บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกไวรัสจากตัวอย่างพืช

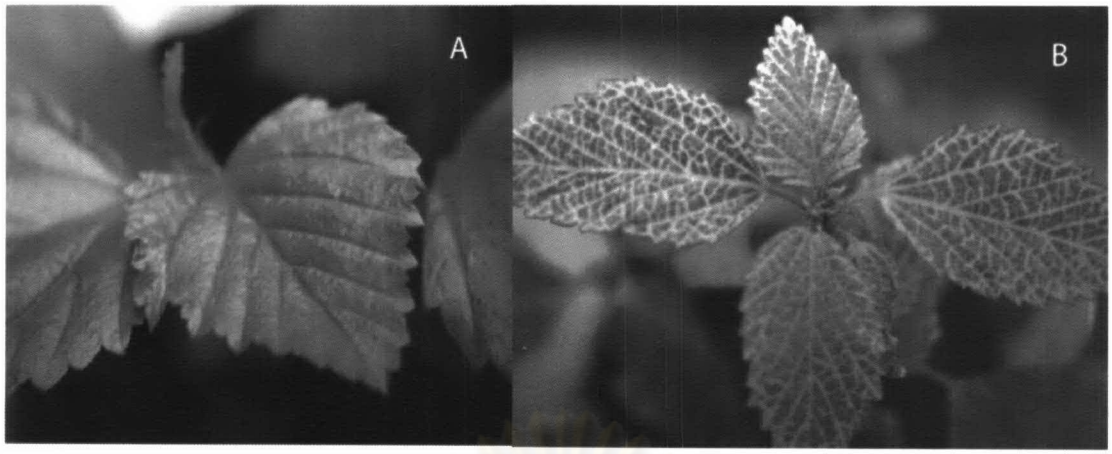
หลังทำการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจาก *Malvastrum coromandelianum* ที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง โดยใช้แมลงหวี่ขาวจำนวน 1 ตัวต่อต้นสู่พืชปกติ จำนวน 5 ต้น เป็นเวลา 9 วัน พบว่าพืชทดลองบางต้นเริ่มแสดงอาการเส้นใบเหลือง และใบอ่อนบริเวณยอดแสดงอาการม้วนขึ้น จนในวันที่ 14 ของการทดลองพบว่ามีพืชทดลองแสดงอาการดังกล่าวจำนวน 3 ต้น ส่วนต้นที่เหลืออีก 2 ต้นไม่แสดงอาการ (รูปที่ 2) เมื่อนำพืชที่ทำการทดลองทั้งหมดมาทดสอบโดย Southern Blot Hybridization โดยใช้ DNA-A และ DNA-B ของ *Dicliptera yellow mottle virus* (DYMoV) (Lotrakul, Valverde and Landry, 2000) เป็น probe พบว่าพืชที่แสดงอาการให้ผลเป็นบวก ส่วนพืชที่ไม่แสดงอาการให้ผลเป็นลบ (รูปที่ 3) จึงเลือก *M. coromandelianum* ที่ติดโรคไวรัสที่ได้อย่างสุ่มจำนวน 1 ต้นมาใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

2. การศึกษาสมบัติทางชีวภาพ

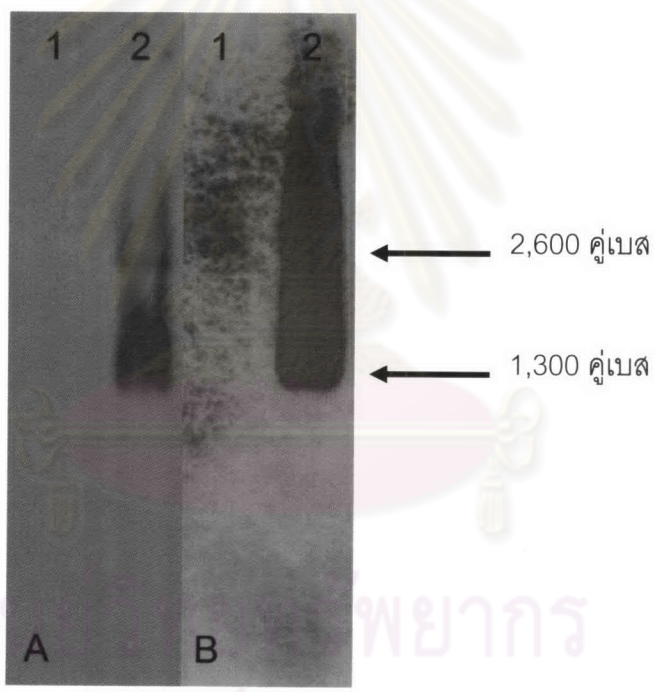
2.1 การศึกษาการถ่ายทอดไวรัสโดยวิธีต่าง ๆ

2.1.1 การถ่ายทอดไวรัสโดยการเสียบยอด (grafting transmission)

หลังจากทำการเสียบยอดได้เป็นเวลา 7 วันพบว่าพืชทดลองบางต้นเริ่มแสดงอาการเส้นใบเหลือง เมื่อครบ 14 วันพบว่ามีพืชทดลองที่แสดงอาการเส้นใบเหลืองจำนวนทั้งสิ้น 7 ต้นจาก 10 ต้น และที่บริเวณยอดพบว่าใบอ่อนแสดงอาการใบม้วนขึ้น เมื่อทำการสุ่มพืชทดลองที่แสดงอาการเส้นใบเหลืองจำนวน 2 ต้น และที่ไม่แสดงอาการจำนวน 1 ต้นมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วย Southern Blot Hybridization พบว่าให้ผลเป็นบวกทุกต้น



รูปที่ 2 *Malvastrum coromandelianum* ต้นที่ไม่เป็นโรค (A) เปรียบเทียบกับต้นที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง (B)



รูปที่ 3 Southern Blot Hybridization ของ DNA ของ *Malvastrum coromandelianum* เมื่อใช้ DNA-A (A) และ DNA-B (B) ของ *Dicliptera yellow mottle virus* เป็น probe โดย
lane 1 คือ DNA จาก *M. coromandelianum* ต้นที่ไม่แสดงอาการของโรค
lane 2 คือ DNA จาก *M. coromandelianum* ต้นที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง
begomovirus-like DNA ที่สามารถจับ probe ได้ มีขนาดประมาณ 2,600 คู่เบส และ 1,300 คู่เบสตามลำดับ เมื่อเทียบกับ DNA marker

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 **การถ่ายทอดไวรัสด้วยแมลงหวี่ขาว** (whitefly transmission)

เมื่อนำ *M. coromandelianum* ที่ได้จากข้อ 1 มาทำการถ่ายทอดไวรัสด้วยแมลงหวี่ขาวจำนวน 20 และ 40 ตัวต่อต้น พบว่าในวันที่ 8 ภายหลัง inoculation feeding เริ่มมีพืชบางต้นแสดงอาการเส้นใบเหลือง เมื่อครบกำหนด 4 สัปดาห์ มีพืชที่แสดงอาการดังกล่าวจำนวน 6 ต้น และ 9 ต้นสำหรับแต่ละชุดการทดลองตามลำดับ ทำการสุ่มพืชทดลองจำนวน 3 ต้นของแต่ละการทดลองทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการเส้นใบเหลืองมาตรวจสอบเพื่อยืนยันการติดเชื้อไวรัสด้วย Southern Blot Hybridization ผลปรากฏว่าพืชที่แสดงอาการเส้นใบเหลืองให้ผลเป็นบวก และพืชที่ไม่แสดงอาการให้ผลเป็นลบ

2.1.3 **การถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีกล** (mechanical inoculation)

ผลการศึกษาการถ่ายเชื้อด้วยวิธีกลพบว่าพืชทดลองทุกต้นไม่แสดงอาการของโรค และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วย Southern Blot Hybridization ผลไม่พบไวรัสในพืชทุกต้นเช่นกัน

