



การแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนและคุณสมบัติทางชีววิทยา

Mild Strain Isolation of Citrus Tristeza *Closterovirus* and its Biological  
Properties

พุดตาล ทิพเพ็ง

Puttarn Tippeng

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษิตตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Plant Pathology

Prince of Songkla University

2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      การแยกเชื้อชิตริสทริสเดซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนและคุณสมบัติทางชีววิทยา  
 ผู้เขียน              นางสาวพุดตาล ทิพเพ็ง  
 สาขาวิชา              โรคพืชวิทยา

---

**อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

**คณะกรรมการสอบ**

.....

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา สดุดี)

(รองศาสตราจารย์ ดร.วสันต์ เพชรรัตน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา สดุดี)

.....กรรมการ

(นางสุรณี กীরติยะอังกูร)

.....กรรมการ

(ดร.มณีรัตน์ คุณาพิทักษ์ธรรม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
 สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วน  
เกี่ยวข้องทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา สดุดี)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวพุดมตาล ทิพเพ็ง)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการขออนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวพุดตาล ทิพเพ็ง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนและคุณสมบัติทางชีววิทยา
ผู้เขียน	นางสาวพุ่มตาล ทิพเพ็ง
สาขาวิชา	โรคพืชวิทยา
ปีการศึกษา	2556

### บทคัดย่อ

โรคทริสเตซาสร้างความเสียหายต่อพืชตระกูลส้มในแหล่งปลูกส้มทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย ความรุนแรงของโรคทริสเตซาขึ้นอยู่กับชนิดของส้ม และสายพันธุ์ของเชื้อสาเหตุซีตรัสทริสเตซาไวรัส (Citrus tristeza *Closterovirus*, CTV) จุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อแยก เชื้อไวรัสสายพันธุ์อ่อน ซึ่งจะนำไปใช้ในการป้องกันโรคทริสเตซาที่รุนแรงต่อไป โดยแยกเชื้อจากแหล่งเชื้อมะนาว SM4 ซึ่งมีอาการเส้นใบสี และจากแหล่งเชื้อส้มโอ DAT4-5 มีอาการใบเหลือง เตี้ยแคระ และทุดโทรม นำเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*Toxoptera citricida*) ซึ่งเป็นพาหะของ เชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสมาดูดกินมะนาว SM4 และส้มโอ DAT4-5 เพื่อรับไวรัสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแมลงพาหะไปดูดกินเพื่อถ่ายไวรัสไปยังพืชทดสอบ คือต้นกล้ามะนาว [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.] เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยใช้แมลง 1 ตัวต่อพืชทดสอบ ผลการตรวจเชื้อไวรัสในพืชทดสอบที่รับเชื้อจากแมลงพาหะโดยเทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) พบว่าแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส ได้รวมทั้งสิ้น 12 ไอโซเลท โดยแยกได้จากแหล่งเชื้อมะนาว SM4 และส้มโอ DAT4-5 จำนวน 7 และ 5 ไอโซเลท ตามลำดับ จากอาการบนพืชทดสอบพบเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้ ซึ่งมีแนวโน้มเป็นเชื้อสายพันธุ์อ่อน 4/12 ไอโซเลท แล้วคัดเลือก 3/4 ไอโซเลท คือ SM4-P5 SM4-P9 และ SM4-P10 มาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะอาการที่เชื้อแต่ละไอโซเลทชักนำให้เกิดขึ้นกับพืชทดสอบ 3 ชนิด คือ มะนาว (*C. aurantifolia*) ส้มโอ (*C. grandis* L.) และเกรฟรุท (*C. paradisi* Macfad.) พบว่าเชื้อทั้งสามไอโซเลททำให้เกิดอาการเส้นใบสีเพียงเล็กน้อย (ระดับ 1) บนพืชทดสอบมะนาวเท่านั้น ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นเชื้อสายพันธุ์อ่อน ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสด้วยแบบแผน RFLP ซึ่งได้จากการตัดรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf* I พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลทมีแบบแผน RFLP ที่แตกต่างกันและพบแบบแผนร่วมมากกว่า 1 แบบแผน โดยเปรียบเทียบกับแบบแผน RFLP ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส ซึ่งรายงานไว้โดย Gillings และคณะ (1993) ไอโซเลท SM4-P5 พบแบบ

แผน RFLP ของเชื้อกลุ่มสายพันธุ์รุนแรง ปานกลาง และอ่อนร่วมกัน ไอโซเลท SM4-P10 พบแบบแผนของเชื้อกลุ่มสายพันธุ์รุนแรง และปานกลาง และไอโซเลท SM4-P9 พบแบบแผนที่ไม่มีในรายงานของ Gillings และคณะ (1993) และพบว่าไอโซเลท SM4-P5 มีอัตราการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ 75 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไอโซเลท SM4-P9 และไอโซเลท SM4-P10 มีอัตราการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะเท่ากัน คือ 70 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส ไอโซเลท SM4-P5, SM4-P10 และ SM4-P9 ในน้ำคั้นจากเนื้อเยื่อ (เปลือกเขียวของกิ่งมะนาว) ที่ระดับความเข้มข้น 0.064, 0.081, และ 0.350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำคั้นของเนื้อเยื่อ ซึ่งไอโซเลท SM4-P9 มีแนวโน้มในการขยายพันธุ์ในเนื้อเยื่อมะนาวสูงกว่าไอโซเลท SM4-P5 และ SM4-P10

<b>Thesis Title</b>	Mild Strain Isolation of Citrus Tristeza <i>Closterovirus</i> and its Biological Properties
<b>Author</b>	Miss Puttarn Tippeng
<b>Major Program</b>	Plant Pathology
<b>Academic Year</b>	2013

### Abstract

Tristeza disease is one of the most destructive disease to citrus growing area worldwide including Thailand. Severity of tristeza disease depends on citrus species and strains of Citrus tristeza *Closterovirus* (CTV), a causal pathogen. The purpose of this experiment is to isolate citrus tristeza virus mild strain that will be used in cross protection. Citrus tristeza virus was isolated by a brown citrus aphid (*Toxoptera citricida*), the virus vector, from naturally infected West Indian lime SM4 showing vein clearing symptom and from pomelo DAT 4-5 showing yellow leaf, stunting, and declining symptoms. The aphids were allowed to feed on SM4 and DAT 4-5 to acquire the virus for 24 hr. Then they were transferred to feed on an index plant seedling [*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.] for another 24 hr. in order to transmit the virus to the seedlings. A single aphid was used per seedling. Results from ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) showed that 12 isolates of citrus tristeza virus were recovered, 7 from SM4 and 5 from DAT 4-5. Among these, 4/12 isolates were likely to be mild strain according to induction of mild symptom on the index seedling. Further, severity evaluation was made on 3/4 isolates of mild symptom induction group including, SM4-P5, SM4-P9, and SM4-P10. Each isolate was inoculated into 3 species of citrus tristeza virus biological index plants, West Indian lime (*C. aurantifolia*), pomelo (*C. grandis* L.) and grapefruit (*C. paradisi* Macfad.). Only mild vein clearing symptom (level 1) was induced by the three isolates on *C. aurantifolia*. Results from biological indexing concluded that these three isolates are mild strains. The identification of citrus tristeza virus strain based on RFLP profile of coat protein gene (P25) cut with *Hinf* I. Results

indicated that the RFLP profiles found in citrus tristeza virus isolate SM4-P5, SM4-P9 and SM4-P10 were different. RFLP profiles belonging to severe, moderate and mild strains of citrus tristeza virus were recovered in SM4-P5 isolate while profile of severe and moderate strain were found in SM4-P10. However, profiles found in SM4-P9 were not recognized according to Gillings *et al* (1993). Aphid transmission of citrus tristeza virus was determined and resulted in SM4-P5 gave transmission rate of 75%. SM4-P9 and SM4-P10 were transmitted at the rate of 70%. In addition, detection of citrus tristeza virus by ELISA indicated that 0.064, 0.081 and 0.350  $\mu\text{gml}^{-1}$  were recovered in sap extract from green bark of West Indian lime infected by SM4-P5, SM4-P10 and SM4-P9, respectively. This could mean that SM4-P9 multiplied better than SM4-P5 and SM4-P10.



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รัตนา สดุติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ให้คำแนะนำ และชี้แนะแนวทางในการดำเนินงาน ตลอดจนการเขียนและตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วสันต์ เพชรรัตน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ คุณสุรภี กীরติยะอังกูร และ ดร.มณีนรัตน์ คุณาพิทักษ์ธรรม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องทำให้ วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และโครงการ ส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการ การอุดมศึกษา (NRU) ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ Dr. Lucy Tran-Nguyen ที่ให้การสนับสนุนและให้การต้อนรับ ในการเข้าร่วมเสนอผลงานทางวิชาการในการประชุม The 4<sup>th</sup> ASIAN CONFERENCE ON PLANT PATHOLOGY CONCURRENT WITH THE 18<sup>th</sup> BIENNIAL AUSTRANASIAN PLANT PATHOLOGY SOCIETY CONFERENCE (ACPP- APPS) ณ ประเทศออสเตรเลีย และ The Crawford Fund ที่ให้ทุนสนับสนุนในการเข้าร่วมประชุมครั้งนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และบุคลากรคณะทรัพยากรธรรมชาติ ทุกท่านที่กรุณา ช่วยเหลือ ให้ความรู้และประสบการณ์ในด้านต่างๆ

ขอขอบพระคุณนายวศะพงศ์ เอกสมทราเมษฐ์ นายอัษฎางค์ วงศ์การเวก นางสาวนิราณี ปือราเฮง นายสุรเชษฐ์ มาฆทาน นายณัฐพงศ์ สงฤทธิ์ และเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือทั้งกำลังกายและกำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จ

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อชม คุณแม่ละเมียด ทิพเพ็ง และครอบครัว ตลอดจน ญาติพี่น้องทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และให้กำลังใจตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา ได้ในครั้งนี้

พุ่มตาล ทิพเพ็ง

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	11
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	12
วัสดุ อุปกรณ์	12
วิธีการดำเนินการ	20
3. ผลการศึกษา	29
4. วิจารณ์	49
5. สรุป	53
เอกสารอ้างอิง	55
ภาคผนวก	62
ประวัติผู้เขียน	65

## รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การให้คะแนนระดับความรุนแรงของอาการทางใบ	25
2	การให้คะแนนระดับความรุนแรงของอาการทางลำต้น	25
3	แสดงผลการตรวจพบเชื้อ CTV โดยเทคนิค ELISA ในพืชทดสอบมะนาวซึ่งรับ การถ่ายเชื้อจากแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล ( <i>T. citricida</i> )	30
4	ลักษณะอาการของพืชทดสอบมะนาวซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ CTV ไอโซเลท ที่แยกได้โดยใช้แมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล	31
5	ระดับความรุนแรงของอาการทางใบและอาการทางลำต้นที่เชื้อ CTV ที่แยก ได้ชักนำให้เกิดบนพืชทดสอบ	37
6	อัตราการเจริญเติบโต (ความสูง) ของพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อซีตรัสทริสเตซา ไวรัสสายพันธุ์ที่แยกได้	38
7	จำนวนชิ้นและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ของเชื้อ CTV เมื่อตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ <i>Hinf</i> I	42
8	แสดงแบบแผน RFLP ที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอของรหัสพันธุกรรมเปลือก โปรตีน P25 ด้วยเอนไซม์จำเพาะ <i>Hinf</i> I ของเชื้อ CTV สายพันธุ์ต่างประเทศ รายงานโดย Gillings และคณะ (1993)	43
9	การจัดกลุ่มแบบแผน RFLP ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ของเชื้อ CTV ไอโซเลทซึ่งแยกโดยแมลงพาหะและแยกโดยวิธี leaf grafting เมื่อตัด ด้วยเอนไซม์จำเพาะ <i>Hinf</i> I	44
10	แสดงผลการตรวจพบเชื้อ CTV โดยเทคนิค ELISA ในต้นกล้ามะนาวที่ได้รับ การถ่ายทอดเชื้อ CTV สายพันธุ์อ่อนโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล ( <i>T. citricida</i> )	45
11	อัตราการถ่ายทอดเชื้อ CTV สายพันธุ์อ่อนโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้ม สีน้ำตาล ( <i>T. citricida</i> )	46
12	ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ CTV สายพันธุ์อ่อนที่แยกได้ในเนื้อเยื่อพืช	48

## รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงแผนภูมิจีโนมบนสายอาร์เอ็นเอของเชื้อ CTV ที่ประกอบด้วย Open Reading Frame 12 ตำแหน่ง	4
2	ตัวเต็มวัยของแมลง <i>Toxoptera citricida</i> (Kirkaldy) จับจากต้นส้มตามธรรมชาติแล้วนำมาเลี้ยงบนต้นกล่ำส้มจี๊ด ( <i>Citrus mitis</i> ) ปลอดโรคซึ่งปลูกจากเมล็ด	21
3	แมลงพาหะ <i>Toxoptera citricida</i> (Kirkaldy) ดูดกินมะนาว SM4 ติดเชื้อ CTV ในแปลงปลูกเพื่อรับเชื้อ CTV	21
4	แมลงพาหะ <i>Toxoptera citricida</i> (Kirkaldy) ดูดกินพืชทดสอบมะนาวเพื่อถ่ายเชื้อ CTV	22
5	การปลูกเชื้อ CTV ลงในพืชทดสอบ โดยใช้เทคนิค leaf grafting	24
6	แสดงแบบแผน RFLP ที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25 ด้วยเอนไซม์จำเพาะ <i>Hinf</i> I ของเชื้อ CTV สายพันธุ์ต่างประเทศ รายงานโดย Gillings และคณะ (1993)	26
7	อาการเส้นใบใสบนพืชทดสอบมะนาว	32
8	อาการร่องบวมบนพืชทดสอบมะนาว	33
9	อาการเส้นใบใสบนพืชทดสอบมะนาว	35
10	ลักษณะอาการเส้นใบแตก (corky vein) และอาการใบเหลือง (yellow) บนพืชทดสอบมะนาวเมื่อติดเชื้อ CTV ไอโซเลท CmO2-1	36
11	ผลผลิตดีเอ็นเอของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ของเชื้อ CTV ที่เพิ่มปริมาณ โดย RT-PCR และใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ P25 gene	39
12	แบบแผน RFLP ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ <i>Hinf</i> I ของเชื้อ CTV ไอโซเลทที่แยกโดยแมลงพาหะ	40
13	แบบแผน RFLP ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ <i>Hinf</i> I ของเชื้อ CTV สายเชื้อในธรรมชาติ และไอโซเลทที่แยกโดยวิธี leaf grafting	41
14	กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ของเชื้อ CTV บริสุทธิ์ (SM4)	47

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

ส้มเป็นพืชเศรษฐกิจ และมีการเพาะปลูกกันแพร่หลายในประเทศไทย ชนิดของส้มที่ปลูก ได้แก่ ส้มโอ (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) ส้มโชกุน (*Citrus reticulata* Blanco) ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) ส้มเขียวหวาน (*Citrus reticulata* Blanco) และมะนาว (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) เป็นต้น ผลผลิตที่ได้บริโภคภายในประเทศเป็นหลัก แต่ในการผลิตส้มประสบปัญหาและอุปสรรคเกี่ยวกับโรคและแมลงศัตรูส้ม ทำให้ปริมาณและคุณภาพของผลผลิตลดลง เพิ่มต้นทุนในการผลิต โรคทริสเทซาเป็นโรคหนึ่งที่สำคัญและสร้างความเสียหายต่อพืชตระกูลส้มในแหล่งปลูกส้มทั่วโลก ประเทศไทยมีรายงานโรคทริสเทซาเกิดขึ้นกับพืชตระกูลส้ม และระดับความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของส้ม และสายพันธุ์ของเชื้อที่เข้าทำลาย (รัตนา สดุดี , 2537) สายพันธุ์ซีตรัสทริสเทซาไวรัส (*Citrus tristeza Closterovirus*) ที่พบในธรรมชาติมี 2 กลุ่มคือกลุ่มสายพันธุ์อ่อน (mild strain) ที่ก่อให้เกิดอาการที่ไม่รุนแรง และกลุ่มสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) ซึ่งประกอบด้วยสายพันธุ์เชื้อที่ทำให้เกิดอาการต้นกล้าเหลือง (seedling yellow) ต้นแคระแกรน (stunt) อาการทรุดโทรม (decline) สายพันธุ์เชื้อที่ทำให้เกิดอาการลำต้นปุ่ม (stem pitting) และมีรายงานพบการติดเชื้อม่วมของเชื้อซีตรัสทริสเทซาไวรัสหลายสายพันธุ์ในต้นส้ม (Koizumi *et al.*, 2001) การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเทซาไวรัสสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การจำแนกโดยใช้ลักษณะอาการที่เกิดกับพืชทดสอบ (biological index) (ไมตรี พรหมมินทร์ และคณะ, 2529; Ochoa *et al.*, 1993; Figueroa *et al.*, 2009 และ Bekolo *et al.*, 2007) การจำแนกโดยวิธีการทางเซรุ่มวิทยา (serology) (รัตนา สดุดี และคณะ, 2551 และ Nikolaeva and Karasev *et al.*, 1995) และการจำแนกโดยใช้วิธีการทางชีวโมเลกุล (molecular biology) (Gillings *et al.*, 1993)

เชื้อซีตรัสทริสเทซาไวรัสแพร่กระจายโดยติดไปกับท่อนขยายพันธุ์ และแมลงพาหะจำพวกเพลี้ยอ่อน ซึ่งมีเพลี้ยอ่อน 4 ชนิด ที่เป็นพาหะในการถ่ายทอดเชื้อซีตรัสทริสเทซาไวรัสคือ เพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*Toxoptera citricida*), เพลี้ยอ่อนส้ม (*T. aurantii*), เพลี้ยอ่อนฝ้าย (*Aphis gossypii*) และเพลี้ยอ่อนส้มเขียวหวาน (*A. spiraeicola*) และพบว่าเพลี้ยอ่อนส้มสี

น้ำตาล (*T. citricida*) มีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อสูงกว่าเพลี้ยอ่อนฝ้าย (*A. gossypii*) (Yokomi *et al.*, 1994) แต่อัตราการถ่ายทอดเชื้อซีตรัสเทซาไวรัสโดยเพลี้ยอ่อน *T. citricida* ไม่เท่ากันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ไวรัส นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้แมลงพาหะเพลี้ยอ่อนเดี่ยว (single aphid transmission) แยกสายพันธุ์ไวรัสที่ติดเชื้อร่วมกันในต้นส้มออกเป็นเชื้อสายพันธุ์เดี่ยว (Broadbent *et al.*, 1996 และ ปรีชา ส่งเสริม, 2548)

การควบคุมโรคทริสเทซาโดยใช้สารเคมีควบคุมแมลงพาหะจะทำให้ต้นทุนการผลิตส้มเพิ่มสูงขึ้น และเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้มีรายงานการป้องกันโรคชนิดนี้ด้วยวิธีการปลูกเชื้อสายพันธุ์อ่อนให้กับต้นส้มเพื่อป้องกันการติดเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (cross protection) ที่มีอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติและถูกแพร่กระจายไปโดยแมลงพาหะ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ได้ผลดีในการป้องกันและลดความเสียหายจากโรคทริสเทซาและประสบความสำเร็จในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา บราซิล อิสราเอล อินเดีย เป็นต้น (Costa and Muller, 1980)

ดังนั้นการแยกเชื้อซีตรัสเทซาไวรัสและจำแนกสายพันธุ์ไวรัสเพื่อให้ได้ไวรัสสายพันธุ์อ่อนจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ควบคุมโรคทริสเทซาของพืชตระกูลส้มต่อไป

## การตรวจเอกสาร

### โรคทริสเตซา

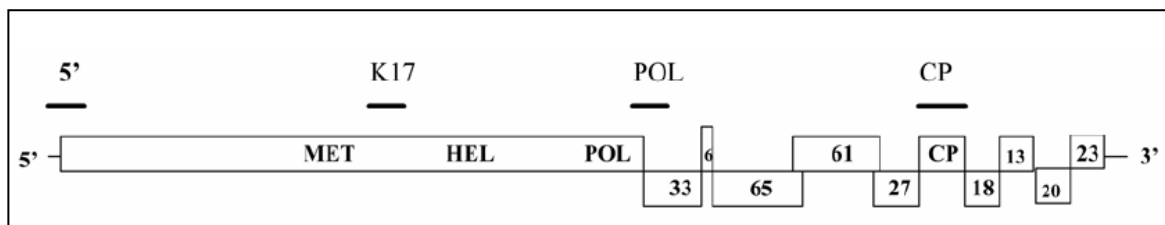
โรคทริสเตซาเป็นโรคที่สำคัญ และสร้างความเสียหายกับพืชตระกูลส้มมากกว่า 80 ล้านต้นทั่วโลก (Davino *et al.*, 2005) มีแหล่งกำเนิดในแถบทวีปเอเชีย และได้แพร่กระจายไปยังพื้นที่ปลูกส้มทั่วโลก โดยติดไปกับสวนขยายพันธุ์ต่อมาแพร่กระจายโดยแมลงพาหะ (Rocha-Pena, 1995) ในปี ค.ศ. 1930 ได้แพร่กระจายและทำความเสียหายไปยังพื้นที่ปลูกส้มในเขตบราซิล อาร์เจนตินาพื้นที่ต่างๆ ในอเมริกาใต้ สหรัฐอเมริกา อิสราเอล และสเปนกว่า (Korkmaz, 2002) โรคทริสเตซาเกิดขึ้นกับพืชตระกูลส้ม ระดับความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับชนิดของส้ม และสายพันธุ์ของเชื้อที่เข้าทำลาย ทำให้ลักษณะอาการของโรคแตกต่างกัน (รัตนา สดุดี, 2537) โดยเฉพาะมะนาวจะแสดงอาการของโรคเด่นชัด เริ่มจากใบอ่อนพบอาการเส้นใบใส (vein clearing), เส้นใบแตก (corky vein), อาการใบถ้วย (leaf cupping), ต้นกล้าเหลือง (seedling yellow), ปลายกิ่งแห้งตาย (decline), ต้นแคระแกรน (stunt) และอาการร่องปุ่มในเนื้อไม้ (stem pitting) ส่งผลให้ผลผลิตลดลง และตายในที่สุด (สิริภัทร์ พงษ์เสฐ, 2526) นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันทำให้อาการของโรคทริสเตซาที่ปรากฏแตกต่างกัน (Garnsey *et al.*, 2005)

