคำนวณค่า identity percentage โดยใช้เฉพาะ DNA-A เท่านั้น ด้วยโปรแกรม Sequence Demarcation Tool (SDT) (Muhire et al., 2014) โดยใช้หลักเกณฑ์การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มเบโกโมไวรัส ที่กำหนดให้ต้องมีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนมที่เปรียบเทียบกันมี identity percentage มากกว่า 91 % จึงจะเป็นเชื้อชนิด (species) เดียวกัน มากกว่า 94 % จึงจะเป็นสายพันธุ์ (strain) เดียวกัน (Brown et al., 2015) ในรายงานวิจัยนี้พบว่า PepYLCTHV isolate BRM103 จากจังหวัดบุรีรัมย์ กับ Pepper leaf curl virus (PepLCV) (accession no. AF134484.2) จากจังหวัดกาญจนบุรี, PepYLCTHV isolate SNS-CM5 (accession no. KT322142.1) จากจังหวัดเชียงใหม่, PepYLCTHV isolate SPN-PG1 segment (accession no. KT322143.1) และ PepYLCTHV isolate WF-SPN-Pep2015 segment (accession no. KX943290.1) จากจังหวัดสุพรรณบุรี, PepYLCTHV isolate TMK-KR5 segment (accession no. KT322145.1) จากจังหวัดกาญจนบุรี และ PepYLCTHV isolate KON-KG5 (accession no. KT322141.1) จากจังหวัดขอนแก่น มีค่า identity percentage อยู่ที่ 88.72 %, 92.82 %, 98.32 %, 98.39 %, 98.39 % และ 98.79 % ตามลำดับ (Figure 3) เมื่อพิจารณาจากเกณฑ์การจำแนก species ที่ 91 % แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลทที่มีรายงานในประเทศไทยเป็น species เดียวกัน ยกเว้น PepLCV (accession no. AF134484.2) โดยมี 4 ไอโซเลทที่จัดอยู่ใน strain เดียวกัน ได้แก่ PepYLCTHV isolate SPN-PG1, isolate WF-SPN-Pep2015, isolate TMK-KR5 และ isolate KON-KG5 ตามเกณฑ์การจำแนก species

ที่ 94 % แม้ว่าจะมี identity percentage และจังหวัดที่พบแตกต่างกันแต่เชื้อ PepYLCTHV ก็ยังทำให้เกิดอาการโรคใบหงิกเหลืองพริกคล้ายกัน ความผันแปรทางพันธุกรรมนี้อาจจะได้เกิดขึ้นได้ง่ายจากกระบวนการทางธรรมชาติ เช่น mutation และ recombination ที่เกิดขึ้นได้ง่ายกับไวรัสในกลุ่มเบโกโมไวรัส (García-Andrés et al., 2007)

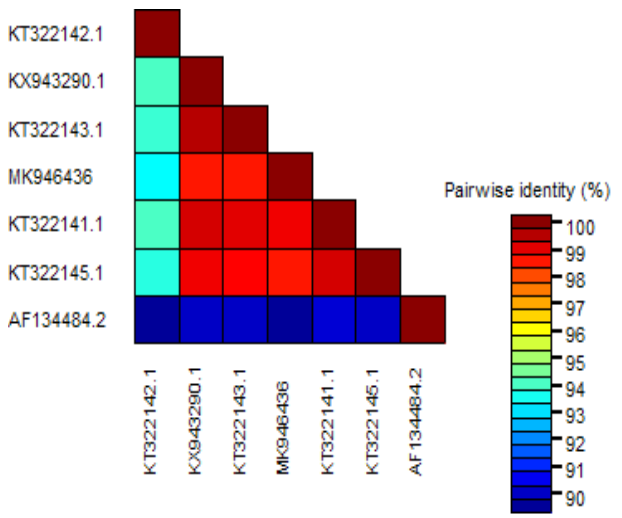

Figure 3 Distribution of begomovirus full-length DNA-A component and % pairwise nucleotide sequence identity scores. Six PepYLCTHV sequences pairs were individually pairwise aligned to one another using MUSCLE. The calculation was performed using Sequence Demarcation Tool version 1.2