2.1.4 **การถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ด** (seed transmission)

เมื่อทำการเพาะเมล็ด *M. coromandelianum* ที่เก็บจากต้นที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง ได้ต้นกล้าจำนวน 200 ต้น ไม่พบว่ามีต้นกล้าใดที่แสดงอาการดังกล่าว และเมื่อสุ่มต้นกล้าจำนวน 6 ต้นมาตรวจสอบด้วย Southern Blot Hybridization ผลยืนยันว่าไม่มีไวรัสในต้น *M. coromandelianum* เหล่านี้

2.2 **การศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายทอดไวรัสของแมลงหวี่ขาว**

2.2.1 **จำนวนแมลงหวี่ขาวต่อการถ่ายทอดไวรัส**

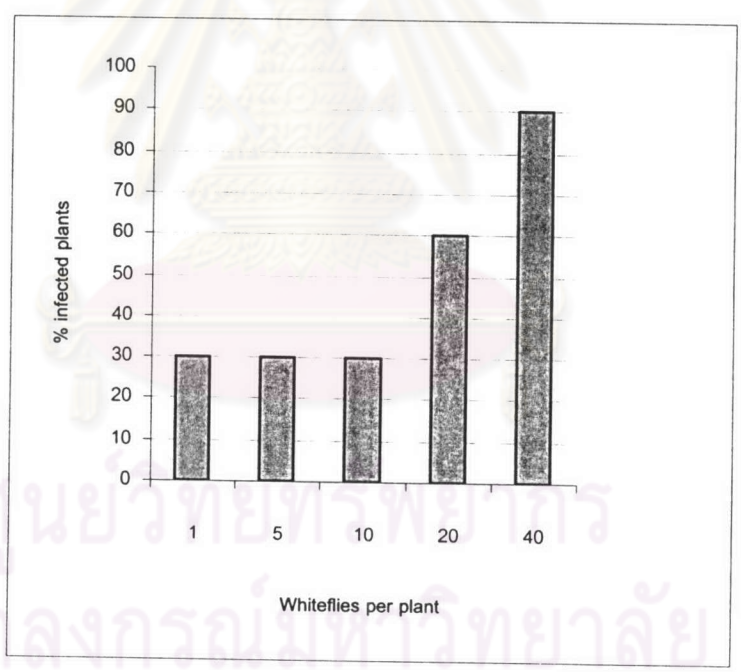
เมื่อทำการถ่ายทอดไวรัสโดยใช้แมลงหวี่ขาวจำนวนต่างๆ กันในขั้นตอน inoculation feeding พบว่าไวรัสเส้นใบเหลืองใน *M. coromandelianum* สามารถถูกถ่ายทอดได้ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของพืชทดลอง เมื่อใช้แมลงหวี่ขาวเพียง 1 ตัวต่อต้น และเพิ่มเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แมลงหวี่ขาว 40 ตัวต่อต้น (รูปที่ 4)

2.2.2 **ระยะเวลาที่น้อยที่สุด หลังจากแมลงหวี่ขาวได้รับเชื้อไวรัสแล้วสามารถถ่ายทอดได้** (minimum inoculation feeding period)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเพียง 1 ชั่วโมง แมลงหวี่ขาวสามารถถ่ายเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* ได้สูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ของพืชทดลอง และสูงขึ้นเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เวลาไปเพียง 6 ชั่วโมง (ตารางที่ 4)

2.2.3 **ระยะเวลาที่ไวรัสสามารถอยู่ในตัวแมลงหวี่ขาวและคงสภาพการถ่ายทอดไวรัสได้** (retention period)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสที่อยู่ภายในร่างของแมลงหวี่ขาวสามารถถ่ายทอดได้นานถึง 12 วันหรือมากกว่า เมื่อได้รับเชื้อไวรัสเพียงครั้งเดียว โดยยังสามารถถ่ายทอดได้ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 5)



รูปที่ 4 จำนวนแมลงหวี่ขาวต่อการถ่ายทอดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลือง จาก *Malvastrum coromandelianum* ที่เป็นโรคสู่ *M. coromandelianum* ที่ไม่เป็นโรค โดยใช้ acquisition feeding period 24 ชั่วโมง และ inoculation feeding period 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 ระยะเวลาที่น้อยที่สุด หลังจากแมลงหวี่ขาวได้รับเชื้อไวรัสแล้วสามารถถ่ายทอดไวรัสเส้นใบเหลืองจาก *Malvastrum coromandelianum* ที่เป็นโรคสู่ *M. coromandelianum* ที่ไม่เป็นโรค โดยใช้แมลงหวี่ขาวจำนวน 40 ตัวต่อต้นในขั้นตอน inoculation feeding

Inoculaition feeding period	**พืชที่แสดงอาการ/พืชทั้งหมด**
30 นาที	0/10
1 ชั่วโมง	3/10
3 ชั่วโมง	8/10
6 ชั่วโมง	10/10
12 ชั่วโมง	10/10

หมายเหตุ : Acquisition feeding period = 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ระยะเวลาที่ไวรัสสามารถอยู่ในตัวแมลงหวี่ขาวและคงสภาพการถ่ายทอดไวรัสเส้นใบเหลืองจาก *Malvastrum coromandelianum* ที่เป็นโรคสู่ *M. coromandelianum* ที่ไม่เป็นโรค โดยใช้ acquisition และ inoculation feeding period 24 ชั่วโมง และใช้แมลงหวี่ขาวจำนวน 40 ตัวต่อต้นในขั้นตอน inoculation feeding

Retention period*	**พืชที่แสดงอาการ/พืชทั้งหมด**
1 วัน	10/10
3 วัน	8/10
6 วัน	5/10
12 วัน	3/10

* หมายเหตุ : จำนวนวันหลังการทำ acquisition feeding

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การศึกษาชนิดพืชอาศัยของไวรัส

เมื่อทำการถ่ายทอดไวรัสด้วยแมลงหวี่ขาวสู่พืชทดลองจำนวน 21 ชนิดผลปรากฏว่าไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนได้ในพืชทดลองเพียง 3 ชนิด ทั้ง 2 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 6 และ 7) โดยพบอาการใบม้วนขึ้นในมะเขือเทศ (รูปที่ 5) และ *Nicotiana benthamiana* ที่ติดเชื้อ (รูปที่ 6) ซึ่งสามารถสังเกตเห็นอาการได้ในวันที่ 8 ภายหลังการถ่ายทอดไวรัส ในขณะที่ยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ White Burley ที่ติดเชื้อไวรัสไม่แสดงอาการผิดปกติ แต่เมื่อทำการตรวจสอบโดย Southern Blot Hybridization (รูปที่ 7 - 9) ผลที่ได้ยืนยันว่าไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* สามารถเพิ่มจำนวนได้ในยาสูบ

2.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ใน *M. coromandelianum* ที่ติดเชื้อไวรัสโดยใช้ transmission electron microscope (TEM)

พบว่าโครงสร้างบางส่วนภายใน chloroplast มีการเปลี่ยนแปลงผิดปกติไป คือ thylakoid membrane ไม่เรียงกันเป็นชั้น grana นอกจากนี้ยังพบโครงสร้างคล้าย vesicle เล็กๆ อยู่ภายใน (รูปที่ 10) chloroplast ที่แสดงอาการดังกล่าวสามารถพบได้ในหลายเซลล์ของชั้น mesophyll ของใบ *M. coromandelianum* ที่แสดงอาการเส้นใบเหลือง โดย chloroplast เป็น organelle ที่แสดงความผิดปกติชัดเจนที่สุดเมื่อเทียบกับ organelle อื่นๆ สำหรับอนุภาคของไวรัสหรือ inclusion body ไม่สามารถตรวจพบได้ในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ผลการถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยแมลงหวี่ขาวสู่พืชชนิดอื่นจำนวน 21 ชนิด โดยใช้แมลงหวี่ขาวจำนวน 20 ตัวต่อต้นในขั้นตอน inoculation feeding โดยใช้ acquisition feeding period 24 ชั่วโมง และ inoculation feeding period 24 ชั่วโมง