สิริภัทร์ พงษ์เสฐ (2526) พบอาการของโรคทริสเตซาของส้มเขียวหวานในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกรบริเวณรังสิต มีความสัมพันธ์กับอายุของต้นพืช สวนส้มที่มีอายุ 1-5 ปี พบอาการแคระแกรนและสีเหลืองซีดของใบ ต้นส้มที่มีอายุ 6 ปีขึ้นไป แสดงอาการต้นโทรม ผลมีขนาดเล็กลง ใบเหลืองซีด ร่วง กิ่งแห้งตาย จนถึงต้นตาย

### ซีตรัสทริสเตซาไวรัส

โรคทริสเตซามีสาเหตุมาจากเชื้อ *Citrus tristeza Closterovirus* ซึ่งเป็นไวรัสที่มีอนุภาคขนาดยาว อาศัยอยู่ในเซลล์ท่อนอาหารเท่านั้น มีรูปร่างเป็นท่อนยาวคด (Flexuous rod) ยาวประมาณ 2,000 นาโนเมตร น้ำหนักโมเลกุลประมาณ  $13.3 \times 10^6$  ดาลตัน อนุภาคไวรัสประกอบด้วยอนุภาคเดี่ยว มีสารพันธุกรรมเป็นแบบ single stranded RNA (Bar-Joseph *et al.*, 1989) RNA ของ *Closterovirus* จะมีความยาวตั้งแต่ 15.5 ถึง 20 กิโลเบส จีโนมของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสประกอบด้วย ORF (Open Reading Frame) 12 ตำแหน่ง และ ORF ที่เป็นรหัส

พันธุกรรมของเปลือกโปรตีนมี 2 รหัส คือ CP หรือ P25 และ P27 ซึ่งอยู่ที่ปลายด้าน 3' ดังภาพที่ 1 (Hilf *et al.*, 2005)



ภาพที่ 1 แสดงแผนภูมิจีโนมบนสายอาร์เอ็นเอของเชื้อ CTV ที่ประกอบด้วย Open Reading Frame 12 ตำแหน่ง (ที่มา: Hilf *et al.*, 2005)

ในธรรมชาติพบเชื้อซีตรัสทรินสเตชาไวรัสหลายสายพันธุ์ แยกออกเป็น 2 กลุ่มสายพันธุ์ ตามลักษณะอาการ คือ กลุ่มสายพันธุ์อ่อน หรือสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) ซึ่งทำให้เกิดอาการไม่รุนแรง และกลุ่มสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) ประกอบด้วยสายพันธุ์ทรุดโทรมเมื่อใช้ต้นตอซาร์วอเรนจ์ (decline, CTV-D) สายพันธุ์ต้นกล้าเหลือง (seedling yellow, CTV-SY) และสายพันธุ์ลำต้นนูน (stem pitting, CTV-SP) ในกลุ่มสายพันธุ์รุนแรงนี้จะส่งผลกระทบต่อพืชตระกูลส้มที่ติดเชื้อ ทำให้ต้นตายหรืออายุสั้นลง (Bar-Joseph *et al.*, 1985) และมีรายงานการพบเชื้อซีตรัสทรินสเตชาไวรัสมากกว่าหนึ่งสายพันธุ์อยู่ร่วมกันในต้นส้ม (Koizumi *et al.*, 2001)

Rocha-Pena และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาพืชอาศัยของเชื้อซีตรัสทรินสเตชาไวรัสและอาการต่างๆ ที่เกิดกับพืชอาศัยแต่ละชนิด พบว่าเชื้อซีตรัสทรินสเตชาไวรัสจะมีพืชอาศัยจำกัดในพืชตระกูลส้มซึ่งอยู่ในวงศ์ Rutaceae และ *Passiflora gracilis* ซึ่งเป็นพืชนอกวงศ์ Rutaceae เชื้อซีตรัสทรินสเตชาไวรัสเกือบทุกสายพันธุ์ทำให้เกิดอาการเส้นใบใส (vein clearing) บนมะนาว (Mexican Lime, *Citrus auratifolia*) ใบโค้งงอเป็นรูปถ้วย (cupping) ต้นแคระแกรน และลำต้นนูน ในส้มเกลี้ยง (sweet orange, *C. sinensis* (L.) Osbeck) หากเสียบยอดบนต้นตอซาร์วอเรนจ์ เมื่อติดเชื้อกลุ่มสายพันธุ์รุนแรง CTV-D แสดงอาการทรุดโทรมอย่างรวดเร็วและตายเนื่องจากเกิดการตายของ เซลล์ท่ออาหาร (phloem) ที่บริเวณรอยต่อของต้นตอ (root stock) และส่วนยอด (scion) Senan และคณะ (1997) ได้ปลูกเชื้อซีตรัสทรินสเตชาไวรัสลงบน Duncan



grapefruit พบว่าทำให้เกิดอาการต้นกล้าเหลือง (seedling yellow) ภายใน 2 สัปดาห์หลังจากการปลูกเชื้อ

รัตนา สดุดี และคณะ (2551) พบเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ลำต้นน้มนุ่มในส้มแมนดาริน (*Citrus reticulata* Blanco) 3 ชนิด คือ ส้มเขียวหวาน, ส้มโชกุน ส้มโอเขียว และยังพบในส้มโอและมะนาว ซึ่งเป็นการติดเชื้อตามธรรมชาติ ส้มโชกุนและส้มโอเขียวที่ติดเชื้อสายพันธุ์ลำต้นน้มนุ่ม แสดงอาการร่องน้มนุ่มขนาดใหญ่บนกิ่งและลำต้นซึ่งมองเห็นจากภายนอก ขณะที่ ส้มโอและมะนาวมีอาการร่องน้มนุ่มขนาดเล็กในเนื้อไม้ไม่ต้องตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และมีอาการต้นแคระแกรน Broadbent และคณะ (1996) รายงานการพบสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในควีนแลนด์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการลำต้นน้มนุ่ม (stem pitting) ในส้มนาว (*C. sinensis*)

### การถ่ายทอดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยแมลงพาหะ

เชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสามารถถ่ายทอดโดยแมลงพาหะ เพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะที่ถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา ทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคไปอย่างกว้างขวาง และรวดเร็ว เพลี้ยอ่อน (Homoptera: Aphidae) เป็นแมลงปากดูด (sucking type) ขนาดเล็กผนังลำตัวนิ่ม ขยายพันธุ์โดยไม่ต้องผสมพันธุ์ และออกลูกเป็นตัว มีทั้งพวกที่มีปีก (wing type) และไม่มีปีก (wingless type) เพลี้ยอ่อนมีกลไกการถ่ายทอดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสแบบ semi-persistent โดยไวรัสจะถูกดูดกินเข้าไปพร้อมกับน้ำเลี้ยงจากพืชไปอยู่ที่บริเวณกระเพาะส่วนหน้า (foregut) ของแมลง โดยใช้เวลาในการดูดกินเพื่อรับเชื้อ (acquisition feed) นาน 30 นาที และใช้เวลาในการดูดกินเพื่อถ่ายทอดเชื้อ (inoculation feed) 30 นาที บนพืชปกติ การเพิ่มเวลาในการถ่ายทอดเชื้อจนถึง 24 ชั่วโมง จะเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อ สำหรับเพลี้ยอ่อนที่เป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสมี 4 ชนิด คือ เพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล, เพลี้ยอ่อนส้ม, เพลี้ยอ่อนฝ้าย และ เพลี้ยอ่อนส้มเขียวหวาน (Broughton, 2007) เนื่องจากเพลี้ยอ่อนส้ม *T. citricida* กับ *T. aurantii* มีลักษณะคล้ายคลึงกันแต่สามารถจำแนกได้จากลักษณะของหนวด (antenna) และปีก *T. citricida* หนวดปล้องที่ 3, 4 และ ส่วนมากของปล้องที่ 5 ไม่มีสี (pale) ในพวกที่มีปีกหนวดปล้องที่ 3 มีสีดำทั้งปล้อง ปีกมีแขนงแตกออกเป็น 2 แขนง และมี pterostigma เป็นสีเทา ส่วน *T. aurantii* ตรงส่วนปลายของหนวดปล้องที่ 3, 4 และ 5 มีสีดำทั้งพวกที่มีปีกและไม่มีปีก ปีกมีแขนงเดียว และ pterostigma เป็นสีดำ (Bänziger, 1977)

เพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*T. citricida*) ที่เป็นพาหะหลักในการแพร่กระจายเชื้อไวรัสทรินเทตาไวรัสมีวงจชีวิต 8-21 วัน ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและพืชอาศัย ตัวอ่อนมีรูปร่างแบบผลแพร์ (pear shape) มีสีน้ำตาลแดง สีน้ำตาลถึงดำ ยาว 1-2 มิลลิเมตร เจริญเป็นตัวเต็มวัยภายใน 6-8 วัน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า ตัวเต็มวัยมีสีดำเป็นมันวาว ยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร มีทั้งพวกที่มีปีกและไม่มีปีก ตัวอ่อน 1 ตัว สามารถออกลูกได้มากกว่า 4,400 ตัว ภายใน 3 สัปดาห์ ถ้าไม่มีแมลงศัตรูรบกวน มี 25-30 รุ่นต่อปี (Broughton, 2007) สำหรับพืชอาศัยหลักของเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*T. citricida*) จำกัดอยู่ในพืชวงศ์ Rutaceae (Bänziger, 1977 และ Komazaki, 1993) แต่มีรายงานการพบเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*T. citricida*) บนพืชอาศัยตามธรรมชาติที่อยู่นอกเหนือจากวงศ์ Rutaceae เช่นพืชในวงศ์ Anacardiaceae, Fabaceae, Rosaceae เป็นต้น แต่ไม่สามารถยืนยันได้ว่าเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*T. citricida*) สามารถเจริญเติบโตออกลูกออกหลานบนพืชเหล่านั้นได้ (Halbert and Brown, 2003) Yokomi และคณะ (1994) ศึกษาประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทรินเทตาไวรัส พบว่าเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาลมีประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส 4 สายพันธุ์ ที่ได้มาจากพื้นที่ต่างๆ คือ บราซิล (B13), อิสราเอล (B23), สเปน (B53) และสหรัฐอเมริกา (B11) เฉลี่ย 41 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับอัตราการถ่ายทอดเชื้อโดยเพลี้ยอ่อนฝ้าย (*A. gossypii*) เฉลี่ย 13 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองใช้จำนวนเพลี้ย 1, 5, 10 และ 15 ตัวต่อพืชทดสอบ Mexican lime

