การจำแนกชนิดของไวรัสกลุ่ม Tospovirus สาเหตุโรคพืชที่สำคัญในประเทศไทย

Identification of Tospovirus in Thailand

เยาวภา ตันติวานิช

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืช ได้แก่ มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง ที่แสดงอาการคล้ายกับอาการของโรคที่เกิดจากทอสโพไวรัสเข้าทำลาย จากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในประเทศไทยได้แก่ จังหวัดตาก เชียงใหม่ และ อุบลราชธานี จำนวน 5 ตัวอย่าง นำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค Direct antigen coating ELISA (DAC-indirect ELISA) พบว่า ตรวจพบ Watermelon silver mottle virus (WSMoV) และ tomato necrosis virus จากตัวอย่าง มันฝรั่ง พริก และมะเขือเทศ จำนวน 5 ตัวอย่าง

รหัสโครงการ 03-04-54-04-01-02-11-54

คำนำ

ทอสโพไวรัสจัดอยู่ใน Family Bunyaviridae และ Genus Tospovirus อนุภาคของทอสโพไวรัสมีลักษณะทรงกลม (spherical) ขนาด 80-120 นาโนเมตร กรดนิวคลีอิคเป็นอาร์เอ็นเอ (RNA) สายเดี่ยว 3 ชิ้น คือ ขนาดใหญ่ (L-RNA) ขนาดกลาง (M-RNA) และขนาดเล็ก (S-RNA) แต่ละชิ้นห่อหุ้มด้วยโปรตีน (coat protein) และมีเยื่อหุ้มอนุภาค (envelope) ซึ่งประกอบด้วยไขมันและไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีรายงานการพบเชื้อแล้วอย่างน้อย 15 species (ชนิด) โดยอาศัยข้อมูลจีโนมร่วมกับลักษณะทางชีววิทยา ทอสโพไวรัสมีความหลากหลายมากทั้งในด้านพืชอาศัย แมลงพาหะ และสามารถจัดแบ่งได้อย่างน้อย 6 ซีโรกรุ๊ป (Serogroup) (Cortes et al., 1998) ตามลักษณะการทำปฏิกิริยาทางซีรัมวิทยาของเชื้อแต่ละชนิด ทอสโพไวรัสมีเพลี้ยไฟเป็นพาหะถ่ายทอดโรคโดยมีความสัมพันธ์เป็นแบบคงทน (persistent) (German et al., 1992) นอกจากนี้เชื้อไวรัสยังสามารถปนเปื้อนมากับเมล็ดและส่วนขยายพันธุ์ (Ie, 1970)

สำหรับในประเทศไทยได้มีการตรวจพบทอสโพไวรัสตั้งแต่ปี 2516 ด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้แอนติซีรัมต่อซีโรกรุ๊ปของทอสโพไวรัส แต่ยังไม่ได้จำแนกไวรัสสาเหตุโรคในระดับ Species ต่อมาในปี 2528 ได้มีการตรวจในถั่วลิสงโดยใช้แอนติซีรัมต่อเชื้อ Groundnut bud necrosis virus : GBNV เป็นตัวตรวจ (โสภณ, 2536) และได้ตรวจพบการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดมะเขือเทศลูกผสมเบอร์ 578 ในอัตรา 1.3-2.5% และเบอร์ 674 ในอัตรา 2.5% (โสภณและจุฑารัตน์, 2536) Pongsapich และ Chiemsombat (2002) ได้ตรวจจำแนกทอสโพไวรัสที่เข้าทำลายมะเขือเทศพบว่าเป็นทอสโพไวรัสซีโรกรุ๊ป 4 (Serogroup IV) แต่ยังไม่ได้ระบุชนิด (Species) ของเชื้อ และยังไม่ทราบชนิดของเพลี้ยไฟที่เป็นพาหะถ่ายทอดโรค หรือการถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ด นอกจากนั้นแล้วยังพบพืชปลูกหลายชนิดที่เป็นพืชอาศัยในสภาพธรรมชาติ คือ พริก มะเขือเทศ แตงโม แคนตาลูป ยาสูบ ถั่วพุ่ม รวมทั้งวัชพืชในแปลงปลูก เช่น โทงเทง ผักเป็ด แพงพวย ผักเสี้ยนผี ผักแครด และกระดุมใบ (โสภณ, 2536) ลักษณะอาการของพืชที่ถูกทอสโพไวรัสเข้าทำลาย จะมีอาการไหม้ (necrosis) บนส่วนต่างๆ ของพืช อาการบนใบ เช่น ใบซีด (chlorosis) ด่างวงแหวน (ring spot) ด่างประ (mottling) ใบเป็นสีเงิน (silvering) แคระแกร็น (stunting) และใบจุด (local lesion) ซึ่งอาการของโรคจะผันแปรขึ้นอยู่กับชนิดของไวรัส พืชอาศัย ระยะเวลาที่เชื้อเข้าทำลายพืชและสภาพแวดล้อม ในสภาพธรรมชาติทอสโพไวรัสมีเพลี้ยไฟเป็นพาหะถ่ายทอดโรค เพลี้ยไฟที่มีรายงานว่าเป็นพาหะของทอสโพไวรัสมีทั้งหมด 8 ชนิด