พืช	พืชที่แสดงอาการ/พืชทั้งหมด	วันที่เริ่มแสดงอาการ	อาการที่พบ*	Southern Blot Hybridization**
กระเจี๊ยบเขียว	3/10	11	M C	-
โสมชบา	0/10	-	N	-
ฝ้าย พันธุ์ DPSL	6/10	10	U L	-
ฝ้าย พันธุ์ Pima	7/10	11	U C L	-
ชบา	0/10	-	N	-
M. capitata	0/10	-	N	-
พริกขี้หนูห้วยสีทน	7/10	11	L	-
ลำโพง	4/10	10	U	-
มะเขือเทศสีดา	8/10	8	U	+
N. benthamiana	2/10	8	U	+
ยาสูบใบเล็ก	0/10	-	N	-
N. rustica	6/10	10	U S	-
ยาสูบใบใหญ่ cv. White Burley	0/10	-	N	+
มะเขือม่วง	0/10	-	N	-
มะเขือเปราะเจ้าพระยา	10/10	13	M S	-
แตงโมลาย	0/10	-	N	-
แตงไทย	0/10	-	N	-
แตงกวาลูกใหญ่	3/10	12	S	-
ฟักทอง	4/10	10	U T	-
บวบเหลี่ยม	0/10	-	N	-
บวบหอม	3/10	10	C	-

หมายเหตุ

* ลักษณะอาการผิดปกติที่พบในพืชทดลอง U=upward leaf curl M= mottle C= vein clearing L= leaf crinkle T= vein thickening S= stunting และ N= normal

** ผลการตรวจสอบด้วย Southern Blot Hybridization ที่ใช้ DNA-A ของ *Dicliptera yellow mottle virus* เป็น probe โดย + = ผลเป็นบวก และ - = ผลเป็นลบ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 ผลการถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยแมลงหวี่ขาวสู่พืชชนิดอื่น จำนวน 21 ชนิดโดยใช้แมลงหวี่ขาวจำนวน 40 ตัวต่อต้นในขั้นตอน inoculation feeding ใช้ acquisition feeding period 24 ชั่วโมง และ inoculation feeding period 24 ชั่วโมง

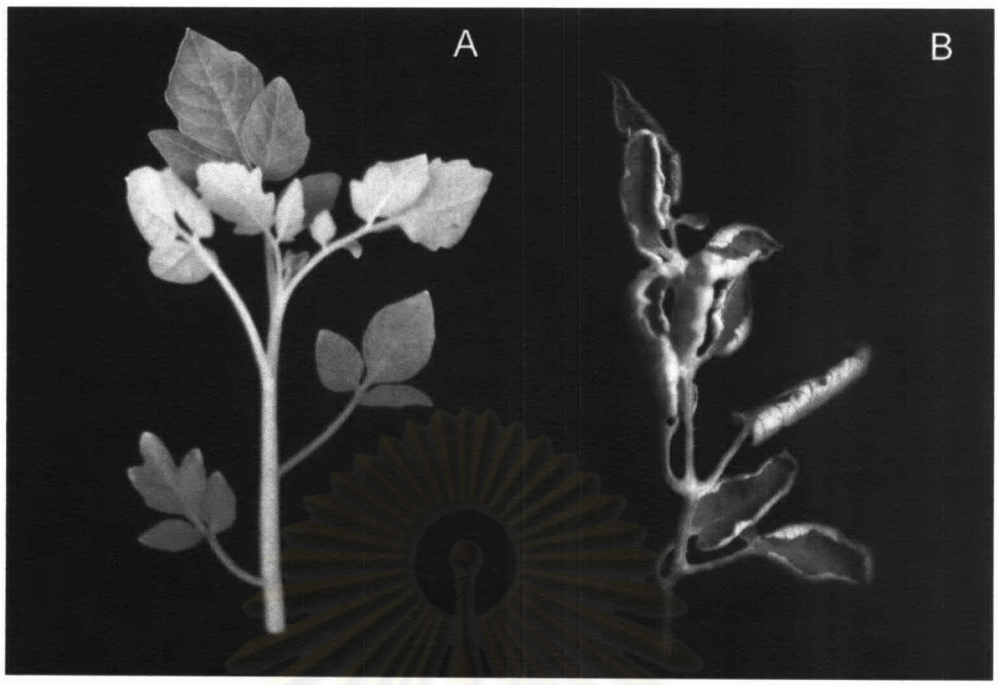
พืช	พืชที่แสดงอาการ/พืชทั้งหมด	วันที่เริ่มแสดงอาการ	อาการที่พบ*	Southern Blot Hybridization**
กระเจี๊ยบเขียว	3/10	11	M C	-
โสมชบา	0/10	-	N	-
ฝ้าย DPSL	8/10	10	U L	-
ฝ้าย Pima	9/10	11	U C L	-
ชบา	0/10	-	N	-
M. capitata	0/10	-	N	-
พริกขี้หนูห้วยสีทน	8/10	11	L	-
ลำโพง	6/10	11	U	-
มะเขือเทศสีดา	10/10	8	U	+
N. benthamiana	3/10	8	U	+
ยาสูบใบเล็ก	0/10	-	N	-
N. rustica	6/10	10	U S	-
ยาสูบใบใหญ่ cv. White Burley	0/10	-	N	+
มะเขือม่วง	0/10	-	N	-
มะเขือเปราะเจ้าพระยา	10/10	13	M S	-
แตงโมลาย	0/10	-	N	-
แตงไทย	0/10	-	N	-
แตงกวาลูกใหญ่	5/10	12	S	-
ฟักทอง	3/10	10	M T	-
บวบเหลี่ยม	0/10	-	N	-
บวบหอม	5/10	9	C	-

หมายเหตุ

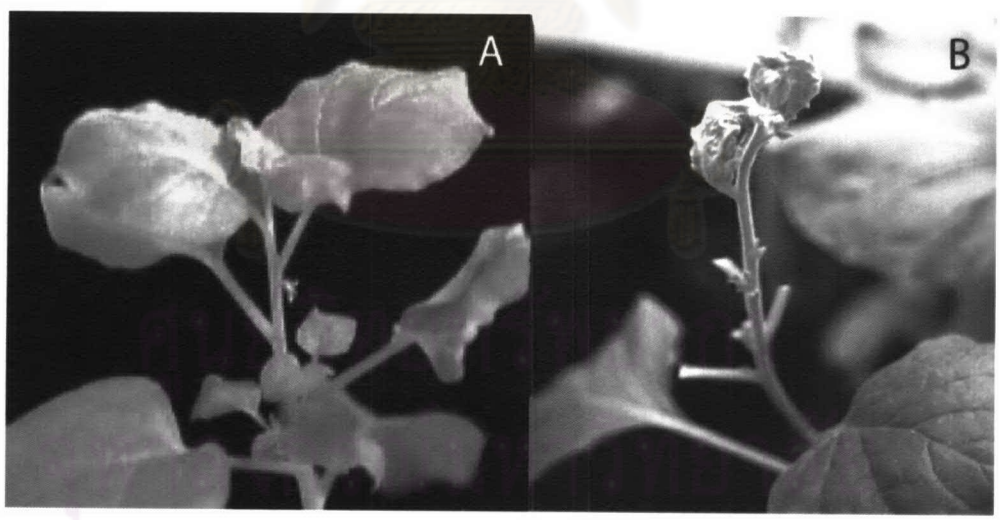
* ลักษณะอาการผิดปกติที่พบในพืชทดลอง U=upward leaf curl M= mottle C= vein clearing L= leaf crinkle T= vein thickening S= stunting และ N= normal