### การถ่ายทอดเพื่อแยกเชื้อไวรัสทรินเทตาไวรัส

การถ่ายทอดเพื่อแยกเชื้อไวรัสทรินเทตาไวรัสจากส้มที่ติดเชื้อในธรรมชาติโดยการเชื่อมต่อเนื้อเยื่อ (graft transmission) เช่น การเสียบยอด (top graft), การติดตา (budding) หรือการเชื่อมเนื้อเยื่อใบ (leaf grafting) และสามารถแยกได้โดยใช้แมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้ม (aphid transmission) (รัตนา สดุดี และคณะ, 2543) โดยประสิทธิภาพและอัตราในการถ่ายเชื้อจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม ชนิดของพืชอาศัย สายพันธุ์ของเชื้อไวรัสทรินเทตาไวรัส และชนิดของพืชทดสอบ (Corazza-Nunes *et al.*, 2006)

Broadbent และคณะ (1996) ใช้แมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล 1 ตัวต่อพืชทดสอบ (single aphid transmission) แยกเชื้อไวรัสทรินเทตาไวรัสหลายสายพันธุ์ที่ติดเชื้อร่วมในต้นส้มในสภาพแปลงปลูก พบประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทรินเทตาไวรัสโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้ม (*T. citricida*) อยู่ในช่วง 0-55 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถ่ายเชื้อจากส้มแมนดารินมีอัตรา

การถ่ายทอดเชื้อ 20.7 เปอร์เซ็นต์ และถ่ายเชื้อจากเกรฟรุท 5 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อถ่ายเชื้อจากส้มที่ติดเชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัสที่ชักนำอาการร่องปุ่ม (stem pitting) พบว่ามีอัตราการถ่ายทอดเชื้อสูงสุดคือ 36.7 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัสโดยแมลงขึ้นอยู่กับชนิดของพืชอาศัยในสภาพแปลงปลูกและที่ตั้งทางภูมิศาสตร์ และยังพบว่าจากการแยกเพื่อถ่ายเชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัสโดยแมลงพาหะเพียงตัวอ่อน (single aphid transmission) เพียงรอบเดียวไม่สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัสออกเป็นสายพันธุ์เดี่ยวๆ ได้ต้องทำอย่างน้อย 3 รอบ

### การจำแนกสายพันธุ์เชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัส

#### การจำแนกด้วยพืชทดสอบ (Biological index)

การจำแนกด้วยพืชทดสอบเป็นการจำแนกความแตกต่างทางด้านอาการที่เชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัสแต่ละสายพันธุ์ชักนำให้เกิดขึ้นบนพืชทดสอบ พืชทดสอบที่นิยมใช้คือ มะนาว *Citrus aurantifolia* (Mexican lime) Broadbent และคณะ (1996) รายงานการนำพืชทดสอบ 3 ชนิดมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัส คือ นำสวีทออร์เรนจ์มาใช้ในการจำแนกอาการร่องปุ่มในเนื้อไม้ (stem pitting) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่ให้อาการรุนแรง นำยูเรกาเลมอน และดัลแคนเกรฟรุทมาใช้ในการจำแนกอาการต้นกล้าเหลือง (seedling yellow) และนำมะนาวมาใช้ในการจำแนกอาการเส้นใบใส

Ochoa และคณะ (1993) จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัสด้วยพืชทดสอบ โดยทำการปลูกเชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัส 10 ไอโซเลท ด้วยการติดตามพืชทดสอบ 4 ชนิด คือ มะนาว (Mexican lime), ยูรีกาเลมอน (Eureka lemon), ซาร์วอเรนจ์ (sour orange) และ มาชเกรฟรุท (Marsh grapefruit) จากการทดลองพบว่าสามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัสได้ออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มสายพันธุ์ที่แสดงอาการอ่อนมาก (mildest) กลุ่มสายพันธุ์ที่แสดงอาการปานกลางถึงรุนแรง (moderate to severe) และกลุ่มสายพันธุ์ที่แสดงอาการรุนแรงมาก (very severe) ในการประเมินอาการทางใบแบ่งระดับความรุนแรงของอาการออกเป็น 5 ระดับตามความมากน้อยของอาการ ระหว่าง 0 (ไม่แสดงอาการ) ถึง 4 (แสดงอาการรุนแรงมาก) Bekolo และคณะ (2007) จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทรินิตาไวรัส โดยใช้พืชทดสอบในการประเมินระดับความรุนแรงของอาการที่เกิดกับพืชทดสอบ คือ อาการร่องปุ่ม

(stem pitting) ที่ปรากฏบนเนื้อไม้โดยทำการแบ่งพีชทดสอบออกเป็น 8 ส่วน ประเมินอาการ stem pitting 8 กิ่งต่อต้น

Figuroa และคณะ (2009) จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยใช้ลักษณะอาการบนพีชทดสอบ คือ อาการเส้นใบใส, อาการเส้นใบแตก, อาการใบถั่ว, เตี้ยแคระ และอาการลำต้นบวม บนพีชทดสอบ 5 ชนิด คือ มะนาว (Mexican lime), ยูเรกาเลมอน (Eureka lemon), ดัลแคนเกรฟรุท (Duncan grapefruit), พายแอปเปิ้ล สวีทออร์เรนจ์ (pineapple sweet orange) และซาร์วออร์เรนจ์ (sour orange) โดยให้ระดับอาการที่ปรากฏบนพีชทดสอบแต่ละชนิดเริ่มจาก 0 ไม่แสดงอาการ ถึง 5 แสดงอาการรุนแรงมาก แล้วนำผลรวมของทุกอาการที่เกิดกับพีชทดสอบแต่ละชนิดมาสรุปหาระดับความรุนแรงของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่เกิดกับพีชทดสอบแต่ละชนิด

ไมตรี พรหมมินทร์ และคณะ (2529) ได้รวบรวมตัวอย่างเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสตามแหล่งปลูกส้มทั่วไปในประเทศไทย ระหว่างปี 2523-2528 มีทั้งหมด 137 ไอโซเลท มาทดลองโดยวิธีเสียบกิ่งแบบเสียบข้างกับต้นกล้ามะนาวอายุ 2 ปี ซึ่งใช้เป็นพีชทดสอบ จากนั้นจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อโดยดูจากลักษณะอาการที่เชื้อชักนำให้เกิดบนพีชทดสอบมะนาวภายในเวลา 2-8 เดือน จากการทดลองพบว่าสามารถแบ่งอาการออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่ม T1 ต้นกล้ามะนาวแสดงอาการเกือบปกติ ใบมีอาการคล้ายถั่ว และเส้นใบมีขีดประปรังแสงเล็กน้อย กลุ่ม T2 ต้นกล้ามะนาวแสดงอาการผิดปกติ ใบมีอาการบิดงอ, เส้นใบใส กลุ่ม T3 ต้นกล้ามะนาวแสดงอาการแคระแกรนเล็กน้อย ใบแสดงอาการขาดธาตุอาหาร, ใบมีอาการบิดงอ, ขีดประปรังแสงค่อนข้างรุนแรง และกลุ่ม T4 ต้นกล้ามะนาวแสดงอาการแคระแกรน ใบแสดงอาการขาดธาตุอาหาร, ใบมีอาการบิดงอ, ขีดประปรังแสง และเส้นใบแตกรุนแรง

### การจำแนกด้วยวิธีการทางเซรุ่มวิทยา

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) เป็นเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการตรวจหาเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส เนื่องจากให้ผลในการตรวจที่ถูกต้องแม่นยำ และมีความไวสูง (รัตนา สดุดี, 2537 และ Roistacher, 1991) ต่อมา มีการนำ ELISA มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์เชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส

Senan และคณะ (1997) นำเทคนิค ELISA ใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการกำจัดการแพร่ระบาดของโรคทริสเตซา จากการทดสอบเมื่อนำแอนติบอดีต่อเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส 2 ชนิด คือ MCA13 (โมโนโคลนอล

แอนติบอดี) และ 11B1+3E10 (โพลีโคลนอลแอนติบอดี) มาใช้ตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA พบว่าการใช้แอนติบอดี MCA13 สามารถตรวจพบเชื้อ 4/19 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และเมื่อใช้แอนติบอดี 11B1+3E10 สามารถตรวจพบเชื้อสายพันธุ์รุนแรง 7/19 ตัวอย่าง

Nikolaeva และ Karasev (1998) นำวิธีการทางเซรุ่มวิทยา (Serological) มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสโดยใช้เทคนิค I-DAS-ELISA (Indirect Double-Antibody Sandwich (I-DAS) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี และ โมโนโคลนอลแอนติบอดี 3E10 มาใช้ในการตรวจหาเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสในตัวอย่างที่ติดเชื้อจำนวน 76 ไอโซเลท จาก 20 ประเทศ จากการทดลองพบว่าสามารถจำแนกเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสไอโซเลทที่ทำให้เกิดอาการลำต้นมูมิใน สวีทออร์เรนจ์ได้

### การจำแนกด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล

Gillings และคณะ, 1993 นำเทคนิค Restriction fragment length polymorphism (RFLP) มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสโดยการนำรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีนหุ้มอนุภาคไวรัส (Coat protein gene, CP gene) ของเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสมาเพิ่มขยายโดยเทคนิคอาร์ทีพีซีอาร์ แล้วนำผลผลิตอาร์ทีพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf I* จากการทดลองนำรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีนหุ้มอนุภาคไวรัสของเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัส 51 ไอโซเลท มาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ พบว่าสามารถจำแนกออกเป็น 7 กลุ่ม คือแบบแผน RFLP กลุ่มที่ 1, 3 และ 6 อาการรุนแรง (Severe) กลุ่มที่ 2 และ 7 จัดเป็นเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสในกลุ่มที่ให้อาการปานกลาง (Moderate) และกลุ่มที่ 4 และ 5 จัดเป็นเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสในกลุ่มที่ให้อาการอ่อน (Mild)

Barzegar และคณะ, 2005 ใช้เทคนิค RFLP ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสในประเทศอิหร่านและจากต่างประเทศพบว่าแบบแผน RFLP ที่มีความแตกต่างกัน จากการศึกษางบ่งชี้ว่าสายพันธุ์ของเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสที่มาจากพื้นที่ที่มีความแตกต่างทางภูมิศาสตร์จะมีคุณสมบัติทางชีววิทยาและพันธุกรรมที่แตกต่างกัน

Kano และคณะ (2006) นำเทคนิค RFLP มาใช้ในการจำแนกเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสในประเทศญี่ปุ่นที่ติดเชื้อซิทรัสทริสเตซาไวรัสจำนวน 32/40 ไอโซเลท โดยนำ

