

การศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของ *Squash leaf curl China virus* ที่เข้าทำลายฟักทอง ในจังหวัดกาญจนบุรี

Molecular Characterization of *Squash Leaf Curl China Virus* Infecting Pumpkin in Kanchanaburi Province

วิวรรณ ปิยทัตส์^{1,2} และรัชณี สงประยูร^{1,2,3*}

Wiwat Piyatasse^{1,2} and Ratchanee Hongprayoon^{1,2,3*}

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะทางชีวโมเลกุลของ *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) จากตัวอย่างฟักทองในตำบลวังดั่ง อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี ปี พ.ศ. 2559 โดยเก็บตัวอย่างฟักทองที่แสดงอาการโรคที่เกิดจากเชื้อเบโกโมไวรัส จำนวน 19 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสซึ่งมีรายงานว่าเข้าทำลายพืชวงศ์แตง จำนวน 6 ชนิด พบว่า ฟักทอง จำนวน 14 ตัวอย่าง ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทั้งหมด แต่ให้ผลบวกเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ คูไพรเมอร์ที่จำเพาะกับโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) และ SLCCNV ซึ่งจะให้ แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 2,700 คู่เบส เลือกตัวอย่าง KN44 ไปเพิ่มจำนวนจีโนมของเชื้อไวรัสด้วยวิธี rolling circle amplification และตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เพื่อให้ได้ชิ้นยีน DNA-A และ *Hind*III เพื่อให้ได้ชิ้นยีน DNA-B นำดีเอ็นเอ ที่ตัดได้มาโคลนเข้าสู่พลาสมิดพาหะ pQE80-L และถ่ายฝากในแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α เพื่อส่งไปวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง KN44 DNA-A พบว่ามีค่าความคล้ายคลึงกับ SLCCNV isolate Thailand segment A ที่ 97.95% ประกอบด้วย 5 open reading frame (ORFs) ได้แก่ AV1, AV2, AC1, AC2 และ AC3 ในส่วนของ DNA-B มีค่าความคล้ายคลึงกับ SLCCNV isolate Hainan segment B ที่ 91.05% ประกอบด้วย 2 ORFs คือ BV1 และ BC1 ข้อมูลลักษณะทางพันธุกรรมจากงานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่พบทั้ง DNA-A และ DNA-B ของเชื้อ SLCCNV ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อนักปรับปรุงพันธุ์สำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อในกลุ่ม SLCCNV ในประเทศไทยในการ พัฒนาพันธุ์ต้านทานโรคและวิธีการตรวจสอบเพื่อเฝ้าระวังโรคต่อไป

คำสำคัญ: เบโกโมไวรัส จีโนมอนุภาค ฟักทอง

Abstract

Molecular characterization of *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) was carried out on tissues taken from 19 pumpkin samples that showed begomovirus-like symptoms. The samples were collected from Wang Dong subdistrict, Muang district, Kanchanaburi province in 2016. They underwent preliminary screening with six antibodies specific to cucurbit-infecting viruses, and negative results were obtained from 14 samples. However, all of them were positive for the specific primers to the coat protein genes belonging to *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) and SLCCNV. Sample KN44 was selected for genome amplification by rolling circle amplification. A single-cut digestion with *Bam*HI for DNA-A and *Hind*III for DNA-B was performed and the DNA was cloned into pQE80-L plasmid vector. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* DH5α for nucleotide sequencing. The results revealed that the DNA-A component was closely related to SLCCNV isolate Thailand segment A at 97.95 % identity. There were 5 open reading frames (ORFs) comprising AV1, AV2, AC1, AC2 and AC3. The DNA-B component was closely related to SLCCNV isolate Hainan segment B at 91.05% identity and contained 2 ORFs comprising BV1 and BC1. This study is special for a number of reasons, one of which is that this is the first time that genetic information concerned with the SLCCNV DNA-A and DNA-B genomes has been researched and made available in Thailand. This work will surely be of further benefit to researchers and plant breeders in the fields of disease resistance and disease surveillance.

Keywords: begomovirus, bipartite genome, pumpkin

¹ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

² ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

³ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ. กำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