** ผลการตรวจสอบด้วย Southern Blot Hybridization ที่ใช้ DNA-A ของ *Dicliptera yellow mottle virus* เป็น probe โดย + = ผลเป็นบวก และ - = ผลเป็นลบ

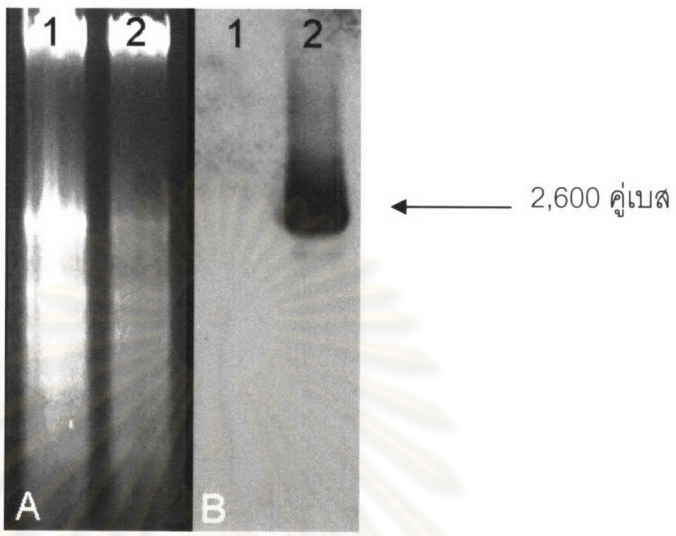
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 ใบของมะเขือเทศที่ไม่เป็นโรค (A) กับใบของมะเขือเทศที่ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* ที่แสดงอาการใบม้วนขึ้น (B)



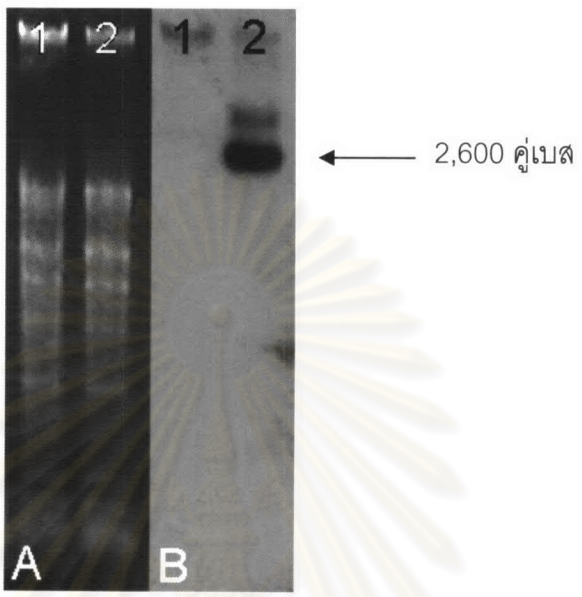
รูปที่ 6 ใบของ *Nicotiana benthamaina* ที่ไม่เป็นโรค (A) กับใบของ *N. benthamaina* ที่ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* ที่แสดงอาการใบม้วนขึ้น (B)



รูปที่ 7 Southern Blot Hybridization ของ DNA ของมะเขือเทศที่ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* ที่แสดงอาการใบม้วนขึ้น (A) Agarose gel electrophoresis และ (B) Southern Blot Hybridization ที่ใช้ DNA-A ของ DYMoV เป็น probe
lane 1 คือ DNA ของมะเขือเทศที่ไม่แสดงอาการ
lane 2 คือ DNA ของมะเขือเทศที่แสดงอาการใบม้วนขึ้น
begomovirus-like DNA ที่สามารถจับ probe ได้ มีขนาดประมาณ 2,600 คู่เบส เมื่อเทียบกับ DNA marker

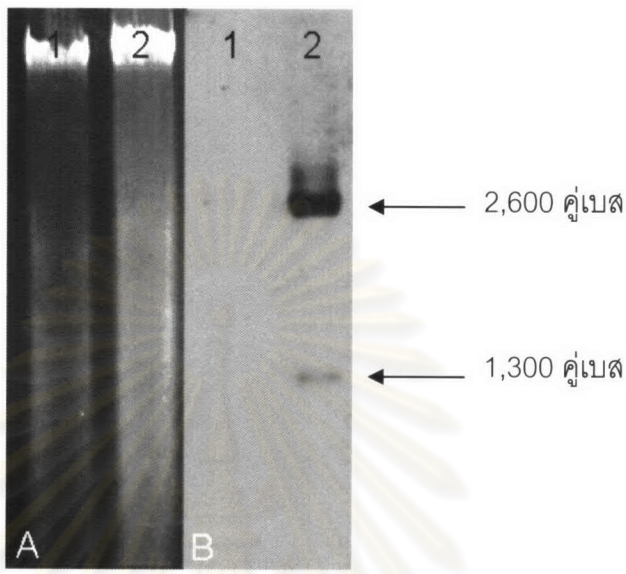
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I21940101



รูปที่ 8 Southern Blot Hybridization ของ DNA ของ *N. benthamaina* ที่ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* ที่แสดงอาการใบม้วนขึ้น (A) Agarose gel electrophoresis และ (B) Southern Blot Hybridization ที่ใช้ DNA-A ของ DYMoV เป็น probe
lane 1 คือ DNA ของ *N. benthamaina* ที่ไม่แสดงอาการ
lane 2 คือ DNA ของ *N. benthamaina* ที่แสดงอาการใบม้วนขึ้น
begomovirus-like DNA ที่สามารถจับ probe ได้ มีขนาดประมาณ 2,600 คู่เบส เมื่อเทียบกับ DNA marker

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



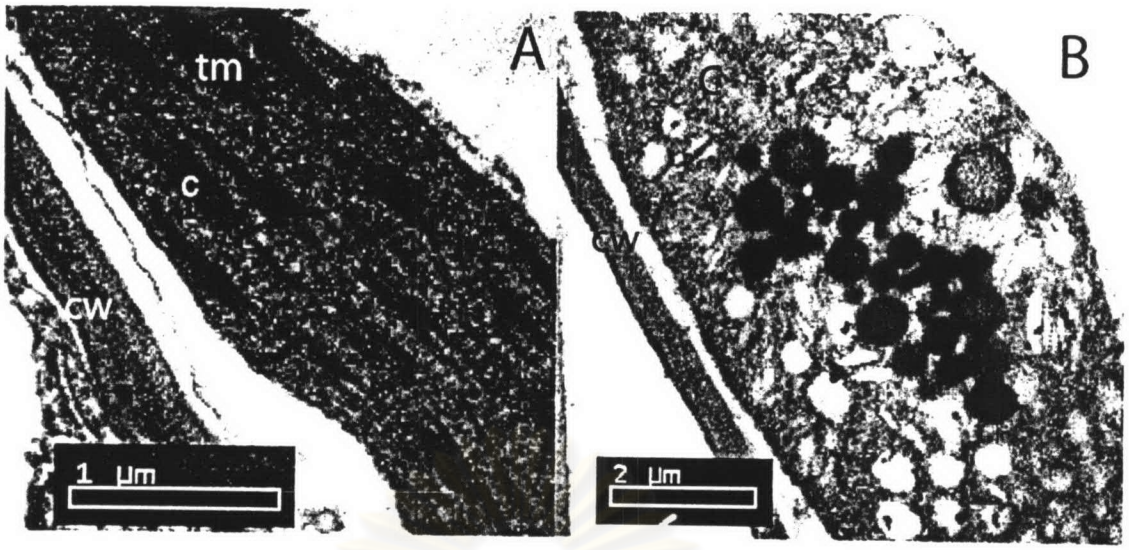
รูปที่ 9 Southern Blot Hybridization ของ DNA ของยาสูบใบใหญ่ พันธุ์ White Burley ที่ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* แต่ไม่แสดงอาการของโรค (A) Agarose gel electrophoresis และ (B) Southern Blot Hybridization ที่ใช้ DNA-A ของ DYMoV เป็น probe

lane 1 คือ DNA ของยาสูบที่ไม่ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum*

lane 2 คือ DNA ของยาสูบที่ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum*

begomovirus-like DNA ที่สามารถจับ probe ได้ มีขนาดประมาณ 2,600 คู่เบส และ 1,300 คู่เบส เมื่อเทียบกับ DNA marker