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้มาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *BstE* II จากการทดลองพบว่า 21 ไอโซเลท พบเฉพาะแบบแผนที่ 2 และอีก 11 ไอโซเลทพบแบบแผนร่วมระหว่างแบบแผนที่ 1 และแบบแผนที่ 2

Zhou และคณะ, 2007 จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสจำนวน 72 ตัวอย่างในประเทศจีน ด้วยเทคนิค RFLP โดยนำผลผลิตอาร์ทีพีซีอาร์ของ *P25* gene มาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf* I พบว่าแบบแผน RFLP ของเปลือกโปรตีน (*P25* gene) สามารถนำมาจำแนกสายพันธุ์เชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่พบในประเทศจีนได้ ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มที่ 1 และ 3 ซึ่งรายงานโดย Gillings และคณะ (1993) และจากแบบแผน RFLP ทำให้พบโรคทริสเตซาที่เกิดขึ้นในประเทศจีนประมาณ 38 เปอร์เซ็นต์ เป็นการติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 สายพันธุ์

Atta และคณะ, 2011 นำรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีนหุ้มอนุภาคไวรัส (*P25* gene) มาวิเคราะห์เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติของเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซาไวรัสจำนวน 85 ไอโซเลท จาก 6 อำเภอ ในจังหวัดปทุมธานี ประเทศปากีสถาน ซึ่งชักนำให้เกิดอาการที่แตกต่างกันด้วยเทคนิค RFLP และใช้เอนไซม์ *Hinf* I พบการติดเชื้อร่วมส่วนใหญ่ในกลุ่มที่ 1, 3 และ 6 ตามรายงานของ Gillings และคณะ (1993)

Ayazpour และคณะ, 2011 จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยเปรียบเทียบระหว่างเทคนิค Bi-Directional Polymerase Chain Reaction (BD-PCR) กับ RFLP พบว่าการใช้เทคนิค BD-PCR ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์อ่อนออกจากสายพันธุ์รุนแรงได้ แต่เทคนิค RFLP เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสามารถแยกสายพันธุ์อ่อนออกจากสายพันธุ์รุนแรงได้ จากการใช้เทคนิค RFLP พบการติดเชื้อร่วมในกลุ่ม 1 และ 4 และการติดเชื้อร่วมในกลุ่ม 6 และ 7 ตามรายงานของ Gillings และคณะ (1993) นอกจากนี้ยังพบกลุ่มใหม่ 2 กลุ่ม จากผลชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในประเทศมาเลเซียเป็นสายพันธุ์ที่แตกต่างจากรายงานของ Gillings และคณะ (1993)

Jiang และคณะ, 2008 จำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสจำนวน 30 ไอโซเลท พบว่า 21 ไอโซเลท ติดเชื้อร่วมในกลุ่ม 2 และ 4 ซึ่งเป็นเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในกลุ่มสายพันธุ์รุนแรง และสายพันธุ์อ่อน ตามลำดับ (Gillings *et al.*, 1993) และพบว่า ไอโซเลท S4 มีการปรากฏของซันดิเอ็นเอที่มีขนาด 298 และ 299 bp ซึ่งเป็นการรายงานเป็นครั้งแรก ผลที่ได้ชี้ให้เห็นการพบพันธุกรรมใหม่ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในประเทศจีน

## คุณสมบัติของซีตรัสทริสเทซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนในการป้องกันเชื้อสายพันธุ์รุนแรง

การควบคุมโรคด้วยวิธี cross protection เป็นการป้องกันการเกิดโรคของพืชที่มีสาเหตุมาจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) โดยใช้เชื้อไวรัสสายพันธุ์อ่อน (mild strain) ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่ามาใช้ในการจัดการโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสในพืชปลูกหลายชนิด (Muller and Rezende, 2004) กลไกการป้องกันและควบคุมโรคไวรัสด้วยวิธี cross protection เป็นการใช้เชื้อไวรัสป้องกันการติดเชื้อซ้ำด้วยไวรัสชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ โดยการปลูกเชื้อไวรัสสายพันธุ์อ่อน ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อพืชอาศัยลงในพืชแล้วเชื้อไวรัสดังกล่าวก็จะไปเพิ่มปริมาณโดยการสร้างเปลือกโปรตีนในเนื้อเยื่อพืชซึ่งมีอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสเป็นเป้าหมายทำให้พืชติดเชื้อสายพันธุ์อ่อน เมื่อปลูกเชื้อซ้ำด้วยเชื้อชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ทำให้เชื้อดังกล่าวไม่สามารถขยายพันธุ์ได้ (Mooney *et al.*, 1994) ซึ่งเทคนิค cross protection ได้นำมาใช้อย่างกว้างขวางในการควบคุมโรคทริสเทซาของพืชตระกูลส้มในออสเตรเลีย บราซิล แอฟริกาใต้ และญี่ปุ่น (Zhou *et al.*, 2002)

คุณสมบัติของเชื้อซีตรัสทริสเทซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนที่จะนำมาใช้ในการป้องกันเชื้อสายพันธุ์รุนแรงจะต้องมีคุณสมบัติทางชีววิทยา (biology) ที่ทำให้เกิดอาการที่ไม่รุนแรง มีการเคลื่อนที่อยู๋ภายในพืชอย่างสม่ำเสมอและสามารถแพร่กระจายไปยังยอดอ่อนของพืชที่แตกออกมาใหม่ได้อย่างรวดเร็ว และในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมที่จะนำมาใช้ในการป้องกัน เพราะเชื้อซีตรัสทริสเทซาไวรัสบางสายพันธุ์เจริญได้ดีในเขตอบอุ่น แต่บางสายพันธุ์ชอบอุณหภูมิต่ำ และควรเลือกสายพันธุ์อ่อนที่มีอัตราการถ่ายทอดหรือแพร่กระจายเชื้อสูงโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน (Mooney *et al.*, 1994)

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเชื้อซีตรัสทริสเทซาไวรัส (CTV) ให้ได้เชื้อสายพันธุ์เดี่ยว โดยใช้แมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*T. citricida*)
2. เพื่อจำแนกเชื้อสายพันธุ์อ่อนโดยประเมินจากอาการที่เชื้อชักนำให้เกิดขึ้นบนพืชทดสอบ
3. เพื่อจำแนกเชื้อสายพันธุ์อ่อนโดยประเมินจากแบบแผนอาร์เอฟแอลพี (RFLP profile) ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีนของเชื้อ
4. เพื่อทดสอบคุณสมบัติในการเพิ่มขยายพันธุ์ในพืชอาศัย และอัตราการถ่ายทอดโดยแมลงพาหะของเชื้อไวรัสสายพันธุ์อ่อน

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

#### 1. วัสดุ อุปกรณ์

##### 1.1 วัสดุปลูก

- กระจกปลูกต้นไม้
- ดินผสม
- ปุ๋ยคอก
- ปุ๋ยออสโมโค้ท

##### 1.2 กรงเลี้ยงแมลง

##### 1.3 สารเคมี

- Absolute Ethanol
- Chloroform
- Ethidium bromide
- Isopropanol
- Isoamyl alcohol
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- CF11 cellulose powder
- Sodium acetate
- สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม TBE Buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ใน

ภาคผนวก)

- สารเคมีในการเตรียม Loading dye (รายละเอียดการเตรียมอยู่ใน

ภาคผนวก)

- สารเคมีสำหรับปฏิกิริยาอาร์ทีพีซีอาร์ (RT-PCR reagent mixture)

Sterile deionized water

Primer จำเพาะต่อยีน P25

Primer จำเพาะต่อยีน P27



Reverse transcriptase (Super script III)

Taq polymerase

Taq polymerase buffer

Magnesium chloride ( $MgCl_2$ )

dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Mineral oil

- สารเคมีสำหรับปฏิกิริยา RFLP (RFLP reagent mix)

Sterile deionized water

10×Buffer B

Bovine serum albumin (BSA)

Enzyme *Hin f I*

- สารเคมีที่ใช้เตรียม Polyacrylamide gel (รายละเอียดการเตรียมอยู่ใน

ภาคผนวก)

- สารเคมีที่ใช้เตรียม Agarose gel (รายละเอียดการเตรียมอยู่ใน

ภาคผนวก)

- สารเคมีที่ใช้เตรียม STE (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)

- สารเคมีที่ใช้เตรียม Phenol

Hydroxyquinoline

Tris-Cl

Mercaptoethanol

- สารเคมีที่ใช้เตรียม Coating buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ใน

ภาคผนวก)

- สารเคมีที่ใช้เตรียม Phosphate buffer saline (PBS) (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)

- สารเคมีที่ใช้เตรียม Washing buffer (PBS-T) (รายละเอียดการเตรียม

อยู่ในภาคผนวก)

- สารเคมีที่ใช้เตรียม Conjugate buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ใน

ภาคผนวก)

- สารเคมีที่ใช้เตรียม Substrate buffer (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)
- สารเคมีที่ใช้เตรียม Reaction stopping solution (รายละเอียดการเตรียมอยู่ในภาคผนวก)

#### 1.4 พืชที่ใช้ในการทดลอง

##### 1.4.1 พืชทดสอบ

พืชทดสอบของเชื้อชิตริสทริสเตซาไวรัสที่ใช้ในงานทดลองประกอบด้วย มะนาว (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) ส้มโอ (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) และเกรฟรุท (*Citrus paradisi* Macfad.) นำเมล็ดพันธุ์ของพืชทดสอบแต่ละชนิดมาเพาะในกระบะเพาะจนได้ต้นกล้าอายุ 2 เดือน แล้วย้ายปลูกในกระถางเป็นต้นเดี่ยวๆ แล้วนำไปเลี้ยงในโรงเรือนตาข่ายป้องกันแมลง ให้น้ำปุ๋ยออสโมโค้ท (15-15-15) ประมาณ 10-15 กรัม ทุกเดือน และให้น้ำอย่างสม่ำเสมอ เมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 4 เดือน หลังจากย้ายปลูกลงในกระถางสามารถนำมาใช้ในการทดลองต่อไป

##### 1.4.2 พืชที่ใช้เลี้ยงแมลงพาหะ

ใช้ต้นกล้าส้มจี๊ด (*Citrus mitis*) ปลอดโรคอายุ 6-12 เดือนซึ่งได้จากการเพาะเมล็ด และย้ายปลูกในกระถางเป็นต้นเดี่ยว และปลูกเลี้ยงในโรงเรือนตาข่ายป้องกันแมลง ซึ่งบำรุงดูแลรักษาเช่นเดียวกับพืชทดสอบ

#### 1.5 พืชติดเชื้อที่ใช้เป็นแหล่งของเชื้อชิตริสทริสเตซาไวรัส

ในการทดลองใช้มะนาว SM4 และ ส้มโอ DAT4-5 ซึ่งติดเชื้อ CTV ในแปลงปลูก โดยมะนาว SM4 ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยการพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย และส้มโอ DAT4-5 จากสวนของนายสำเร็จ กุลคง ตั้งอยู่เลขที่ 65 ม. 15 ต. คลองน้อย ในเขตลุ่มน้ำปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช มะนาว SM4 มีอาการเส้นใบในระดับปานกลางเพียงอย่างเดียว ขณะที่ส้มโอ DAT4-5 มีอาการใบเหลืองกิ่งแห้งจากปลายยอด แคระแกรนและทรุดโทรม