¹ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

² Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900

³ Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom 73140

*Corresponding author, Email: agrat@ku.ac.th

คำนำ

เชื้อเบโกโมไวรัสเป็นหนึ่งในเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายผลผลิตของพืชใบเลี้ยงคู่อย่างกว้างขวาง พบการระบาดเป็นส่วนมากในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน สามารถถ่ายทอดโรคได้โดยแมลงหมีขาว (*Bemisia tabaci*) ซึ่งมีอัตราการแพร่กระจายสูง ยากต่อการป้องกันกำจัด อีกทั้งยังมีพืชอาศัยค่อนข้างกว้าง และสร้างความเสียหายต่อพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น แตงกวา ฟักทอง มะเขือเทศ พริก มันสำปะหลัง ฝ้าย (Vincent, 2013) ปัจจุบันเชื้อเบโกโมไวรัสที่มีรายงานการเข้าทำลายพืชวงศ์แตงในประเทศไทยมี 3 ชนิด คือ *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) (Sawangjit, 2009), *Squash leaf curl Yunnan virus* (SLCuYV) (รุ่งทิพย์ จันเพ็ชร และคณะ 2559) และ *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) (Ito et al., 2008a) พืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะแสดงอาการใบด่างเหลือง ใบหงิก ใบลดรูปหรือเจริญผิดปกติ และต้นเตี้ยแคระแกร็น (Melgarejo et al., 2013) เชื้อไวรัสในจีโนมนี้จัดอยู่ในวงศ์ *Geminiviridae* มีอนุภาคทรงกลมคู่หลายเหลี่ยม (icosahedral twinned particles) มีโครงสร้างจีโนมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวลักษณะเป็นวง จีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสมีสองแบบคือ monopartite ประกอบด้วย DNA-A เพียงอย่างเดียว และ bipartite ซึ่งประกอบด้วย DNA-A และ DNA-B โดย DNA-A ของเชื้อเบโกโมไวรัสทำหน้าที่หลักในการจำลองหรือเพิ่มจำนวนอนุภาคไวรัส มี 6 open reading frame (ORFs) ได้แก่ AV1 แปลรหัสเป็น coat protein (CP), AV2 แปลรหัสเป็น pre-coat protein, AC1 แปลรหัสเป็น Rep protein, AC2 แปลรหัสเป็น transcriptional transactivator protein (TrAP), AC3 แปลรหัสเป็น replication enhancer protein (REn protein) และ AC4 เกี่ยวข้องกับการแสดงอาการของโรค (Marwal et al., 2014) ส่วน DNA-B ทำหน้าที่หลักในการเคลื่อนย้ายสารพันธุกรรมของไวรัสไปสู่เซลล์ถัดไป และเกี่ยวข้องกับการเข้าทำลายในพืชอาศัยหรือเข้าทำลายพืชอาศัยได้มากกว่า 1 ชนิด มี 2 ORFs ได้แก่ BV1 แปลรหัสเป็น nuclear shuttle protein และ BC1 แปลรหัสเป็น movement protein (Nawaz-ul-Rehman and Fauquet, 2009)

ฟักทองเป็นพืชในวงศ์แตง (Cucurbitaceae) สกุล *Cucurbita* แบ่งเป็นสองวงศ์หลัก ได้แก่ ตระกูลฟักทองอเมริกัน (pumpkin) กับตระกูลสควอช (squash) (Robinson and Decker-Walters, 1997) ประเทศไทยมีการส่งออกเมล็ดพันธุ์ฟักทองไปต่างประเทศเป็นอันดับ 8 ของโลก โดยในปี พ.ศ. 2561 มีปริมาณการส่งออกเมล็ดพันธุ์ฟักทองถึง 98.6 ตัน คิดเป็นมูลค่าโดยรวม 228.9 ล้านบาท และมีแนวโน้มในการส่งออกเมล็ดพันธุ์มากขึ้นทุกปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2561) ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งของการปลูกฟักทอง ได้แก่ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในจีโนมเบโกโมไวรัสที่มีการแพร่ระบาดอย่างชุกชุมในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน เชื้อเบโกโมไวรัสที่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2554 ได้แก่ ToLCNDV และ SLCCNV โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคถึงส่วนของ intergenic region (IR) ของเชื้อเบโกโมไวรัส ซึ่งตรวจพบในพืชวงศ์แตง ได้แก่ ฟักทอง ฟักเขียว และบวบเหลี่ยม จากจังหวัดราชบุรี ตัวอย่างในฟักทอง และฟักเขียว จากจังหวัดสุพรรณบุรี และตัวอย่างแตงกวาจากจังหวัดกาญจนบุรี การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัสพบว่า เชื้อที่พบในบวบเหลี่ยม ฟักเขียว และแตงกวา มีความเหมือนกันกับเชื้อ ToLCNDV มากที่สุด คือ 98.2-97.9% ส่วนตัวอย่างฟักทองพบว่า มีความเหมือนกันกับเชื้อ SLCCNV ที่ระดับความเหมือนกัน 97.9% โดยนักวิจัยเสนอแนะว่าควรหาความสัมพันธ์เพิ่มเติมในระดับจีโนมเพื่อครอบคลุมยืนยันทั้งหมดของเชื้อเบโกโมไวรัสต่อไป (โสพิศ สว่างจิตร์, 2554)

เนื่องจากโอกาสในการเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อเบโกโมไวรัสอาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น การกลายพันธุ์ (mutation) แบบการแทนที่คู่เบส (base substitution) การแลกเปลี่ยนของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เกิดในบริเวณที่มี homology กันบางส่วน (recombination) และการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัส (reassortment) (Padidam et al., 1999) ส่งผลให้เชื้อเบโกโมไวรัสสามารถแพร่กระจายในพืชอาศัยได้หลากหลายชนิด และยังทำให้อาการของพืชรุนแรงขึ้น (Idris et al., 2008) ในปัจจุบันฐานข้อมูลเฉพาะเชื้อ SLCCNV ที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงในประเทศไทยที่มีการรายงานการพบเชื้อเพียง 2 isolate ได้แก่ SLCCNV [Thailand] segment A (accession no. AB330078.1) (Ito et al., 2008b) และ SLCCNV segment A [Wax gourd: Nakhon Pathom] (accession no. EU543562.1) (Sawangjit, 2009) ซึ่งข้อมูลอาจไม่เพียงพอที่จะศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์และความหลากหลายของเชื้อไวรัสชนิดนี้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและโครงสร้างจีโนมของ SLCCNV ที่เข้าทำลายฟักทองในจังหวัดกาญจนบุรี เพื่อเป็นข้อมูลสนับสนุนด้านพันธุกรรมของเชื้อเบโกโมไวรัสในประเทศไทยเพื่อประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ฟักทองที่ต้านทานโรคและการตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสชนิดนี้ต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียไวรัสจากพืชทอง

เก็บตัวอย่างใบพืชทองที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียไวรัสจากพื้นที่ปลูกในจังหวัดกาญจนบุรี ในปี พ.ศ. 2559 นำไปตรวจสอบการเข้าทำลายของไวรัสพืชด้วยเทคนิค indirect plate-trapped antigen enzyme-linked immunosorbent assay (indirect PTA-ELISA) ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody, PAb) จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ anti-ZYMV PAb ที่จำเพาะต่อ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), anti-CGMMV PAb ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), anti-PRSV PAb ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV), anti-WSMoV PAb ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV), anti-ToLCNDV PAb ที่จำเพาะต่อเชื้อ ToLCNDV (สรราชย์ จันทะจร และรัชณี ธงประยูร, 2556) และ anti-MYSV PAb ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Melon yellow spot virus* (MYSV) (สุภาวดี ปานสอาด และคณะ 2552) จากนั้นนำตัวอย่างใบพืชทองที่แสดงอาการโรคแต่ไม่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีทั้ง 6 ชนิด มาบดด้วยไนโตรเจนเหลวและสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอพืช FavorPrep™ Plant Genomic DNA Extraction Mini KIT (Favorgen, Taiwan) และนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SLCCNV และ ToLCNDV ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ Forward primer: 5' CCTTAGGATCCATGTCGAAGCGACCAGC 3' และ Reverse primer: 5' CCACCAAGCTTTACGATGCGTGAGTACAGG 3' ในปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย genomic DNA จากใบพืชทอง ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, Forward primer (10 µM) 1 ไมโครลิตร, Reverse primer (10 µM) 1 ไมโครลิตร, 2x Dream Taq green PCR master mix (Biotech rabbit, Germany) 10 ไมโครลิตร และ deionized water ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ตามลำดับ โปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR คือ initial denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที; denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที; annealing อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที; extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ทำขั้นตอนที่ 2-4 ซ้ำอีก 29 รอบ และ final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ 16 องศาเซลเซียส ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ 1% agarose gel electrophoresis ใน 0.5x Tris-borate buffer (0.5xTBE) และ Red Safe™ dye (INTRON Biotechnology, Korea)

การโคลนจีโนมของเชื้อแบคทีเรียไวรัส

นำ genomic DNA ของตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวกจากปฏิกิริยา PCR มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของไวรัสด้วยเทคนิค rolling circle amplification (RCA) โดยใช้ Illustra™ TempliPhi 100 Kit (GE healthcare, UK) นำ templiPhi products มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI เพื่อให้ได้ DNA-A และทดลองส้อมตัดด้วยเอนไซม์ *Pae*I, *Kpn*II, *Sa*II และ *Hind*III เพื่อให้ได้ DNA-B (Fermentas, USA) ทำการแยก DNA-A และ DNA-B ด้วย 1% agarose gel electrophoresis สกัดดีเอ็นเอออกจากเจลด้วย FavorPrep™ GEL/PCR Purification Mini kit (Favorgen, Taiwan) นำไปเชื่อมต่อกับ pQE80-L expression vector (Qiagen, USA) ด้วยเอนไซม์ T4-ligase (Invitrogen, USA) และถ่ายฝากให้กับเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* สายพันธุ์ DH5α ด้วยวิธีการ heat shock transformation (Sambrook and Russel, 1989) นำเซลล์ไปเลี้ยงบนอาหาร 2xYT แข็ง ที่มีสารปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร คัดเลือกโคโลนีสีขาวเพื่อนำมาตรวจหา DNA-A และ DNA-B ด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ pQE-forward primer และ pQE-reverse primer เลือกโคโลนีที่ให้ผลบวกเพื่อส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์กับบริษัท Apical Scientific (Selangor, Malaysia)

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์โครงสร้างจีโนมของ DNA-A และ DNA-B

วิเคราะห์เปรียบเทียบ DNA-A และ DNA-B ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) และโปรแกรม Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) วิเคราะห์โครงสร้างของจีโนมและตรวจสอบความถูกต้องของทิศทางหรือตำแหน่งและหน้าที่ของยีนที่อยู่บน DNA-A และ DNA-B ของเชื้อแบคทีเรียไวรัสโดยใช้โปรแกรม ORFs finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

สร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree analysis) เพื่อวิเคราะห์ความแตกต่างและหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียไวรัสโดยใช้โปรแกรม MEGA version 7.0.26 (Kumar et al., 2016) ด้วยวิธี neighbor-joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987) โดยใช้ model การเกิด base substitution แบบ transition และ transversion ที่ค่า bootstrap 1000