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 10 Chloroplast ของ *Malvastrum coromandelianum* ต้นที่ไม่เป็นโรค (A) และ chloroplast ของ *M. coromandelianum* ต้นที่ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลือง (B) c = chloroplast cw = cell wall tm = thylakoid membrane

3. การตรวจสอบไวรัสด้วย molecular techniques

3.1 การตรวจสอบบีโกโมไวรัสด้วยเทคนิค PCR

เมื่อทำการสกัด DNA จาก *M. coromandelianum* ที่ติดเชื้อไวรัสเส้นใบเหลือง มาทำการเพิ่มจำนวน viral DNA ด้วยเทคนิค PCR พบว่า universal primers ของบีโกโมไวรัสที่ออกแบบโดย Briddon และ Markham (1994) ไม่สามารถทำการเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ที่ต้องการได้ จึงต้องเปลี่ยนมาใช้ universal primers ของบีโกโมไวรัส ที่ออกแบบโดย Rojas และคณะ (1993) แทนซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนชิ้น DNA ขนาด 1,307 คู่เบสที่ต้องการได้

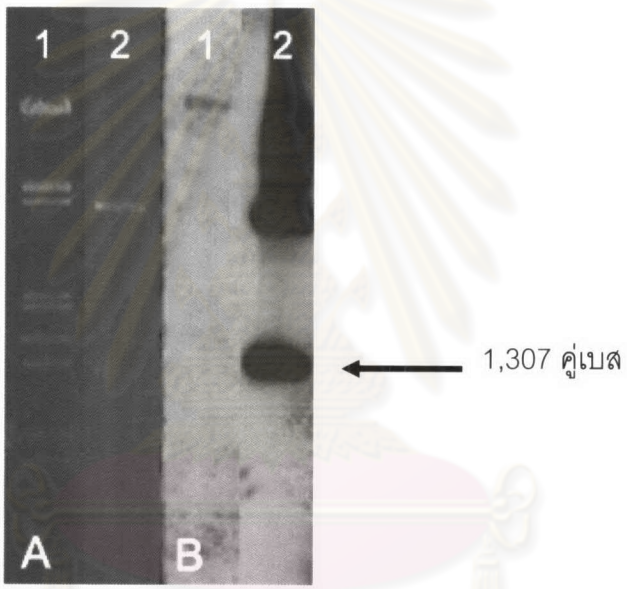
เมื่อนำชิ้น DNA ที่ได้มาทำการตรวจสอบด้วยวิธี Southern Blot Hybridization โดยใช้ DNA A ของ DYMoV เป็น probe พบว่าให้ผลเป็นบวก

4. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัส

4.1 การโคลน และการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR – amplified viral DNA

เมื่อนำ DNA ที่เพิ่มจำนวนได้จากข้อ 3.1 มาทำการโคลน และ transform เข้าสู่ *E. coli* DH5α ปรากฏว่าสามารถ clone ได้ทั้งหมด 23 clone จึงเลือกอย่างสุ่มเพื่อทำการศึกษา

ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1 clone (รูปที่ 11) โดยทำการอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์จากปลายทั้งสองด้าน ผลพบว่าส่วนของ DNA ที่เพิ่มจำนวนได้ครอบคลุมบริเวณ common region ทั้งหมด และบางส่วนของยีน AC1 และ AV1 ของ DNA-A (รูปที่ 12) โดย common region มีขนาด 336 นิวคลีโอไทด์ประกอบด้วยโครงสร้างต่างๆ ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการ replication และกระบวนการ transcription โดยมี stem-loop structure ที่มี conserved nonanucleotide (TAATATTAC) ใน loop มี TATA box ที่ตำแหน่ง นิวคลีโอไทด์ที่ 66-71 ของบริเวณ common region และมี iterative sequence 2 ชุดได้แก่ ATTTTCG (นิวคลีโอไทด์ที่ 51-57 และ 88-94) และ GTGATCA (นิวคลีโอไทด์ที่ 58-64 และ 72-78)



รูปที่ 11 ผลการโคลน DNA ของไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* ที่ได้จาก PCR เมื่อใช้ universal primer (Rojas *et al.*, 1993) (A) Agarose gel electrophoresis และ (B) Southern Blot Hybridization ที่ใช้ DNA-A ของ DYMoV เป็น probe โดย
lane ที่ 1 คือ DNA marker (λDNA ที่ตัดด้วย *Eco*RI และ *Hin*dIII)
lane ที่ 2 คือ Recombinant plasmid pDrive ที่มีชิ้นส่วนของ DNA ของไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Eco*RI

```
gcatctgcag gcccacattg tctttcccgt acgactgtct ccctcaatta ctatactaat   60

cggtcttagg ggccgcgcag cggcatcgac aacgttttcc gacacccact cttcaagttc  120

ttctggaact tgatcgaaag aagaggaaga aaaaggagag acataaacct ccaaaggagg  180

tgtaaaaatc ctatctaaat tagcatttaa attatgaaat tgtaatacat aatccttagg  240

ggctagttcc ctaagtactc taagagcctc tggcttagtg cctgtgttaa gtgctgctgc  300

gtaagcgtcg ttggctgttt gttgtccccc ccttgcagat cgtccgtcga tctgaaactc  360

tccccactcg agaatgtctc cgtccttgtc gatataggac ttggacgtcc gagctggatt  420

tagctccctg gaatgnttcg gatgggaaat gtaatgacct gggatgggtg gacgaggtcg  480

aagaatcttt gaattctggc cacttgtatt tcccctcgaa ttggatgagc acgtgtagat  540

gaggtttccc attctggtgg agctccctgc agattttaat gtatttttg ttggtggggt  600
         ←AC4

ggtttaggtt ttggaattgg gaaagtgcat cctctttagt aagagagcag tcgggataag  660

taaggaaata atttttgcaa taaatgttaa agcgtttaga gggagccata atgggacaat  720
                                          ←AC1   TATA box
gattcaccga ttgactcgct cttgcaactc tcttctggta ttttcggtga tcaatatata  780
                                    ** ********** **
gtgatcacca aatggcattt tcgtaaaatg tatgggaaat tcaaaatact cacgctccaa  840
*******          **** ***
aaagcggcca tccgtataat attaccggat ggccgcgaaa ttttttagt gggccctcga  900
          Stem-loop motif

ccaatcagat gacgcgctga aagcttaaat aaagttccct ccactataaa tacttaggtc  960

ctaagttttt ggtttgaaaa tgtgggatcc acttgtaaac gagttccccg agacggttca 1020
           AV2→
cgggtttcgg tgtatgcttt ccatcaaata tcttcagtta ctctctgaag gttattctcc 1080

tgatacggtt ggttacgatt taatacgtga attaatttca attgttcgtt ctaggaatta 1140
                                                        AV1→
tgtcgaagcg tcctgcagat atcgtaattt ctacccccgc gtcgaaggtg cgtcgtcgtc 1200

tgaacttcga cagcccttac tcaacccgtg taactgtccc cactgtccgc gccacaaaat 1260

ctcgaatgtg ggcgaacggg cctatgtata ggaagccctg cagtatt                1307
```