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ PepYLCTHV isolate BRM103 กับข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริกพบในทวีปเอเชีย (reference genome) ในส่วนของ DNA-A ด้วยโปรแกรม MEGA -X version 10.0.5 พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสของเชื้อ PepYLCTHV ทั้งหมดที่มีรายงานในประเทศไทย มีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอนุรักษ์ (conserved sequence) ที่จำเพาะในกลุ่มเชื้อชนิดนี้ ซึ่งอยู่ประมาณลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 361-397 และ 958-998 แต่แตกต่างจากเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริกชนิดอื่น (**Figure 4**) ซึ่งสอดคล้องกับ Wyatt and Brown (1996) รายงานว่ายีน AV1 (coat protein) เป็นส่วนอนุรักษ์มากที่สุดในกลุ่มเชื้อเบโกโมไวรัส จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining ที่ค่า bootstrap 1000 ครั้ง ของการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ DNA-A ของเชื้อ PepYLCTHV isolate BRM103 กับรายงานเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองพริกที่มีรายงานในประเทศไทย และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ *Geminiviridae* เป็น out group พบว่าเชื้อ PepYLCTHV isolate BRM103 (accession no. MK946436), PepYLCTHV (Chiemsombat et al., 2018) และ PepLCV (Samretwanich et al., 2000) ที่มีรายงานในประเทศไทยมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันและถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันที่ค่าความน่าเชื่อถือ 100 % (**Figure 5**) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อเบโกโมไวรัสที่เข้าทำลายพริกชนิดอื่น งานวิจัยนี้เป็นรายงานแรกในประเทศไทยที่แสดงผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองพริก PepYLCTHV ทั้ง DNA-A และ DNA-B

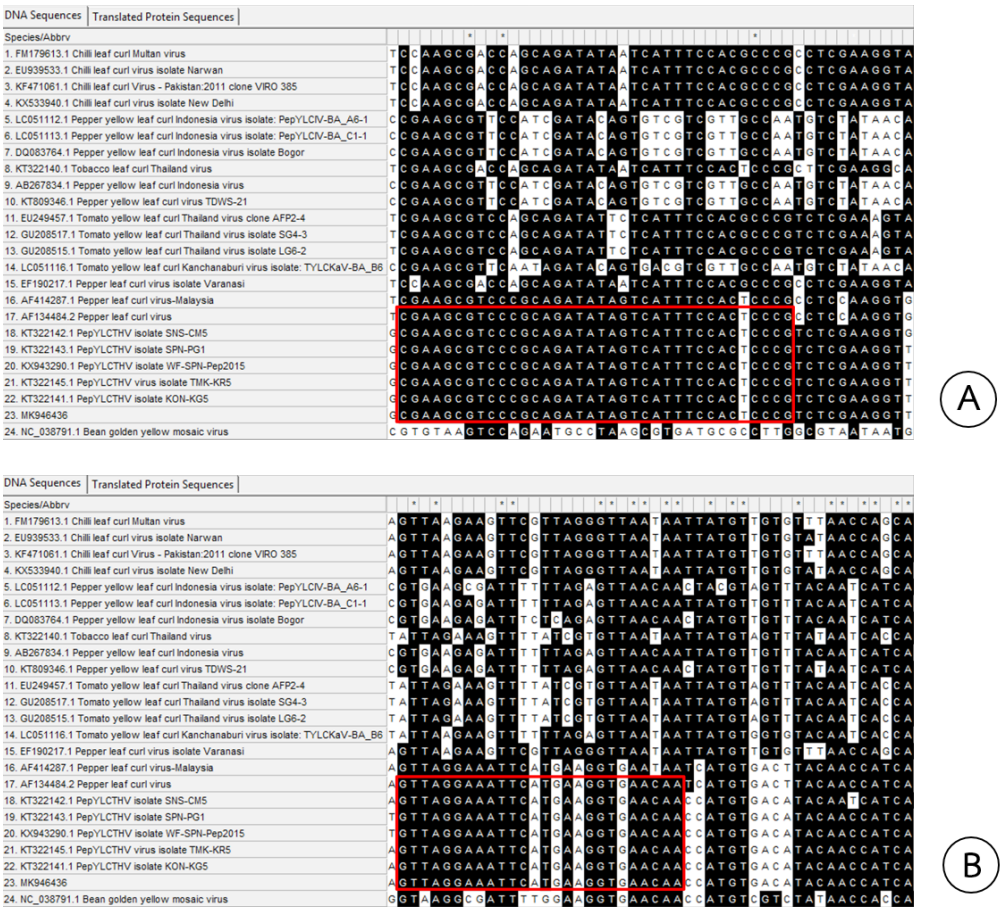

Figure 4 Alignment of the nucleotide sequence regions of the partial AV1 gene on DNA-A from 21 begomoviruses associated with yellow leaf curl disease:

A = Conserved sequence regions on PepYLCTHV at nucleotides 361-397.