ในประเทศไทยมีรายงานการตรวจพบและจำแนกชนิดทอสโพไวรัสแล้ว 4 ชนิด ได้แก่ Watermelon silver mottle virus (WSMoV) Thailand tomato tospovirus or tomato necrosis virus (TNSV) Capsicum chlosis virus (CaCV) และ Melon yellow spot virus (MYSV) (โสภณ, 2536; Pongsapich และ Chiemsombat, 2002; วิมลและคณะ, 2547)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง
- spectrophotometer
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA

วิธีการ

การเก็บตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืช เช่น มะเขือเทศ พริก พืชตระกูลแตง จากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในประเทศไทย โดยเก็บส่วนต่างๆ ของพืชที่แสดงอาการคล้ายกับอาการของโรคที่เกิดจากทอสโพไวรัสเข้าทำลาย ใส่ตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกกันน้ำและเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ห้องปฏิบัติการ

การตรวจสอบทอสโพไวรัสในตัวอย่างพืช

1. ตรวจสอบทอสโพไวรัสในตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค Direct antigen coating ELISA (DAC-indirect ELISA) ใช้วิธีของโสภณ (2536) โดยบดชิ้นส่วนของพืชใน carbonate coating buffer ที่เย็น ในอัตราส่วนพืช 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 20-50 มิลลิลิตร ดูดน้ำคั้นตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร หยอดใส่ลงในหลุมของ ELISA plate บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ครบเวลาแล้วจึงล้างหลุมให้สะอาดด้วย PBST 3 ครั้ง โดยแช่ไว้ 3-5 นาทีต่อครั้ง เจือจางแอนติซีรัมต่อเชื้อทอสโพไวรัสกรุ๊ป 4 ในอัตรา 1: 1,000 (v/v) และผสมน้ำคั้นพืชปกติที่บดใน conjugate buffer (1:50 w/v) ให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1:100 ตั้งทิ้งไว้ 20-40 นาที เพื่อกำจัดโปรตีนพืช จากนั้นนำแอนติซีรัมไปหยอดลงในหลุมตัวอย่าง หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วล้างด้วยวิธีเดิม เตรียม goat-anti rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate เจือจาง อัตรา 1:100 (v/v) ใน conjugate buffer นำไปหยอดในหลุมตัวอย่างที่ล้างแล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วล้างด้วยวิธีเดิม เตรียม 0.5% p-Nitrophenyl phosphate ใน substrate buffer นำมาหยอดลงในหลุมที่ล้างแล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มไว้ในกล่องชื้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45-60 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 3M KOH หลุมละ 25 ไมโครลิตร วัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นในหลุมตัวอย่างด้วย ELISA reader ที่ความยาวช่วงคลื่น 405 นาโนเมตร

2. ตรวจสอบทอสโพไวรัสในตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค Tissue blot immunoassay (TBIA) โดยทำการตรวจทอสโพไวรัสด้วยวิธี TBIA เปรียบเทียบกับวิธี ELISA โดยใช้ใบมีดโกนที่คมตัดส่วนของ

พืชบริเวณที่จะทดสอบ แล้วกดผิวหน้าตัดของพืชลงบนแผ่น nitrocellulose membrane 1 ครั้ง ปล่อยให้แห้ง นำแผ่นเมมเบรนใส่ในถุงพลาสติกแล้วเติม 5% NFDM (non fat dry milk ในสารละลาย PBS buffer) ปิดถุงให้สนิท นำไปเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วล้างออกด้วย PBST buffer 1 ครั้ง แล้วเติม IgG ของทอสโพไวรัสซีโรกรุ๊ป 4 ที่เจือจาง 1:1,000 เท่า ใน PBST buffer นำไปเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วย 5% NFDM ใน PBS แล้วเติม goat anti rabbit alkalite phosphatate conjugate ที่เจือจาง 1:30,000 เท่า ใน PBST buffer ลงในถุง นำไปเขย่าอีก 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ด้วย PBST แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ใช้กระดาษกรองซับน้ำให้เมมเบรนแห้งหมาดๆ ใส่ลงในถุงพลาสติกแล้วเติม BCTP/NBT (1mg/ml) เมื่อปรากฏสีม่วงบนตัวอย่างควบคุมที่มีไวรัส นำเมมเบรนมาแช่ในน้ำกลั่นเพื่อหยุดปฏิกิริยา และอ่านผลโดยดูจากสีม่วงที่เกิดขึ้นซึ่งเป็นผลบวก แสดงว่ามีไวรัสในตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบ

3. การสกัดอาร์เอ็นเอและสังเคราะห์ Nucleocapsid gene (N gene) ด้วยเทคนิค multiplex PCR โดยนำตัวอย่างพืชที่ตรวจพบทอสโพไวรัสมาสกัดอาร์เอ็นเอด้วย RLT buffer (QIAGEN) ตามวิธีของ วิมลและคณะ (2547) สังเคราะห์ cDNA และเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (Nucleocapsid gene, N gene) โดยใช้ Superscript III (Invitrogen TM) ในหลอดปฏิกิริยาผสมไพรเมอร์รวมกัน 6 สาย ซึ่งจำเพาะต่อไวรัส 4 ชนิด คือ Watermelon silver mottle virus (WSMoV) Capsicum chlosis virus (CaCV) tomato necrosis virus (TNSV) และ Melon yellow spot virus (MYSV) ตรวจผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บันทึกผล

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.56 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างพืช เช่น มะเขือเทศ พริก มันฝรั่ง จากแหล่งปลูกพืชที่สำคัญในประเทศไทยได้แก่ จังหวัดตาก เชียงใหม่ และ อุบลราชธานี จำนวน 5 ตัวอย่าง โดยเก็บส่วนต่างๆ ของพืชที่แสดงอาการคล้ายกับอาการของโรคที่เกิดจากทอสโพไวรัสเข้าทำลาย ใส่ตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกกันน้ำและเก็บไว้ในที่เย็นประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ห้องปฏิบัติการ

ตรวจสอบทอสโพไวรัสในตัวอย่างพืชด้วยเทคนิค Direct antigen coating ELISA (DAC-indirect ELISA) ใช้วิธีของโสภณ (2536) พบว่า ตรวจพบ Watermelon silver mottle virus (WSMoV) และ tomato necrosis virus จากตัวอย่าง มันฝรั่ง พริก และมะเขือเทศ จำนวน 5 ตัวอย่าง

เอกสารอ้างอิง

ปรียพรรณ พงศาพิชณ์. 2543. การพัฒนากรดนิวคลีอิคตัวตรวจสำหรับวินิจฉัยทอสโพไวรัสในมะเขือเทศและพริก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 71 หน้า

วิมล สีเทา พิสสวรรณ เจียมสมบัติ อรประไพ คชนันท์ อัญจนา บุญชด นุชนารถ วารินทร์ ปิยาภรณ์ เพชรสูงเนิน และชาญณรงค์ ศรีภิบาล. 2547. การจำแนกทอสโพไวรัสที่พบในพริกมะเขือเทศ และพืชตระกูลแตง. น. 445-451 ใน การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 42. 1-4 กุมภาพันธ์ 2547 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ

โสภณ วงศ์แก้ว. 2536. โรคไวรัสของถั่วลิสงในประเทศไทย. กลุ่มพืชน้ำมัน กองส่งเสริมพืชไร่นา กรมส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 44 น.

โสภณ วงศ์แก้ว และจุฑารัตน์ เชื้อพงษ์. 2536. ไวรัสสาเหตุโรคยอดไหม้ของถั่วลิสงและการสำรวจการแพร่ระบาดของโรควิสาของถั่วลิสง ปี 2535-2536, น. 233-238. ใน รายงานการสัมมนางานวิจัยถั่วลิสง ครั้งที่ 11, 17-21 พฤษภาคม 2536. ระนอง.

Cortes, I., I.C. Livieratos, A. Derks, D. Peters and R. Kormelink. 1998. Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new distint tospovirus species. Phytopathology 88: 1276-1282.

German, T.L., D.E. Ullman and J.W. Moyer. 1992. Tospovirus: diagnosis, molecular biology, phylogeny and vector relationships. Annual Review of Phytopathology 30 :315-348.

Ie, T.S. 1970. Tomato spotted wilt virus. C.M.I./A.A.B. Description of plant virus. No. 39.

Lee, A.M., D.M. Persley and J.E. Thomas. 2002. A new tospovirus serogroup IV species infectingcapsicum and tomato in Queensland, Australasian Plant Pathology. 31 : 231-239.

Pongsapich, P and P. Chiemsombat. 2002. Characterization of Tospovirus Infecting Tomatoes in Thailand Revaled the Presence of Serogroup IV-tospovirus But Not Serogroup I-tomato spotted wilt virus. 92 p. In the first International Conference on Tropical and Subtropical Plant Diseases. The Imperial Mae Ping Hotel Chiang Mai, Thailand.