รูปที่ 12 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* ที่เพิ่มจำนวนได้จาก primer PAL1v1978 และ PAR1c496 (Rojas *et al.*,1993) บริเวณ common region มีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ระหว่าง start codon ของยีน AC1 และ start codon ของยีน AV1 ตำแหน่ง stem-loop motif ของไวรัสแสดงในกรอบสี่เหลี่ยม (☐) TATA box แสดงโดยตัวอักษรขีดเส้นใต้ (___) และ iterative sequence 2 ชุด ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ tattttcg และ gtgatca แสดงโดย asterisk (*) สัญญลักษณ์ลูกศรแทนตำแหน่ง start codon ของ ORF โดยกำหนดทิศทางด้วยหัวลูกศร

4.2 การออกแบบ overlapping primers เพื่อทำการเพิ่มจำนวนสารพันธุกรรมของไวรัสที่สมบูรณ์ทั้งชิ้นด้วยเทคนิค PCR

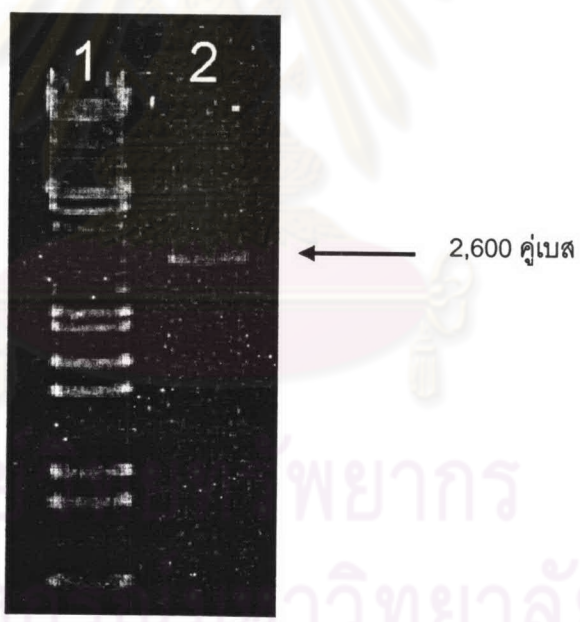
นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ในข้อ 4.1 มาทำการออกแบบ overlapping primers เพื่อใช้ในการเพิ่มจำนวน DNA-A ของไวรัสทั้งวง โดยใช้บริเวณ gtcgaagaatctttgaattctggccacttgtatt ที่มี restriction size ของ *Eco*RI (gaattc) มาทำการออกแบบ primer ดังนี้

Sida-a-AGTCGAATTCAAAGATTCTTCGAC สำหรับ complementary strand

Sida-s-AGTCGAATTCTGGCCACTTGTATT สำหรับ virion strand

โดย Sida-a มี melting temperature ประมาณ 53 องศาเซลเซียส และ Sida-s มี melting temperature ประมาณ 55 องศาเซลเซียส ทำการเพิ่มจำนวนได้ DNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 2,600 คู่เบส ดังรูปที่ 13

เมื่อทำการ clone ชิ้น DNA ที่ได้จากการเพิ่มจำนวน viral DNA โดยใช้ overlapping primers เข้าสู่ pDrive vector ผลปรากฏว่ายังไม่สามารถโคลนได้



รูปที่13 ผลการเพิ่มจำนวน DNA ของไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* โดยใช้ overlapping primers Sida-a และ -s

lane 1 คือ DNA marker (λDNA ตัดด้วย *Eco*RI และ *Hin*dIII)

lane 2 คือ DNA ของไวรัสเส้นใบเหลืองที่เพิ่มจำนวนได้ซึ่งมีขนาดประมาณ 2,600 คู่เบส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และ Phylogenetic analysis

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของบีโกโมไวรัสชนิดอื่นมาเปรียบเทียบกับไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* โดยเลือกเฉพาะบริเวณ common region พบว่าไวรัสที่ศึกษามีความคล้ายคลึงกับ *Cotton leaf curl Rajasthan virus* มากที่สุดโดยมี nucleotide sequence identity 79.63 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8) และมีความคล้ายคลึงกับ *Malvastrum yellow vein virus*-[Y47] ซึ่งเป็นบีโกโมไวรัสที่มีพืชเจ้าบ้านชนิดเดียวกันจากประเทศจีนโดยมี nucleotide sequence identity 71.91 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามในภาพรวมแล้วไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* มีความคล้ายคลึงกับไวรัสในกลุ่มไวรัสโลกเก่า มากกว่าไวรัสในกลุ่มไวรัสโลกใหม่ แม้แต่ *Sida golden mosaic Costa Rica virus* ที่พบใน *Sida* sp.ซึ่งเป็นพืชที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *M. coromandelianum* ที่พบในโลกใหม่ก็มีความแตกต่างกันมากโดยมี nucleotide sequence identity เพียง 49.42 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ common region ระหว่างไวรัสเส้นใบเหลืองจาก *Malvastrum coromandelianum* กับบีโกโมไวรัสชนิดอื่นๆ

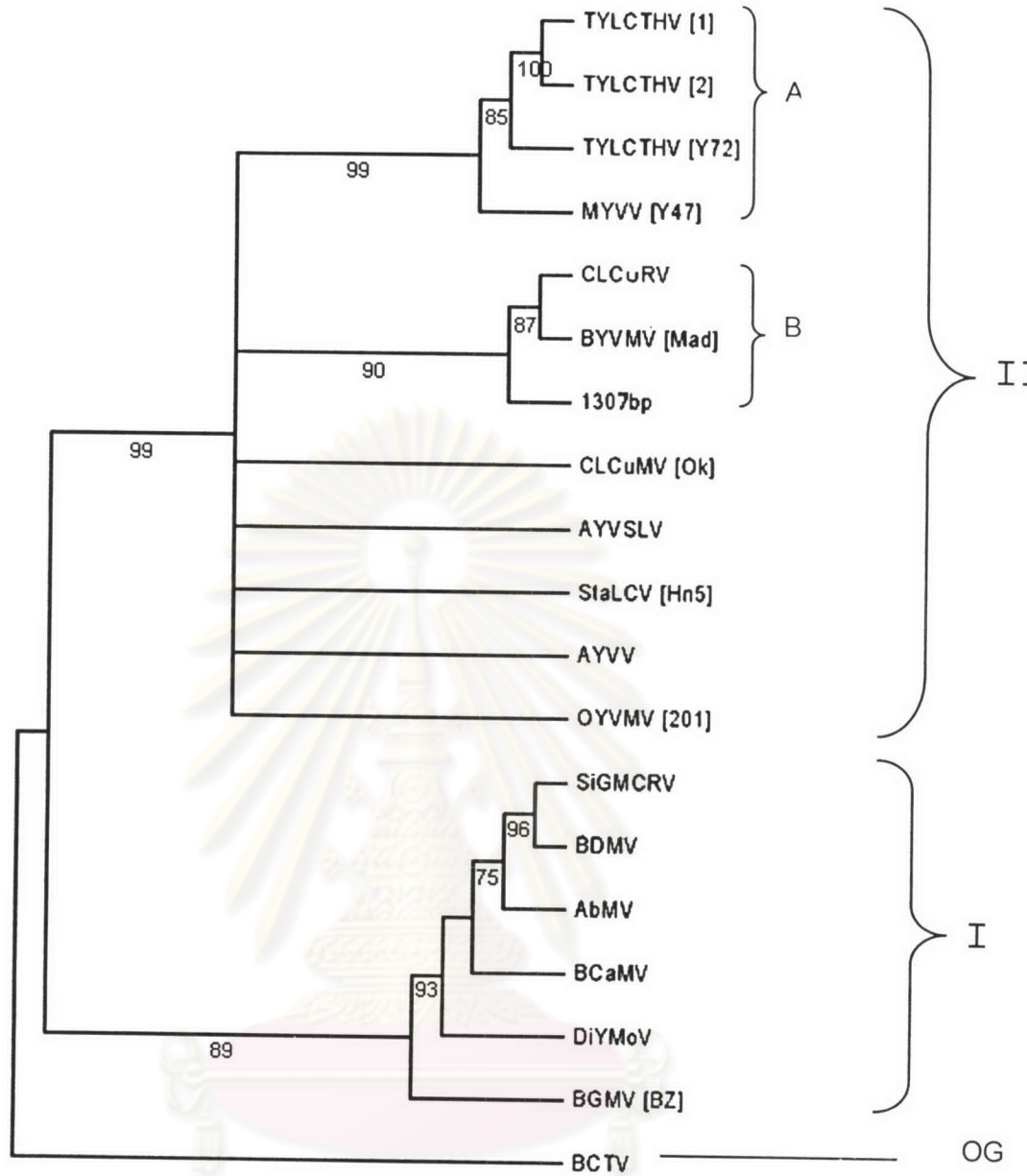
ชนิดของบีโกโมไวรัส	ชื่อย่อ	Genbank accession number	Percent Nucleotide Sequence Identity
Cotton leaf curl Rajasthan virus	CLCuRV	AF363011	79.63
Cotton leaf curl Multan virus-[Okra]	CLCuMV-[Ok]	AJ002459	72.80
Malvastrum yellow vein virus-[Y47]	MYVV-[Y47}	AJ457824	71.91
Okra yellow vein mosaic virus-[201]	OYVMV-[201]	AJ002451	69.17
Ageratum yellow vein Sri Lanka virus	AYVSLV	AF314144	68.52
Tomato yellow leaf curl virus-[1]	TYLCTHV-[1]	X63015	67.16
Tomato yellow leaf curl virus-[2]	TYLCTHV-[2]	AF141922	67.16
Tomato yellow leaf curl virus-[Y72]	TYLCTHV-[Y72]	AJ495812	67.03
Sida golden mosaic Costa Rica virus	SiGMRV	X99550	49.42