B = Conserved sequence regions on PepYLCTHV at nucleotides 958-998.

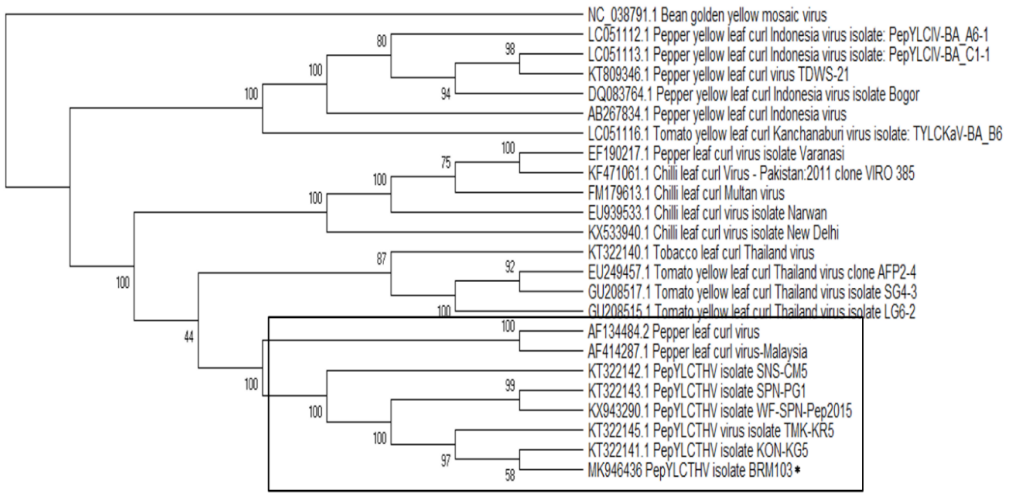

Figure 5 Phylogenetic analysis based on DNA-A full-length alignment showing genetic relationship of PepYLCTHV isolate BRM103 (accession no. MK946436) with other virus species causing pepper yellow leaf curl disease. Neighbour-joining tree were reconstructed using MEGA X with 1000 replications bootstrapping. The star above begomovirus isolate indicates the previous recognized begomoviruses in GenBank which show the highest identity with samples

สรุป

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสใบหงิกเหลืองพริกจากจังหวัดบุรีรัมย์ โดยนำมาเพิ่มปริมาณจีโนมด้วยวิธี RCA พบว่าเป็นเชื้อเบโกโมไวรัสซึ่งมีจีโนมแบบ bipartite ประกอบด้วย DNA-A ขนาด 2,742 นิวคลีโอไทด์และ DNA-B ขนาด 2,731 นิวคลีโอไทด์ โดยพบยีนที่เป็นองค์ประกอบใน virion-sense และ complementary-sense strands เช่นที่มีรายงานในเบโกโมไวรัสที่มี bipartite genome นอกจากนั้นยังพบลำดับนิวคลีโอไทด์ของส่วนอนุรักษ์เหมือนกันทั้งสองวง เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A และ DNA-B ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ PepYLCTHV isolate KON-KG5 segment DNA A และ PepYLCTHV isolate KON-KG5B segment DNA B ที่ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 98.58 % และ 97.44 % ตามลำดับ โดยได้รายงานไว้ในฐานข้อมูล GenBank มี accession no. MK946436 และ MK946435 ตามลำดับ นอกจากนั้นยังพบว่า DNA-A ของเชื้อ PepYLCTHV ในประเทศไทยจำนวน 4 ไอโซเลทจัดเป็น strain เดียวกัน การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ PepYLCTHV ทุกไอโซเลทที่พบในประเทศไทย ยังไม่แสดงถึงความหลากหลายของเชื้อเนื่องจากพบว่าเป็นชนิดเดียวกัน โดยส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งสามารถนำข้อมูลไปประยุกต์ในการออกแบบไพรเมอร์จากลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนอนุรักษ์ของเชื้อ PepYLCTHV เพื่อใช้ในการตรวจวินิจฉัยที่แม่นยำด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน, ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือเพื่อใช้ในงานวิจัย และได้รับการสนับสนุนการวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ตามยุทธศาสตร์การวิจัยและนวัตกรรม ประเภทบัณฑิตศึกษา จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2562

เอกสารอ้างอิง

คนึงนิจ ศรีวิลัย. 2553. เชื้อ *Tomato necrotic ringspot virus* ที่แยกจากพริก (*Capsicum annuum*) ในภาคเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และวันเพ็ญ ศรีทองชัย. 2545. โรคไวรัสที่สำคัญของพืชผักและพืชน้ำมัน. โรงพิมพ์ ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