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างเชื้อเบโกโมไวรัสจากฟักทอง

เก็บตัวอย่างฟักทองที่ใบแสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อเบโกโมไวรัส จากพื้นที่ปลูกตำบลวังดัง อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี จำนวนทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยมี 18 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการของโรค และ 1 ตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการ เมื่อนำตัวอย่างใบฟักทองทั้ง 19 ตัวอย่าง มาตรวจสอบด้วยเทคนิค indirect PTA-ELISA โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อ ZYMV, CGMMV, PRSV, WSMoV และเชื้อ MYSV ที่มีรายงานการเข้าทำลายพืชวงศ์แตง พบว่ามีตัวอย่างฟักทอง จำนวน 5 ตัวอย่าง ติดเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบ ได้แก่ เชื้อ WSMoV จำนวน 1 ตัวอย่าง เชื้อ MYSV จำนวน 2 ตัวอย่าง และเชื้อ PRSV จำนวน 2 ตัวอย่าง และตรวจไม่พบเชื้อไวรัส จำนวน 14 ตัวอย่าง (Table 1) แต่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อเบโกโมไวรัส ได้แก่ ใบด่างเหลือง ใบด่าง ใบหักเหลือง ขอบใบม้วนงอ และใบลดรูป (Figure 1) ภายหลังนำทั้ง 14 ตัวอย่าง ได้แก่ KN07, KN09, KN41, KN42 (Figure 1A), KN44 (Figure 1B), KN45, KN46, KN48, KN49, KN50, KN53 (Figure 1C), KN54, KN55 และ KN56 มาตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SLCCNV และเชื้อ ToLCNDV พบว่าทุกตัวอย่างให้ผลเป็นบวกต่อปฏิกิริยา PCR โดยพบแถบดีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 700 คู่เบส (Table 1)

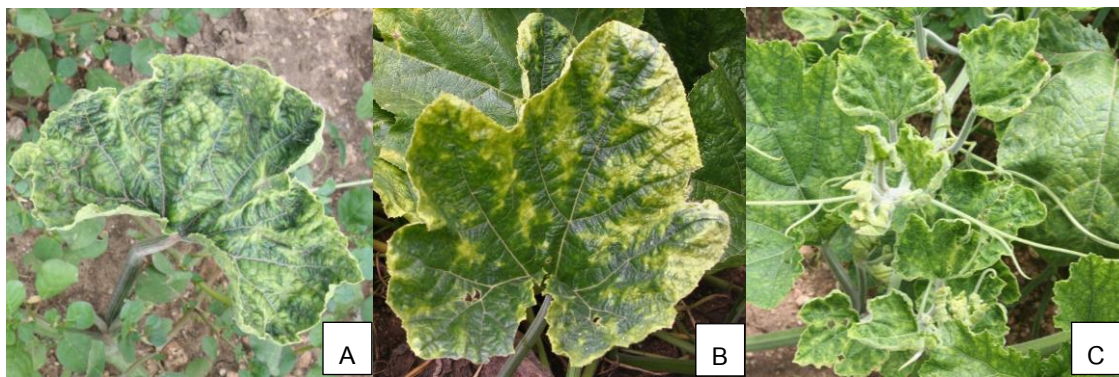


Figure 1 Begomovirus-infected pumpkin samples collected from Wang Dong sub-district, Muang district Kanchanaburi province showing yellow leaf curl symptom from sample KN42 (A), yellow mosaic from sample KN44 (B) and leaf distortion from sample KN53 (C). All of them gave negative reaction in indirect PTA-ELISA screening.

การโคลนจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัส

นำ templiPhi product ของตัวอย่างฟักทอง จำนวน 14 ตัวอย่าง ที่เพิ่มปริมาณได้ด้วยเทคนิค RCA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI และพบว่ามีเพียงตัวอย่างเดียวคือ KN44 ที่ templiPhi product ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 1 ตำแหน่งที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 124 ภายในยีน AV2 (pre coat-protein) และมีขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 2,736 คู่เบส หลังจากนั้นนำตัวอย่าง templiPhi products isolate KN44 ไปสุ่มตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Pae*I, *Kpn*II, *Sal*I และ *Hind*III พบว่ามีเพียงเอนไซม์ *Hind*III ชนิดเดียวที่ตัดดีเอ็นเอตัวอย่างได้ 1 ตำแหน่งที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ 799 และมีขนาดแถบดีเอ็นเอประมาณ 2,722 คู่เบส จึงเลือกตัวอย่าง KN44 ไปศึกษาข้อมูลจีโนมโดยการส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในขั้นตอนต่อไป

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และวิเคราะห์โครงสร้างจีโนมของ DNA-A และ DNA-B