ผลจาก phylogenetic analysis ของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ common region ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ที่เป็น parsimony informative ทั้งสิ้น 246 ตำแหน่ง และใช้ *Beet curly top virus* (BCTV) เป็น outgroup ได้ cladogram 4 แผนภาพซึ่งทำ strict consensus tree ได้ดังรูปที่ 14 โดยมีจำนวนการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้น 1,085 ครั้ง มีค่า Consistency index (CI)

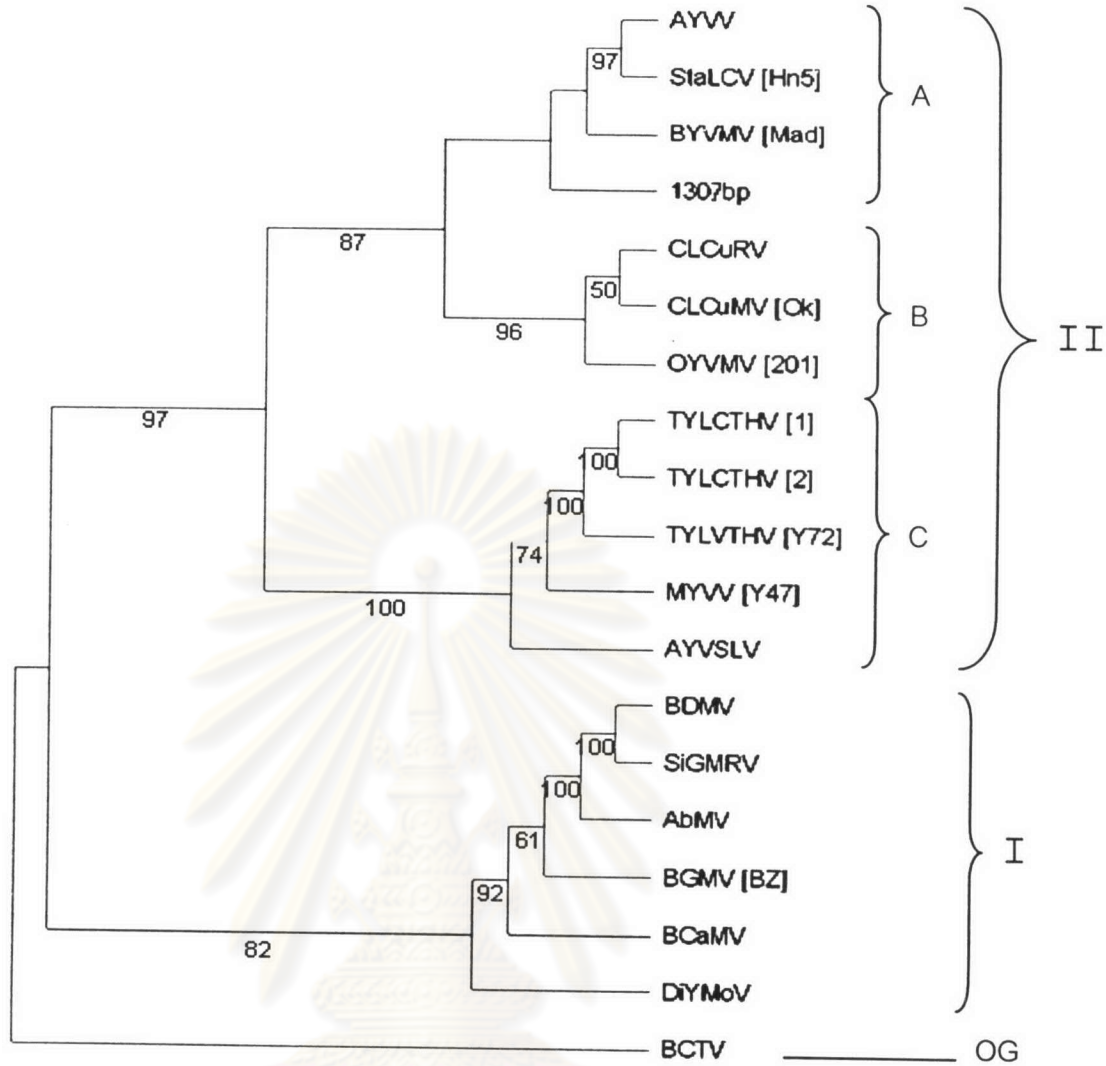
= 0.5419 (เมื่อไม่รวม uninformative characters) และค่า Retention index (RI) = 0.5828 จากรูปที่ 14 พบว่ามีกลุ่มไวรัส 2 clade คือ clade ของไวรัสโลกเก่า (clade II) และ clade ของไวรัสโลกใหม่ (clade I) โดยไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* ถูกจัดรวมอยู่กับไวรัสโลกเก่าโดยเฉพาะกับบีโกโมไวรัสที่มีพืชอาศัยอยู่ในวงศ์ Malvaceae (clade IIB) อนึ่งบีโกโมไวรัสที่มีพืชอาศัยชนิดเดียวกันกับพืชในการวิจัยนี้ แต่เป็นไวรัสที่มี genomic composition ต่างกันก็อยู่ต่าง clade คือ MYVV-[Y47] อยู่ใน clade IIA แต่ไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* อยู่ใน clade IIB นอกจากนี้ MYVV-[Y47] ยังมีความใกล้ชิดกับบีโกโมไวรัสที่มีพืชเจ้าบ้านเป็นพืชในวงศ์ Solanaceae