#### 1.6 แมลงที่ใช้ในการทดลอง

จับเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) จากธรรมชาติบริเวณแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ แล้วนำมาเลี้ยงบนต้นกล้าส้มจี๊ด (*C. mitis*) ปลอดโรคซึ่งปลูกจากเมล็ดที่มี

ยอดอ่อน โดยเลี้ยงตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาลที่จับจากธรรมชาติเมื่อได้ตัวอ่อน ระยะที่ 1 รุ่นที่ 1 ย้ายไปเลี้ยงบนต้นกล้าปลอดโรคต้นใหม่ต้นที่ 2 เมื่อได้ตัวอ่อนระยะที่ 1 รุ่นที่ 2 ย้ายไปเลี้ยงบนต้นกล้าปลอดโรคต้นใหม่ต้นที่ 3 จนได้ตัวอ่อนรุ่นที่ 3 ถือเป็นเพลี้ยอ่อนส้มที่ปลอดโรค หลังจากนั้นเลี้ยงเพลี้ยอ่อนบนต้นกล้าส้มจี๊ดเพื่อเพิ่มปริมาณไปเรื่อยๆ ให้ได้จำนวนตัวเต็มวัยตามที่ต้องการ เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

### 1.7 อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (microfuge)
- เครื่อง ELISA Reader
- เครื่อง incubator
- เครื่อง electrophoresis
- เครื่อง power generator
- เครื่อง Gel Document
- ไมโครปิเปตต์
- ครกบด
- Microtube
- Pasture pipette
- Pipettes tip
- Graduate pipette

## 2. เทคนิคที่ใช้ในการทดลอง

### 2.1 เทคนิคการทำบริสุทธิ์ซีตรัสทริสเตซาไวรัส

การทำบริสุทธิ์ทริสเตซาไวรัส ได้ดัดแปลงจาก Bar – Joseph และคณะ (1985) โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำ 40 กรัม ของเปลือกเขียวของลำต้นส้มมาบดในครกที่มีไนโตรเจนเหลว (Liquid N<sub>2</sub>) จนเป็นผงละเอียด แล้วนำผงที่บดได้ไปละลาย (thaw) ใน 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.8 (อัตราส่วนของผงเปลือกต่อบัฟเฟอร์ เป็น 1 กรัม : 5 มิลลิลิตร) จากนั้นบดในครกนาน 5 นาที นำของเหลวที่ได้มากกรองผ่านผ้ากรอง 4 ชั้น และชั้นบนปิดทับด้วยกระดาษ Kimwipe แล้วนำกากที่ค้างอยู่บนผ้ากรองมาละลายใน 0.1 M Tris-HCl ซ้ำอีกครั้ง นำของเหลวที่กรองได้ทั้งสองครั้งรวมกัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บของเหลวที่ผ่านการหมุนเหวี่ยง (Supernatant) มาหมุนเหวี่ยง ที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 8 นาที

ทิ้งตะกอน (pellet) เก็บของเหลวมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 เต็ม 20 มิลลิลิตร ของ 30 เปอร์เซ็นต์ (w/v) Polyethylene glycol (PEG Mw 6000) ซึ่งละลายอยู่ใน 0.6 N NaCl และ 2 มิลลิลิตร ของ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) NaCl ต่อทุก 100 มิลลิลิตร ของเหลวที่กรองได้ กวนให้ส่วนผสมเข้ากัน ปั่นไว้ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-60 นาที หมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 45 นาที (ใช้ Beckman UC rotor 50.2 Ti ที่ 14,500 รอบต่อนาที 15 นาที) เก็บตะกอนแล้วนำมาละลาย (resuspend) ใน 0.04 M sodium phosphate buffer pH 8.2 ปริมาตร 8 หรือ 25 มิลลิลิตร คนให้ละลายอย่างเบาๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นค้างคืน (4 องศาเซลเซียส) นำ suspension มาหมุนเหวี่ยงที่ 5,700 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส (angle head , Cool Spin Centrifuge) เก็บของเหลวซึ่งถือเป็น partially purified viral extract เต็ม PEG 6000 และ NaCl ให้มีความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (0.08 กรัม PEG กับ 200 ไมโครลิตร 20 เปอร์เซ็นต์ NaCl เมื่อใช้ supernatant 2 มิลลิลิตร) คนที่ 4 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที นาน 45 นาที เก็บตะกอนมาละลายด้วย 0.015 M Sodium phosphate pH 8.2 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร คนประมาณ 15 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บของเหลวไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 280 และ 260 นาโนเมตร

## 2.2 เทคนิคการสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ (double stranded RNA)

การสกัดอาร์เอ็นเอสายคู่ดัดแปลงจาก Dodd (1993) โดยมีขั้นตอนดังนี้ บดเปลือกที่ลอกจากกิ่งของส้มหนัก 5 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวจนละเอียดเป็นผง เต็มบัพเฟอร์ (STE 20 มิลลิลิตร, Phenol 10 มิลลิลิตร, Chloroform 10 มิลลิลิตร และ SDS 5 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วคนให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนผสมมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บของเหลว ทิ้งตะกอน เต็ม Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ จนได้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 16.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นใส่ CF 11หนัก 2.5 กรัม นำไปคนนาน 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำส่วนผสมบรรจุลงในกระบอกฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที จนกระทั่ง CF 11 ตกลงมาและจับตัวเป็นคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยบัพเฟอร์ (STE ที่มีส่วนผสมของแอลกอฮอล์ 16.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ชะเอา ds RNA ซึ่งจับอยู่บนเม็ด CF 11 ด้วยบัพเฟอร์ (STE) ที่ปราศจากแอลกอฮอล์ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เก็บบัพเฟอร์ที่ใช้ชะ ds RNA ออกจาก CF11 คราวละ 5 มิลลิลิตร 3 ครั้ง จากนั้นนำบัพเฟอร์ที่เก็บได้แต่ละครั้งไปอ่านค่าดูดกลืน

แสงที่คลื่นแสง 254 นาโนเมตร (OD 254) เพื่อตรวจหา ds RNA นำบัฟเฟอร์ที่ตรวจพบ ds RNA (10 มิลลิลิตร) ไปตกตะกอนด้วย Ethyl alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ (25 มิลลิลิตร) และ Sodium acetate เข้มข้น 3 M pH 5.5 (1.75 มิลลิลิตร) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที เก็บตะกอนของ ds RNA เทของเหลวทิ้ง ล้าง ds RNA ด้วย Ethyl alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมแอลกอฮอล์ 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดแล้วหมุนเหวี่ยง 5 นาที ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที เทแอลกอฮอล์ทิ้ง แล้วนำ ds RNA ที่ได้ไปทำให้แห้งในโถแห้ง (dessicator) ทำการดูดความชื้นออกในสภาพสุญญากาศนาน 15-20 นาที ละลาย ds RNA ด้วยน้ำ (sterile deionized water) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 2.3 การเพิ่มขยายรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25gene) ของเชื้อซีตรัสทริสเต

ซาไวรัส ด้วยเทคนิค RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

นำอาร์เอ็นเอสายคู่ที่สกัดได้มาเป็นแม่พิมพ์ในการเพิ่มขยาย P25 gene โดยเทคนิค RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) โดยใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ P25 gene (forward 5'- ATGGACGACGAAACAAAGAAATTG- 3' และ (reverse 5'-CATCAACGTGTGTTGAATTTCCCA-3') ตามขั้นตอนที่ดัดแปลงจาก van der Vyver และคณะ (2002) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เติม ds RNA ซึ่งสกัดได้จากตัวอย่างโรคปริมาตร 2 ไมโครลิตร ลงในส่วนผสมของไพรเมอร์ (P25 gene) 0.4 ไมโครโมล ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และน้ำ (sterile deionized water) 1 ไมโครลิตร บ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกสาย RNA (denature) ครอบเวลาแช่ส่วนผสมในน้ำแข็งนาน 5 นาที จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำส่วนผสมของ RNA และไพรเมอร์ผสมเข้ากับส่วนผสมปฏิกิริยาพีซีอาร์ (PCR reaction mixture) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร รวมเป็นปริมาตรทั้งสิ้น 25 ไมโครลิตร นำส่วนผสมดังกล่าวเข้าเครื่อง PCR thermal cycler ซึ่งมีอุณหภูมิรอบ ดังนี้

Reverse transcription step		50°C	30 min.
Amplification	1 cycle	94°C	2 min.
		50°C	40 sec.
		68°C	1 min.
	35 cycle	95°C	30 sec.
		50°C	40 sec.

	68°C	1 min.
1 cycle	94°C	30 sec.
	50°C	40 min.
	68°C	5 min.

ตรวจหาผลผลิตดีเอ็นเอของสารพันธุกรรม P25 ซึ่งได้จากปฏิกิริยาอาร์ทีพีซีอาร์โดยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิสในเจล (Agarose gel) 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ Agarose 0.45 กรัม ละลายใน 0.5 เท่า TBE buffer ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วหลอมละลายด้วยความร้อนโดยใช้เตาไมโครเวฟ (microwave) นานประมาณ 2 นาที โดยใช้ความร้อนในระดับสูง หลังจากนั้นเติม ethidium bromide ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เทลงในภาตเจลที่ประกอบแล้ว ตั้งทิ้งไว้ 45 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว นำเจลใส่เครื่อง Electrophoresis เติม 0.5 เท่า TBE buffer ปริมาตร 300 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผสมผลผลิตดีเอ็นเอ (RT-PCR product) 5 ไมโครลิตร เข้ากับบัฟเฟอร์ (loading buffer) 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง นานประมาณ 5 วินาที จากนั้นนำมาหยอดลงในเจล ตามลำดับ โดยช่องแรกของเจลจะได้ 1 kb DNA Ladder (Gibco BRL) เป็นตัวเทียบขนาดมาตรฐาน ทำการ run gel โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 90 โวลต์ ในการผลักดันให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ เป็นเวลานาน 45 นาที หลังจากนั้นตรวจดูผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Transilluminator โดยใช้คลื่นแสง 300 นาโนเมตร แล้วถ่ายภาพการเรืองแสงของผลผลิตดีเอ็นเอ

#### 2.4 การตัดรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25 ด้วยเอนไซม์จำเพาะ

นำผลผลิตอาร์ทีพีซีอาร์ คือดีเอ็นเอของรหัสพันธุกรรม P25 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf I* (Promega, USA) โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำดีเอ็นเอที่ถูกตัดไปตรวจด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจล (ultra pure agarose) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วย้อมด้วย ethidium bromide เข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วตรวจดูแบบแผนอาร์เอฟแอลพีที่ได้จากการตัดด้วยเครื่อง Transilluminator โดยใช้คลื่นแสง 300 นาโนเมตร และถ่ายภาพแบบแผนอาร์เอฟแอลพีของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ด้วยเครื่อง Gel Documentation