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่าง KN44 มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่าตัวอย่าง KN44 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bam*HI มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมกับเชื้อ SLCCNV isolate [Thailand] DNA-A ที่ระดับ 97.95% (Figure 2-left) (accession no. AB330078.1) โดยเคยมีรายงานการตรวจพบเชื้อเบโกโมไวรัสสายพันธุ์นี้ในฟักทองเมื่อปี พ.ศ. 2544 ที่อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ที่เพิ่มปริมาณ DNA-A ด้วย degenerate primers พบว่า DNA-A มีความยาว 2,736 คู่เบส แต่ยังไม่พบการรายงานส่วนของ DNA-B ในงานวิจัยดังกล่าว (Ito et al., 2008b) ส่วน KN44 ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III มีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมกับเชื้อ SLCCNV isolate Hainan DNA-B ที่ระดับความเหมือน 91.05% (Figure 2-right) (accession no. MF062252.1) โดยใช้หลักเกณฑ์การจัดจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่มเบโกโมไวรัส (Brown et al., 2015) ที่กำหนดให้ต้องมีลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งจีโนม

ที่เปรียบเทียบกันแบบ pairwise alignment มากกว่า 91% จึงจะเป็นเชื้อชนิดเดียวกัน และมากกว่า 94% จึงจะเป็นสายพันธุ์เดียวกัน รายงานผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ในฐานข้อมูลของ GenBank โดย DNA-A ได้รับ accession no. MK978176 และ DNA-B ได้รับ accession no. MK978177 ตามลำดับ

การวิเคราะห์โครงสร้างจีโนมพบว่า (Figure 2) DNA-A isolate KN44 ประกอบไปด้วย 5 ORFs โดยพบว่า 2 ตำแหน่งบน virion-sense strand (Table 2) ได้แก่ AV1, AV2 และ 3 ตำแหน่งบน complementary-sense strand ได้แก่ AC1, AC2, AC3 เช่นเดียวกับที่รายงานโดย Ito et al. (2008b) และ DNA-B isolate KN44 ประกอบด้วย 2 ORFs (Table 3) ได้แก่ BC1 (movement protein) และ BV1 (nuclear shuttle protein) นอกจากนั้นยังพบส่วนอนุรักษ์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ TAATATTAC หรือ nonanucleotides เหมือนกันทั้ง DNA-A และ DNA-B ที่พบในตัวอย่าง KN44 ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอหรือเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรียไวรัส (Laufs et al., 1995)

Table 1 Preliminary detection of pumpkin by indirect PTA-ELISA with six antibodies specific to cucurbit-infecting viruses and PCR technique with coat protein specific primers to ToLCNDV and SLCCNV.

Sample	Symptoms	Indirect PTA-ELISA						PCR
		Anti-ZYMV	Anti-CGMMV	Anti-PRSV	Anti-WSMoV	Anti-ToLCNDV	Anti-MYSV	
KN07	YLC	-	-	-	-	-	-	+
KN08	YM	-	-	-	+	-	-	-
KN09	YM	-	-	-	-	-	-	+
KN41	YM	-	-	-	-	-	-	+
KN42	YLC	-	-	-	-	-	-	+
KN43	M	-	-	-	-	-	+	-
KN44	YM	-	-	-	-	-	-	+
KN45	M	-	-	-	-	-	-	+
KN46	YM	-	-	-	-	-	-	+
KN47	NS	-	-	+	-	-	-	-
KN48	YM	-	-	-	-	-	-	+
KN49	LD	-	-	-	-	-	-	+
KN50	YM	-	-	-	-	-	-	+
KN51	LD	-	-	+	-	-	-	-
KN52	YM	-	-	-	-	-	+	-
KN53	LD	-	-	-	-	-	-	+
KN54	LD	-	-	-	-	-	-	+
KN55	LD	-	-	-	-	-	-	+
KN56	YM	-	-	-	-	-	-	+

YLC = yellow leaf curl, YM = yellow mosaic, M = mosaic, LD = leaf distortion, NS = no symptom.

(+) = positive result, (-) negative result.

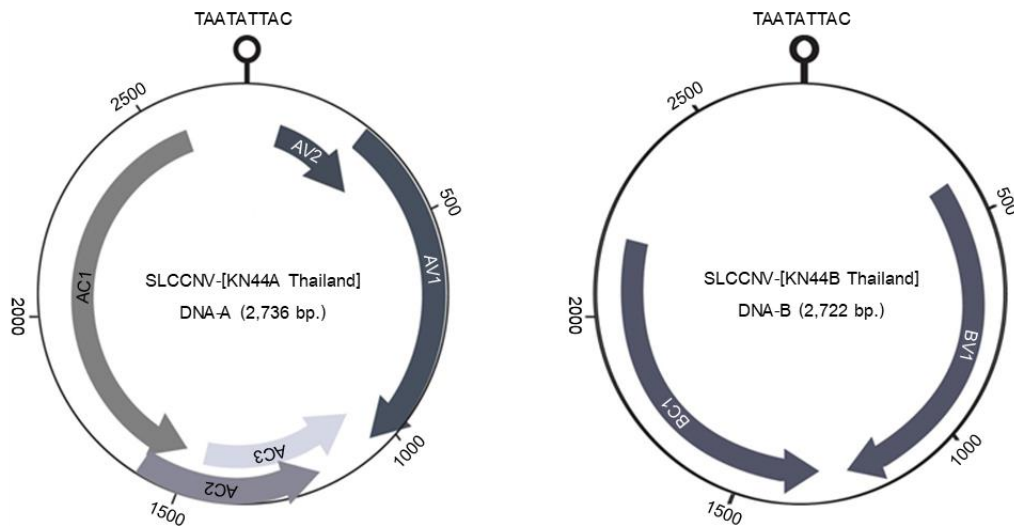


Figure 2 Genome structure of *Squash leaf curl China virus* isolate KN44 Thailand composes of DNA-A (left) and DNA-B (right). Both of them showed conserved sequences of stem and loop structures of nonanucleotides (TAATATTAC) in the intergenic regions. Two ORFs (AV1 and AV2) in the virion-sense strand and three ORFs (AC1, AC2 and AC3) in the complementary-sense strand of DNA-A. One ORF (BV1) in the virion-sense strand and one ORF (BC1) in the complementary-sense strand of DNA-B were located.