สำหรับ phylogenetic tree ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน AC1 ซึ่งมีจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เป็น parsimony informative รวม 556 ตำแหน่งมีเพียง 1 แผนภาพ ดังรูปที่ 15 โดยมีจำนวนการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้น 1,360 ครั้ง มีค่า Consistency index (CI) = 0.5357 (เมื่อไม่รวม uninformative characters) และค่า Retention index (RI) = 0.6256 จากรูปพบว่าแผนภาพแสดงความสัมพันธ์มีความคล้ายคลึงกับผลการวิเคราะห์บริเวณ common region กล่าวคือ ไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* มีความใกล้ชิดกับกลุ่มของไวรัสโลกเก่า โดยมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับกลุ่มไวรัส BYVMV-[Mad] (clade IIA) แต่มีค่า bootstrap support ต่ำมาก (~39%) และยังคงพบว่า MYVV-[Y47] อยู่แยก clade กับไวรัสที่ศึกษา โดยอยู่ใน clade ของไวรัสที่มีพืชเจ้าบ้านเป็นพืชในวงศ์ Solanaceae (clade IIC) เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ข้างต้น

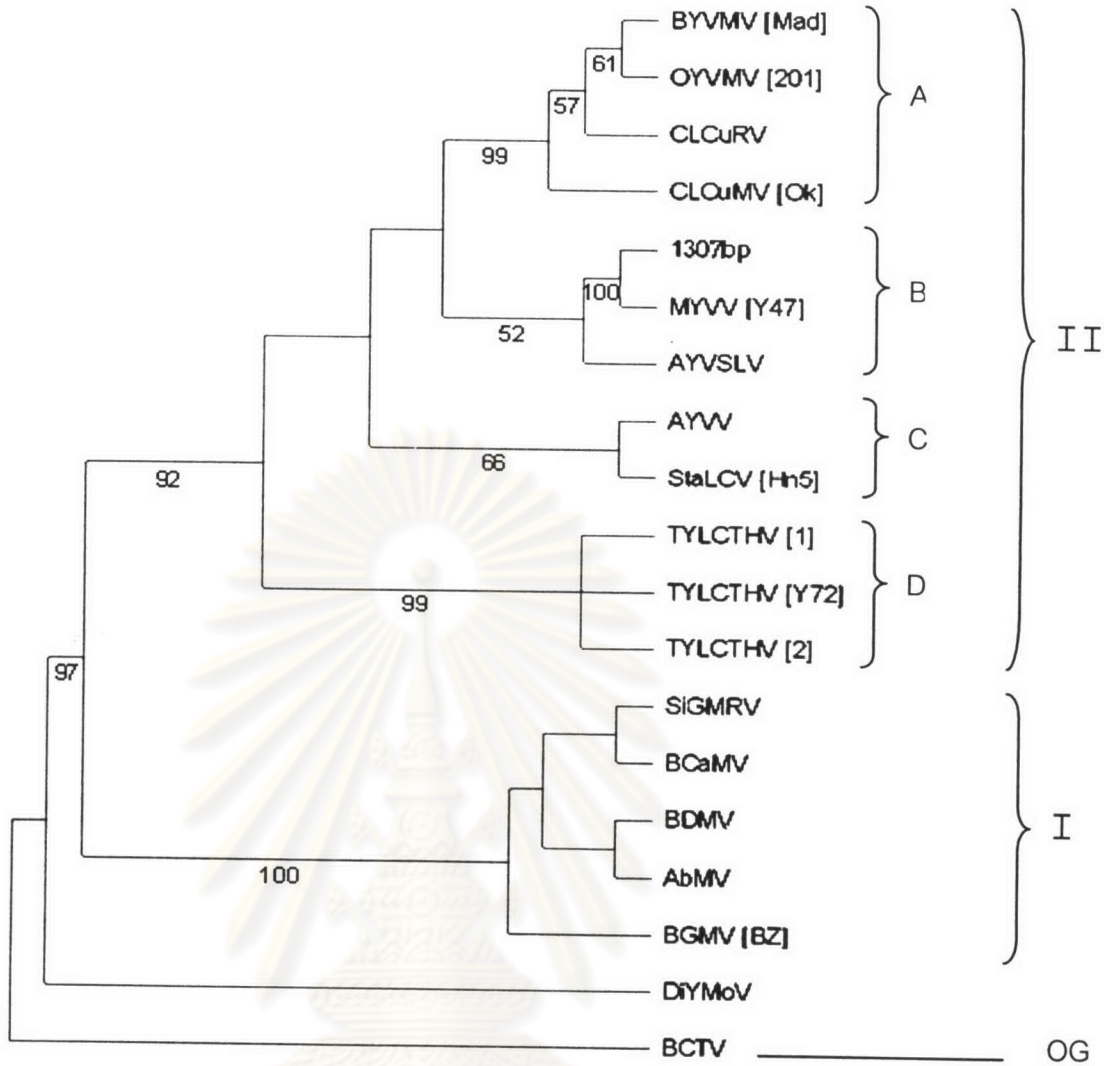
สำหรับผลจาก phylogenetic analysis ของลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน AV1 ซึ่งมีนิวคลีโอไทด์ที่เป็น parsimony informative ทั้งสิ้น 111 ตำแหน่ง ได้ cladogram 15 แผนภาพ ซึ่งมีจำนวนการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้น 416 ครั้ง ค่าConsistency index (CI) = 0.6338 (เมื่อไม่รวม uninformative characters) และค่า Retention index (RI) = 0.7314 แผนภาพในรูปที่ 16 เป็น 50% Majority rule consensus tree จากทั้ง 15 แผนภาพ ซึ่งพบว่ายังมีคล้ายคลึงกับแผนภาพ cladogram จากการวิเคราะห์บริเวณ common region และ AC1 กล่าวคือ ไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* (1,307 bp) ยังคงใกล้ชิดกับไวรัสโลกเก่า (clade II) แต่พบความแตกต่างค่อนข้างมาก คือมีความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ MYVV-[Y47] (clade IIB) ซึ่งเป็นไวรัสที่มีพืชอาศัยชนิดเดียวกัน และมี bootstrap support สูงมาก (100%)



รูปที่ 14 แผนภาพ strict consensus cladogram ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* และบีโกโมไวรัสชนิดอื่น ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ common region โดยมี *Beet curly top virus* (BCTV) เป็น outgroup ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* กำหนดชื่อเป็น 1,307 bp และชื่อย่อของบีโกโมไวรัสชนิดอื่นดังแสดงในตารางที่ 3 หมายเลขที่กิ่งหมายถึง bootstrap support ซึ่งแสดงไว้เฉพาะ clade ที่มีค่ามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และ OG คือ outgroup



รูปที่ 15 แผนภาพ cladogram เพียง 1 แผนภาพที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* และบีโกโมไวรัสชนิดอื่น ที่ได้จากการวิเคราะห์บริเวณยีน AC1 (บางส่วน) โดยมี *Beet curly top virus* (BCTV) เป็น outgroup ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* กำหนดชื่อเป็น 1,307 bp และชื่อย่อของบีโกโมไวรัสชนิดอื่นดังแสดงในตารางที่ 3 หมายเลขที่กิ่งหมายถึง bootstrap support ซึ่งแสดงไว้เฉพาะ clade ที่มีค่ามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และ OG คือ outgroup



รูปที่ 16 แผนภาพ 50% Majority rule cladogram แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสเส้นใบเหลืองของ *Malvastrum coromandelianum* และบีโกโมไวรัสชนิดอื่นที่ได้จากการวิเคราะห์บริเวณยีน AV1 (บางส่วน) โดยมี *Beet curly top virus* (BCTV) เป็น outgroup ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไวรัสเส้นใบเหลืองของ *M. coromandelianum* กำหนดชื่อเป็น 1,307 bp และชื่อย่อของบีโกโมไวรัสชนิดอื่นดังแสดงในตารางที่ 3 หมายเลขที่กิ่งหมายถึง bootstrap support ซึ่งแสดงไว้เฉพาะ clade ที่มีค่ามากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และ OG คือ outgroup