## 2.5 การตรวจหาเชื้อ CTV โดยเทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

การตรวจหาเชื้อ CTV ด้วยเทคนิค ELISA ได้ดัดแปลงจาก Roistacher (1991) มีขั้นตอนดังนี้ นำเส้นกลางใบของพืชทดสอบ พืชปกติ (healthy control) และพืชที่เป็นโรคทริสเตซา (positive control) มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาบดใน coating buffer ในอัตราเนื้อเยื่อพืช : บัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:10 จนได้น้ำคั้น (sap extract) นำน้ำคั้นที่ได้บรรจุใส่หลอดแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง microfuge ที่ความเร็วรอบ 7,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นดูดของเหลวส่วนบนใส่ในไมโครไตเตอร์เพลต (microtiterplate) ตัวอย่างละ 2 หลุมๆ ละ 200 ไมโครลิตร ใช้พาราฟิล์มปิดด้านบนของไมโครเพลต แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน เมื่อครบกำหนดเวลาเทน้ำคั้นทิ้งแล้วล้างด้วย washing buffer (PBS-T) 5 ครั้ง โดยแช่ทิ้งไว้ครั้งละ 3 นาที จากนั้นใส่ Blocking solution (bovine serum albumin, BSA) เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ หลุมละ 200 ไมโครลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทของเหลวทิ้งแล้วล้างด้วย washing buffer 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที จากนั้นใส่แอนติเซรัมของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่เจือจางด้วย conjugate buffer ที่มีความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทของเหลวทิ้งแล้วล้างด้วย washing buffer 5 ครั้งๆ ละ 3 นาที จากนั้นใส่แอนติบอดี GAR-AP (goat antirabbit conjugate with alkaline phosphatase, Sigma-Aldrich Pte Ltd.) ที่เจือจางด้วย conjugate buffer ในอัตรา 1:4,000 หลุมละ 200 ไมโครลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเทของเหลวทิ้งแล้วล้างด้วย washing buffer ครั้งๆ ละ 3 นาที จากนั้นใส่ substrate (p-nitrophenyl phosphate) ที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางด้วย substrate buffer หลุมละ 200 ไมโครลิตร ปิดด้วยพาราฟิล์ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 3 โมลาร์ ซึ่งเป็นตัวหยุดปฏิกิริยาแอนติบอดี (stopping reagent) หลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปอ่านค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร (OD 405) ด้วยเครื่อง ELISA Reader การตรวจเชื้อในแต่ละตัวอย่างทำ 2 ซ้ำ และมีมะนาวปกติ (healthy control) และมะนาวติดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส (positive control) เป็นชุดควบคุม

### 3. วิธีการดำเนินการ

#### 3.1 การแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน

นำแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน *T. citricida* ที่เลี้ยงจนเป็นโคลนีปลอดเชื้อไวรัส (virus-free aphid) (ภาพที่ 2) โดยใช้จำนวนแมลงให้มากเกินพอที่จะใช้ในการถ่ายทอดประมาณ 2 เท่า แล้วนำแมลงไปปล่อยให้ดูดกินมะนาว SM4 และส้มโอ DAT4-5 ที่ติดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในแปลงปลูก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3) จากนั้นย้ายแมลงไปดูดกินพืชทดสอบมะนาวปลอดเชื้อที่ได้จากการเพาะเมล็ดแล้วนำถุงพลาสติกใสมาครอบพืชทดสอบแต่ละต้นเพื่อไม่ให้เกิดการเคลื่อนย้ายของเพลี้ยอ่อนไปยังพืชทดสอบต้นอื่นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อถ่ายเชื้อ (ภาพที่ 4) เมื่อครบ 24 ชั่วโมงฉีดพ่นสารเคมีทำลายเพลี้ยอ่อน (คาราเต้ อัตรา 0.75 ซีซี. ต่อน้ำ 0.5 ลิตร) ในการทดลองใช้ตัวเต็มวัยของเพลี้ยอ่อน 1 ตัวต่อต้นพืชทดสอบมะนาวปกติ (single aphid transmission) โดยทำ 20 ซ้ำต่อไอโซเลทของเชื้อ ตรวจหาเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค ELISA ในพืชทดสอบมะนาว 8 สัปดาห์ ภายหลังจากการแยกเชื้อโดยแมลง ตามวิธีการของ Roistacher (1991) โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยการพัฒนาวีธีการทางเขตร่วมวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย และประเมินความรุนแรงของอาการบนพืชทดสอบที่ติดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยการติดตามลักษณะอาการ และวัดความสูงของลำต้นบนพืชทดสอบภายหลังจากการปลูกเชื้อทุกเดือนเป็นเวลา 12 เดือน





ภาพที่ 2 ตัวเต็มวัยของแมลง *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) จับจากต้นส้มตามธรรมชาติแล้วนำมาเลี้ยงบนต้นกล้วยส้มจี๊ด (*Citrus mitis*) ปลอดโรคซึ่งปลูกจากเมล็ด



ภาพที่ 3 แมลงพาหะ *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) ดูดกินมะนาว SM4 ติดเชื้อ CTV ในแปลงปลูก (ลูกศร) เพื่อรับเชื้อ CTV



ภาพที่ 4 แมลงพาหะ *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) ดูดกินพืชทดสอบมะนาว เพื่อถ่ายเชื้อ CTV  
 ก. แมลงพาหะหนึ่งตัวต่อพืชทดสอบ (ลูกศร)  
 ข. แมลงพาหะดูดกินพืชทดสอบเพื่อถ่ายเชื้อ 24 ชั่วโมง ในกรงเลี้ยงแมลง

### 3.2 การจำแนกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนโดยใช้ลักษณะ

#### อาการบนพืชทดสอบ

นำเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้โดยแมลงพาหะมาจำแนกสายพันธุ์ โดยการปลูกเชื้อลงในต้นกล้าของพืชทดสอบ 3 ชนิด คือ มะนาว (*C. aurantifolia*) ส้มโอ (*C. grandis* (L.) Osbeck) และเกรฟรุท (*C. paradisi*) โดยวิธี Leaf grafting (Roistacher, 1991) (ภาพที่ 5) โดยการนำที่เจาะกระดาษมาเจาะใบพืชต้นสอบต้นที่รับเชื้อให้มีเส้นกลางใบอยู่ตรงกลางเพื่อเอาเนื้อเยื่อที่เจาะทิ้งแล้วนำเทปกาวใสมาปิดทับบริเวณด้านล่างของใบรับเชื้อ จากนั้นเจาะต้นที่ให้เชื้อให้มีเส้นกลางใบอยู่ตรงกลาง จากนั้นนำเนื้อเยื่อจากต้นที่ให้เชื้อไปทาบบนใบที่รับเชื้อโดยให้เส้นกลางใบเชื่อมติดกัน แล้วใช้เทปกาวใสปิดทับบริเวณด้านบน ทำการปลูกเชื้อ 5 ใบต่อต้น และทำซ้ำ 4 ต้นต่อชนิดพืชทดสอบ และมีต้นกล้าของพืชทดสอบที่ไม่รับการปลูกเชื้อแต่ละชนิดๆ ละ 4 ต้น เป็นชุดควบคุม ตรวจสอบเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค ELISA ภายหลังจากการปลูกเชื้อ 2 และ 6 เดือน ติดตามลักษณะอาการบนพืชทดสอบภายหลังการปลูกเชื้อทุกเดือนเป็นเวลา 12 เดือน วัดความสูงของลำต้นของพืชทดสอบที่ได้รับการปลูกเชื้อ โดยวัดจากระดับ 5 เซนติเมตรเหนือผิวดินถึงปลายยอดสุดของลำต้นหลัก ทำการวัดความสูงทุกเดือนภายหลังการปลูกเชื้อเป็นเวลา 12 เดือน แล้วนำลักษณะอาการและการเจริญเติบโตทางด้านความสูงของพืชทดสอบที่ติดเชื้อแต่ละไอโซเลทมาใช้จำแนกสายพันธุ์



ภาพที่ 5 การปลูกเชื้อ CTV ลงในพืชทดสอบ โดยใช้เทคนิค leaf grafting

โดยการประเมินอาการทางใบซึ่งประกอบด้วยอาการเส้นใบใส (Vein clearing), อาการเส้นใบแตก (Vein corking) และอาการใบถ้วย (Leaf cupping) โดยการสุ่มใบของพืชทดสอบเอาใบเพศลาตใบที่ 4-7 โดยนับจากปลายยอด จำนวน 4 ใบต่อดัน นับจำนวนขีดใสที่ปรากฏบนใบทั้ง 4 ใบ แล้วให้ระดับความรุนแรงของอาการ 6 ระดับ ตามอาการที่ปรากฏ (Figuerola *et al.*, 2009) ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การให้คะแนนระดับความรุนแรงของอาการทางใบ

ระดับ	อาการ	คะแนน
0	ไม่พบอาการ (no reaction)	0
1	พบอาการน้อยมาก (very mild) พบขีดใส 1-20 ขีด	1
2	พบอาการน้อย (mild) พบขีดใส 21-40 ขีด	2
3	พบอาการปานกลาง (moderate) พบขีดใส 41-60 ขีด	3
4	พบอาการรุนแรง (severe) พบขีดใส 61-80 ขีด	4
5	พบอาการรุนแรงมาก (very severe) พบขีดใส 81 ขีดขึ้นไป	5

การประเมินอาการทางลำต้นอาการลำต้นนูน (Stem Pitting) ประเมินจาก จำนวนร่อง (Pit) ที่ปรากฏบนกิ่งที่มีความยาว 5 เซนติเมตร โดยสุ่มเก็บมา 4 กิ่ง รอบทรงพุ่มจากนั้นแบ่งระดับ ความรุนแรงของอาการออกเป็น 6 ระดับ ตามจำนวนร่องที่ปรากฏบนกิ่ง (Corazza-Nunes *et al.*, 2006) ดังแสดงในตารางที่ 2

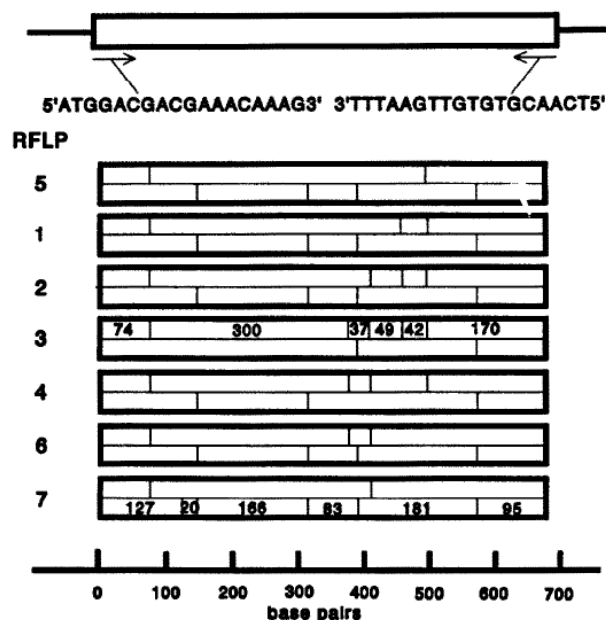
ตารางที่ 2 การให้คะแนนระดับความรุนแรงของอาการทางลำต้น