Table 2 Characterization of the open reading frames (ORFs) of *Squash leaf curl China virus* isolate KN44A Thailand DNA-A genome.

ORF	Frame	Protein name	Nucleotide position	Number of amino acids	Protein molecular weight (kilodalton)
AV1	+3	Coat protein	279-1049	256	29.58
AV2	+2	Pre coat protein	41-457	138	16.06
AC1	-1	Replication-associated protein	1498-2583	361	40.74
AC2	-2	Transcriptional activator protein	1191-1595	134	15.26
AC3	-3	Replication enhancer protein	1046-1456	136	15.95

Table 3 Characterization of the open reading frames (ORFs) of *Squash leaf curl China virus* isolate KN44B Thailand DNA-B genome.

ORF	Frame	Protein name	Nucleotide position	Number of amino acids	Protein molecular weight (kilodalton)
BV1	+1	Nuclear shuttle protein	478-1284	268	30.89
BC1	-1	Movement protein	1338-2189	283	31.74

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

จากการสร้างแผนภูมิวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี neighbor-joining ที่ค่า bootstrap 1000 ครั้ง เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บน DNA-A ของเชื้อ SLCCNV isolate KN44 พบว่า สามารถแบ่งเชื้อไวรัสตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการได้เป็น 5 กลุ่ม (Figure 3) กลุ่มที่ 1 ได้แก่ เชื้อ SLCCNV ที่มีรายงานในแถบเอเชีย กลุ่มที่ 2 ได้แก่ เชื้อ ToLCNDV ที่มีรายงานในแถบเอเชีย โดยในกลุ่มที่ 1 จะมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันกับกลุ่มที่ 2 มากที่สุด กลุ่มที่ 3 ได้แก่ เชื้อ *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) ที่มีรายงานในแถบเอเชีย กลุ่มที่ 4 ได้แก่ เชื้อ *Squash leaf curl virus* (SLCuV) ที่มีรายงานในแถบตะวันออกกลาง และกลุ่ม 5 ได้แก่ *Mastrevirus* เป็นเชื้อไวรัสในวงศ์ *Geminiviridae* และนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์มาใช้เป็น out group โดยที่ SLCCNV isolate KN44 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันกับเชื้อ SLCCNV [Thailand] (Ito et al., 2008b) ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 มากที่สุด อย่างไรก็ตามจำนวน accessions ของเชื้อเบโกโมไวรัสในกลุ่มที่ 1 ซึ่งพบในแถบเอเชียและในประเทศไทยที่นำมาวิเคราะห์มีจำนวนน้อย จึงทำให้ระดับค่าความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่มในคู่ของ MK978176 และ AB330078.1 มีความน่าเชื่อถือในการจัดกลุ่มอยู่ที่ 62% ถึงแม้ว่าค่าความเหมือนทางพันธุกรรมจะอยู่ที่ 97.95% เชื้อทั้งสองชนิดนี้มีพืชทองเป็นพืชอาศัย และพบในภาคกลางของประเทศไทย แต่เชื้อ SLCCNV isolate KN44 พบในจังหวัดกาญจนบุรี ปี 2559 ซึ่งต่างกับกับเชื้อ SLCCNV [Thailand] ที่พบในจังหวัดนครปฐม ปี 2544 (Ito et al., 2008b) จากข้อมูลแผนภูมิวิวัฒนาการในกลุ่มที่ 1 ของเชื้อ SLCCNV isolate KN44 ยังมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับเชื้อในกลุ่มที่ 1 ที่มีค่าความน่าเชื่อถือมากกว่า 80% ขึ้นไป ได้แก่ เชื้อ SLCCNV [Vietnam] ในพืชทอง (accession no. KC857509.1), SLCCNV [Thailand] ในพืชแพง (accession no. EU543562.1) (Sawangjit, 2009), SLCCNV [China] ในเมลอน (accession no. KF184992.1) (Lin and Che, 2013), SLCCNV [Malaysia] ในแตงกวา (accession no. EF197940.1), *Squash leaf curl Philippines virus* (SLCuPV) [Taiwan] ในพืชทอง (accession no. DQ866135.1) (Tsai et al., 2011) และเชื้อ SLCuPV [Philippines] ในพืชทอง (accession no. NC_005845) (Kon et al., 2003) อีกทั้งเชื้อเบโกโมไวรัสในกลุ่มที่ 1 ยังมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันกับเชื้อในกลุ่มที่ 2 ที่ค่าความน่าเชื่อถือ 100% อย่างไรก็ตามฐานข้อมูล DNA-A ของเชื้อ SLCCNV ที่พบเข้าทำลายในพืชวงศ์แตงในประเทศไทยยังมีจำนวนไม่มากพอ จึงต้องนำข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ SLCCNV ของประเทศในแถบเอเชียมาวิเคราะห์และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการร่วมด้วย