ธนายุทธ์ จิรัฐพงศ์. 2547. การเปรียบเทียบการผลิตแอนติบอดีในไก่และกระต่ายโดยใช้ *Tobacco mosaic virus* เป็นแอนติเจน. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธีร์วศิษฐ์ แพทย์สมาน, รัชนี ฮงประยูร และสิริกุล วะสี. 2560. โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสใบด่างพริก: การผลิต คุณสมบัติ และการนำไปใช้ในการตรวจวินิจฉัย. วิทยาศาสตร์เกษตร. 48: 403-414.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ และบุณณดา ศรีคำผึ้ง. 2558. ความผันแปรทางพันธุกรรมของเบโกโมไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศและพริกและการถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหวี่ขาว. น. 109-118. ใน: รายงานการประชุมอารักขาพืชแห่งชาติ ครั้งที่ 12 วันที่ 20-22 ตุลาคม 2558. เชียงราย.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. การส่งออกพริก. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งข้อมูล: http://www.oae.go.th/view/1/ข้อมูลการผลิตสินค้าเกษตร/TH-TH. ค้นเมื่อ 1 กันยายน 2562.

รัชนี ฮงประยูร, เอกสิทธิ์ โฆสิตสกุลชัย, คนึงนิตย์ เหรียญวรากร, วรรณวิไล อินทนู, สุภาพร กลิ่นคง, อนุมัติ อิงคนันท์, และบรรจบ วันกิ่ง. 2556. รายงานฉบับสมบูรณ์ เรื่องการพัฒนาระบบการตรวจสอบและควบคุมโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำซากในพืชผักตระกูลแตง. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

รัชนี ฮงประยูร. 2558. เทคนิคทางซีรัมวิทยาในการตรวจวินิจฉัยโรคพืช. เพรซเกษมพริ้นติ้งกรุ๊ป, นครปฐม.

วรลักษณ์ ฆะปัญญา. 2555. การแสดงออกของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเชื้อ *Potato virus* Y (PVY) ในเซลล์ *E. coli* DH5α และการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะ. ปัญหาพิเศษ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สรรชัย จันทะจร และรัชนี ฮงประยูร. 2560. การผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคลูกผสมเพื่อการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ *Tomato leaf curl New Delhi virus*-[Thailand: Kanchanaburi: Cucumber: 2012]. วิทยาศาสตร์เกษตร. 48: 415-429.

Brown, J. K., F. M. Zerbini, J. Navas-Castillo, E. Moriones, R. Ramos-Sobrinho, J. C. Silva, and A. Varsani. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. Arch. Virol. 160: 1593-1619.

Chiemsombat, P., B. Srikamphung, and S. Yule. 2018. Begomoviruses associated to pepper yellow leaf curl disease in Thailand. J. Agri. Res. 3: 1-11.

Delp, B. R., L. J. Stowell, and J. J. Marois. 1986. Evaluation of field sampling techniques for estimation of disease incidence. Phytopathology. 76: 1299-1305.

Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin. 19: 11-15.

García-Andrés, S., G. P. Accotto, J. Navas-Castillo, and E. Moriones. 2007. Founder effect, plant host, and recombination shape the emergent population of begomoviruses that cause the tomato

yellow leaf curl disease in the Mediterranean basin. Virology. 359: 302-312.

Hanley-Bowdoin, L., S. B. Settlage, B. M. Orozco, S. Nagar, and D. Robertson. 1999. Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. Crit. Rev. Plant Sci. 18: 71–106.

Kenyon, L., W. S. Tsai, S. L. Shih, and L. M. Lee. 2014. Emergence and diversity of begomoviruses infecting solanaceous crops in East and Southeast Asia. Virus Res. 186: 104-113.

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

Marte, M., and C. Wetter. 1986. Occurrence of pepper mild mottle virus in pepper cultivars from Italy and Spain. J. Plant Dis. Prot. 93: 37-43.

Muhire, B. M., A. Varsani, and D. P. Martin. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. PloS. One. 9: e108277.

Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Samretwanich, K., P. Chiemsombat, K. Kittipakorn, and M. Ikegami. 2000. A new geminivirus associated with a yellow leaf curl disease of pepper in Thailand. Plant Dis. 84: 1047.

Sanger, F., and A. R. Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. J. Mol. Biol. 94: 441-448.

Wyatt, S. D., and J. K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. Phytopathology. 86: 1288-1293.