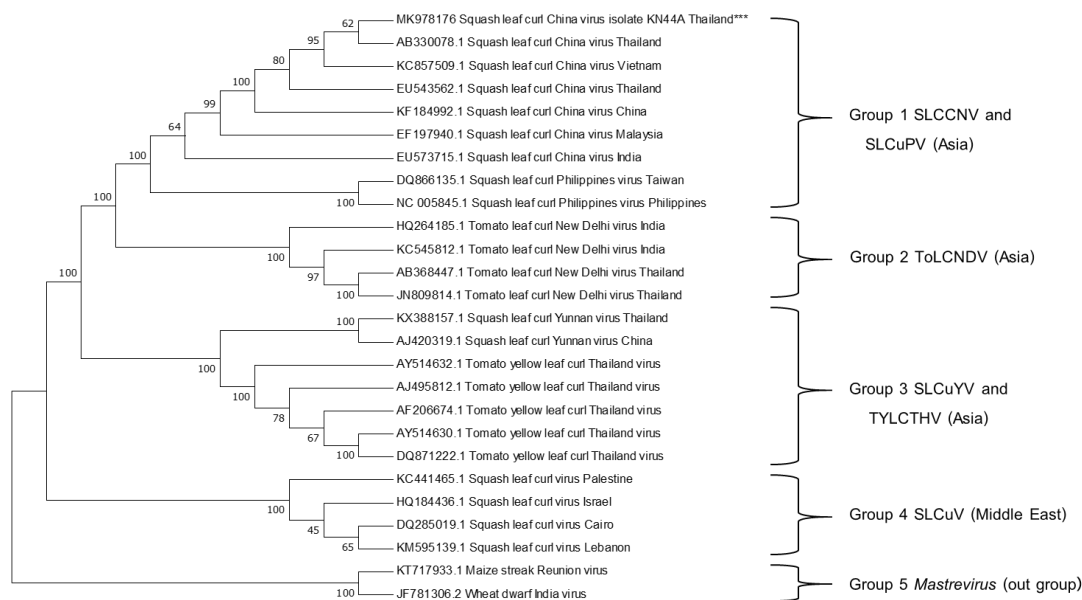


Figure 3 The phylogenetic tree shows the genetic relationship of *Squash leaf curl virus* isolate KN44A Thailand DNA-A segment accession no. MK978176 indicated by 3 stars symbol (***) compared with DNA-A of begomovirus from GenBank and separated in 5 groups consisted of SLCCNV and SLCuPV Asia (group 1), ToLCNDV Asia (group 2), SLCuYV and TYLCTHV Asia (group 3), SLCuV Middle East (group 4) and *Mastrevirus* (group 5) by MEGA7 program with neighbor joining method. Numbers above the line showed values of 1000 times bootstrapping.

สรุปผลการศึกษา

การศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมและโครงสร้างจีโนมของเชื้อแบกโมไวรัส SLCCNV ที่เข้าทำลายพืชทองในตำบลวังดั่ง อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี พบจีโนมของตัวอย่างพืชทอง isolate KN44 เป็นแบบ bipartite ประกอบด้วย DNA-A ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ 2,736 คู่เบส โครงสร้างจีโนมประกอบด้วย 5 open reading frame (ORFs) ได้แก่ AV1, AV2, AC1, AC2 และ AC3 ในส่วน DNA-B มีขนาด 2,722 คู่เบส ประกอบด้วย 2 ORFs คือ BV1 และ BC1 นอกจากนั้นยังพบว่า DNA-A isolate KN44 มีความสัมพันธ์และใกล้ชิดกับเชื้อ *Squash leaf curl China virus* isolate Thailand มากที่สุด ที่ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 97.95% และมีพืชอาศัยเป็นพืชทองเช่นเดียวกัน ส่วน DNA-B isolate KN44 พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อ *Squash leaf curl China virus* isolate Hainan ที่ค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ 91.05% ซึ่งมีพืชทองเป็นพืชอาศัย ดังนั้นจึงตั้งชื่อ isolate ของ DNA-A ว่า *Squash leaf curl China virus* isolate KN44A [Thailand] และ DNA-B ว่า *Squash leaf curl China virus* isolate KN44B [Thailand] และพบว่า DNA-A ของ isolate KN44 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับเชื้อในกลุ่ม SLCCNV และ SLCuPV มากที่สุด รองลงมาได้แก่ เชื้อในกลุ่ม ToLCNDV ซึ่งในปัจจุบันการพบเชื้อแบกโมไวรัสในประเทศไทยที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตงมีเพียง 3 ชนิด คือเชื้อ *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV), *Squash leaf curl Yunnan virus* (SLCuYV) และ *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และได้รับการสนับสนุนการวิจัยภายใต้แผนงานเสริมสร้างศักยภาพและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ตามทิศทางการวิจัยและนวัตกรรม ประเภทยุทธศาสตร์ จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2562

เอกสารอ้างอิง

- รุ่งทิพย์ จันเพ็ชร, วิชัย โสมสิตรัตน, Scott Adkins และสุจินต์ ภัทรภูวดล. 2559. การพัฒนาเทคนิค Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) เพื่อการตรวจสอบเชื้อ *Squash leaf curl virus* ของพืชวงศ์แตงในประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 48(2): 221-230.
- สรชัย จันทะจร และวัชรนิ์ ธงประยูร. 2560. ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของดีเอ็นเอ-เอ และดีเอ็นเอ-บี ของเชื้อ *Tomato leaf curl New Delhi virus*–[Thailand:Kanchanaburi:Cucumber:2012] (ToLCNDV–[TH:KR:Cu:12]) สาเหตุอาการใบหงิกของแตงกวาในจังหวัดกาญจนบุรี. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 48(2): 231-244.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2561. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. <http://www.oae.go.th/view/1/ปัจจัยการผลิต/TH-TH> (20 พฤษภาคม 2562).
- สุภาวดี ปานสอาด, วัชรนิ์ ธงประยูร, อรประไพ คชนันท์, นุชนาถ วารินทร์, อัญญา บุญชิต และชาญณรงค์ ศรีภิบาล. 2552. การตรวจสอบทางอิมมูโนวิทยาโดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มกรดนิวคลีอิกแบบลูกผสมของทอสมไวรัส. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร* 40(2): 157-166.
- โสพิศ สว่างจิตร์. 2554. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อเจมินีไวรัสที่เข้าทำลายพืชตระกูลแตงในพื้นที่ภาคกลางประเทศไทย. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.
- Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C., and Varsani, A. 2015. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* 160(6): 1593-1619.
- Idris, A. M., Mills-Lujan, K., Martin, K., and Brown, J. K. 2007. *Melon chlorotic leaf curl virus*: Characterization and differential reassortment with closest relatives reveal adaptive virulence in the *Squash leaf curl virus* clade and host shifting by the host-restricted *Bean calico mosaic virus*. *Virology* 82(4): 1959-1967.
- Ito, T., Sharma, P., Kittipakorn, K., and Ikegami, M. 2008a. Complete nucleotide sequence of a new isolate of *Tomato leaf curl New Delhi virus* infecting cucumber, bottle gourd and muskmelon in Thailand. *Archives of Virology* 153(3): 611.
- Ito, T., Ogawa, T., Samretwanich, K., Sharma, P., and Ikegami, M. 2008b. Yellow leaf curl disease of pumpkin in Thailand is associated with *Squash leaf curl China virus*. *Plant Pathology* 57(4): 597-787.
- Kon, T., Dolores, L. M., Bajet, N. B., Hase, S., Takahashi, H., and Ikegami, M. 2003. Molecular characterization of a strain of *Squash leaf curl China virus* from the Philippines. *Journal of Phytopathology* 151(10): 535-539.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870-1874.
- Laufs, J., Traut, W., Heyraud, F., Matzeit, V., Rogers, S. G., Schell, J., and Gronenborn, B. 1995. *In vitro* cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of *Tomato yellow leaf curl virus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(9): 3879-3883.

- Lin, S., and Che, H. 2013. PCR detection of whitefly transmitted geminivirus of *Cucumis melo* var. *Saccharinus* in Ledong, Hainan Province. *Journal of Tropical Biology* 4(2): 124-128.
- Marwal, A., Kumar, A., and Gaur, R. K. 2014. Transmission and host interaction of geminivirus in weeds. *Plant virus-Host interaction* 1(7): 43-161.
- Melgarejo, A. T., Kon, T., Rojas, M. R., Paz-Carrasco, L., Murilo Zerbini, F., and Gilbertson, R. L. 2013. Characterization of a new world monopartite begomovirus causing leaf curl disease of tomato in Ecuador and Peru reveals a new direction in geminivirus evolution. *Virology* 87(10): 5397-5413.
- Nawaz-ul-Rehman, M. S., and Fauquet, C. M. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters* 583(12): 1825-1832.
- Padidam, M., Sawyer, S., and Fauquet, C. M. 1999. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265(2): 218-225.
- Robinson, R. W., and Decker-Walters, D. S. 1997. *Cucurbits*. Illustrated. New York: CAB International.
- Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* 4(4): 406-425.
- Sambrook, J., and Russel, D. W. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawangjit, S. 2009. The complete nucleotide sequence of *Squash leaf curl China virus* [Wax gourd] and its phylogenetic relationship to other geminiviruses. *Science Asia* 35(2): 131-136.
- Tsai, W. S., Hu, C. J., Shung, D. P., Lee, L. M., Wang, J. T., and Kenyon, L. 2011. First Report of *Squash leaf curl Philippines virus* Infecting Chayote (*Sechium edule*) in Taiwan. *Plant Disease* 95(9): 1197.
- Vincent, N. 2013. Geminivirus protein structure and function. *Molecular Plant Pathology* 14(6): 635-649.

วันรับบทความ (Received date) : 9 ก.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 19 พ.ย. 62

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 24 ม.ค. 63