ระดับ	อาการ	คะแนน
0	ไม่พบร่องนูน (no reaction)	0
1	พบร่องนูน 1-15 ร่อง	1
2	พบร่องนูน 16-30 ร่อง	2
3	พบร่องนูน 31-50 ร่อง	3
4	พบร่องนูน 51-80 ร่อง	4
5	พบร่องนูนทั่วทั้งกิ่ง	5

จากนั้นรวมระดับความรุนแรงของอาการทุกประเภทในพืชทดสอบแต่ละชนิด ประเมินผลโดยรวมของระดับความรุนแรงของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ผลรวมของระดับความรุนแรงที่ต่ำกว่า 20 คะแนนจัดเป็นสายพันธุ์อ่อน (Figueroa *et al.*, 2009)

### 3.3 การจำแนกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนด้วยแบบแผนอาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25

วิเคราะห์แบบแผน RFLP โดยนำแบบแผน RFLP ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้จำนวน 7 ไอโซเลท แบ่งเป็นไอโซเลทที่แยกโดยแมลงพาหะซึ่งเป็นผลของการทดลองในข้อ 1 จำนวน 3 ไอโซเลท โดยวิธี leaf grafting 3 ไอโซเลท ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยการพัฒนาวีธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย และเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่ปรากฏในมะนาวเป็นโรคทริสเตซาในแปลงปลูก (SM4) 1 สายเชื้อ มาจำแนกสายพันธุ์โดยเปรียบเทียบกับแบบแผน RFLP ที่รายงานโดย Gillings และคณะ (1993) ดังแสดงไว้ในภาพที่ 6 ดังนี้ คือแบบแผน RFLP ของกลุ่มที่ 1, 3 และ 6 เป็นแบบแผนของสายพันธุ์ severe (T36, T3, Bla) กลุ่มที่ 2 และ 7 เป็นแบบแผนของสายพันธุ์ moderate (PB14, B6) และกลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นแบบแผนของสายพันธุ์ mild (T4, PB5)



ภาพที่ 6 แสดงแบบแผน RFLP ที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25 ด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf* I ของเชื้อ CTV สายพันธุ์ต่างประเทศ รายงานโดย Gillings และคณะ (1993)

### 3.4 การทดสอบคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อน

#### 3.4.1 คุณสมบัติในการแพร่กระจายโดยแมลงพาหะ

ทำการทดลองถ่ายทอดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนที่จำแนกได้จากข้อ 9.2 และ 9.3 โดยนำแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน *T. citricida* ที่เลี้ยงจนเป็นโคโลนีปลอดเชื้อไวรัส (virus-free aphid) ไปดูดกินต้นมะนาวที่ติดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนดังกล่าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแมลงไปดูดกินพืชทดสอบมะนาวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วฉีดพ่นสารเคมีทำลายเพลี้ยอ่อน ในการทดลองใช้เพลี้ยอ่อน 1 ตัวต่อต้น (single aphid transmission) โดยทำ 20 ซ้ำต่อสายพันธุ์ของเชื้อ โดยมีชุดควบคุมเป็นพืชทดสอบที่ถูกดูดกินด้วยแมลงพาหะปลอดเชื้อไวรัส ตรวจสอบเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิค ELISA ในพืชทดสอบ 8 สัปดาห์ หลังการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลง ประเมินประสิทธิภาพในการถ่ายทอดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนจากอัตราการถ่ายทอดเชื้อ (Broadbent *et al.*, 1996)

$$\text{อัตราการถ่ายทอดเชื้อ} = \frac{\text{จำนวนพืชที่ติดเชื้อ}}{\text{จำนวนพืชทั้งหมดที่ถูกดูดกินโดยแมลงพาหะ}} \times 100$$

#### 3.4.2 คุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในพืชทดสอบ

แยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสให้บริสุทธิ์ (Purification) จากเปลือกเขียว (bark) ของมะนาวที่ติดเชื้อไอโซเลท SM4 โดยวิธีการของ Bar-Joseph และคณะ (1985) โดยใช้เนื้อเยื่อ 10 กรัม นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไปอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ 280 และ 260 นาโนเมตร แล้วนำค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณหาความเข้มข้นของไวรัสบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ (Bar-Joseph *et al.*, 1985) จากนั้นเจือจางไวรัสบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำเชื้อบริสุทธิ์ในแต่ละความเข้มข้นไปตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค ELISA นำค่า OD 405 ที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส

ทำการตรวจหาปริมาณความเข้มข้นของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนที่จำแนกได้จากข้อ 9.2 และ 9.3 ในน้ำคั้นจากเนื้อเยื่อของพืชทดสอบมะนาวโดยเทคนิค ELISA ใช้เนื้อเยื่อ (bark) ที่ติดเชื้อจากยอดที่แตกใหม่อายุ 1 เดือน จำนวน 3 ยอดต่อต้นมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำมาบดใน coating buffer ในอัตรา เนื้อเยื่อพืช : บัฟเฟอร์ เท่ากับ 1 : 10

จนได้น้ำคั้น (sap extract) โดยตรวจ 3 ต้นต่อสายพันธุ์เชื้อ จากนั้นนำค่าปฏิกิริยา ELISA ของเชื้อ (OD 405) ไปเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน เพื่อประเมินความสามารถในการเพิ่มขยายปริมาณของเชื้อในเนื้อเยื่อของพืชทดสอบจากค่าความเข้มข้นของไวรัสที่ตรวจวัดได้จากปฏิกิริยา ELISA



### บทที่ 3

#### ผลการศึกษา

##### 1. การแยกเชื้อชิตริสทริสเตซาไวรัสโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน

ผลการแยกเชื้อชิตริสทริสเตซาไวรัสโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล พบว่าพืชทดสอบ ซึ่งรับการถ่ายเชื้อจากแมลงโดยมีแหล่งเชื้อจากมะนาว SM4 และส้มโอ DAT4-5 ติดเชื้อชิตริสทริสเตซาไวรัสจำนวน 7/20 และ 5/20 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ซึ่งรวมเป็นเชื้อที่แยกได้จำนวน 12 ไอโซเลท โดยให้ชื่อไอโซเลทตามแหล่งเชื้อดังแสดงไว้ในตารางที่ 4 เชื้อชิตริสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้ในครั้งนี้ชักนำให้เกิดอาการบนพืชทดสอบที่มีระดับความรุนแรงแตกต่างกันดังนี้ (ตารางที่ 4) ไอโซเลท SM4-P4, SM4-P5, SM4-P9, SM4-P10 และ DAT4-5-P15 ทำให้เกิดอาการเส้นใบสีเพียงเล็กน้อยถึงปานกลาง (ภาพที่ 7) และทำให้ความสูงเฉลี่ยต่อเดือนของพืชทดสอบลดลง 17-20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับพืชปกติ ขณะที่ไอโซเลท SM4-P15 และ SM4-P19 ให้อาการเส้นใบสีระดับปานกลางถึงรุนแรง ความสูงของพืชทดสอบลดลง 10-20 เปอร์เซ็นต์ และ SM4-P19 ให้อาการลำต้นนุ่มระดับเล็กน้อย กลุ่ม ไอโซเลทที่ให้อาการระดับรุนแรงคือ SM4-P2, DAT4-5-P2, DAT4-5-P5, DAT4-5-P8 และ DAT4-5-P10 ให้อาการเส้นใบสีระดับปานกลางถึงรุนแรง นอกจากนี้พบอาการลำต้นนุ่ม (ภาพที่ 8) และอาการใบเหลืองในพืชทดสอบที่ติดเชื้อไอโซเลท SM4-P2, SM4-P19 และ DAT4-5-P8 ตามลำดับ สำหรับเชื้อชิตริสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้ในกลุ่มนี้ทำให้ความสูงของพืชลดต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของความสูงพืชปกติ (ตารางที่ 4) จากความแตกต่างของลักษณะอาการที่เกิดขึ้นบนพืชทดสอบทำให้ประเมินในเบื้องต้นว่าอาจแยกสายพันธุ์เชื้อชิตริสทริสเตซาไวรัสที่ติดเชื้อร่วมกันออกเป็นสายพันธุ์เดียว และพบว่าไอโซเลท SM4-P4, SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 มีแนวโน้มเป็นเชื้อสายพันธุ์อ่อนเนื่องจากให้อาการเส้นใบสีเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 4 และภาพที่ 7)

ตารางที่ 3 แสดงผลการตรวจพบเชื้อ CTV โดยเทคนิค ELISA ในพืชทดสอบมะนาวซึ่งรับการถ่าย  
เชื้อจากแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*T. citricida*)

แหล่งเชื้อ	ลำดับพืชทดสอบ	ELISA <sup>1/</sup>
		OD405 ( $\bar{x} \pm SD$ )
มะนาว SM4	SM4-1	0.037±0.030
	SM4-2	0.155±0.067
	SM4-3	0.014±0.003
	SM4-4	0.127±0.012
	SM4-5	0.148±0.012
	SM4-6	0.007±0.001
	SM4-7	0.016±0.003
	SM4-8	0.021±0.004
	SM4-9	0.146±0.019
	SM4-10	0.112±0.028
	SM4-11	0.026±0.052
	SM4-12	0.062±0.018
	SM4-13	0.025±0.018
	SM4-14	0.047±0.009
	SM4-15	2.660±0.013
	SM4-16	0.062±0.071
	SM4-17	0.052±0.018
	SM4-18	0.048±0.014
	SM4-19	3.523±0.002
	SM4-20	0.155±0.007
ส้มโอ DAT4-5	DAT4-5-1	0.057±0.011
	DAT4-5-2	4.000±0.000
	DAT4-5-3	0.041±0.006
	DAT4-5-4	0.045±0.003
	DAT4-5-5	3.461±0.032
	DAT4-5-6	0.043±0.205
	DAT4-5-7	0.041±0.019
	DAT4-5-8	3.598±0.006
	DAT4-5-9	0.030±0.016
	DAT4-5-10	1.937±0.024
	DAT4-5-11	0.040±0.000
	DAT4-5-12	0.060±0.011
	DAT4-5-13	0.049±0.035
	DAT4-5-14	0.019±0.014
	DAT4-5-15	2.785±0.141
	DAT4-5-16	0.033±0.012
	DAT4-5-17	0.053±0.018
	DAT4-5-18	0.059±0.040
	DAT4-5-19	0.027±0.008
	DAT4-5-20	0.032±0.021

<sup>1/</sup> ค่า OD405 ( $\bar{x} \pm SD$ ) ของต้นลำมะนาวที่ได้รับการถ่ายเชื้อสูงเป็น 2 เท่าของค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา ELISA จากใบมะนาวปกติ ( $\bar{x} \pm SD = 0.034 \pm 0.011$ ) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริสเทซาไวรัส)

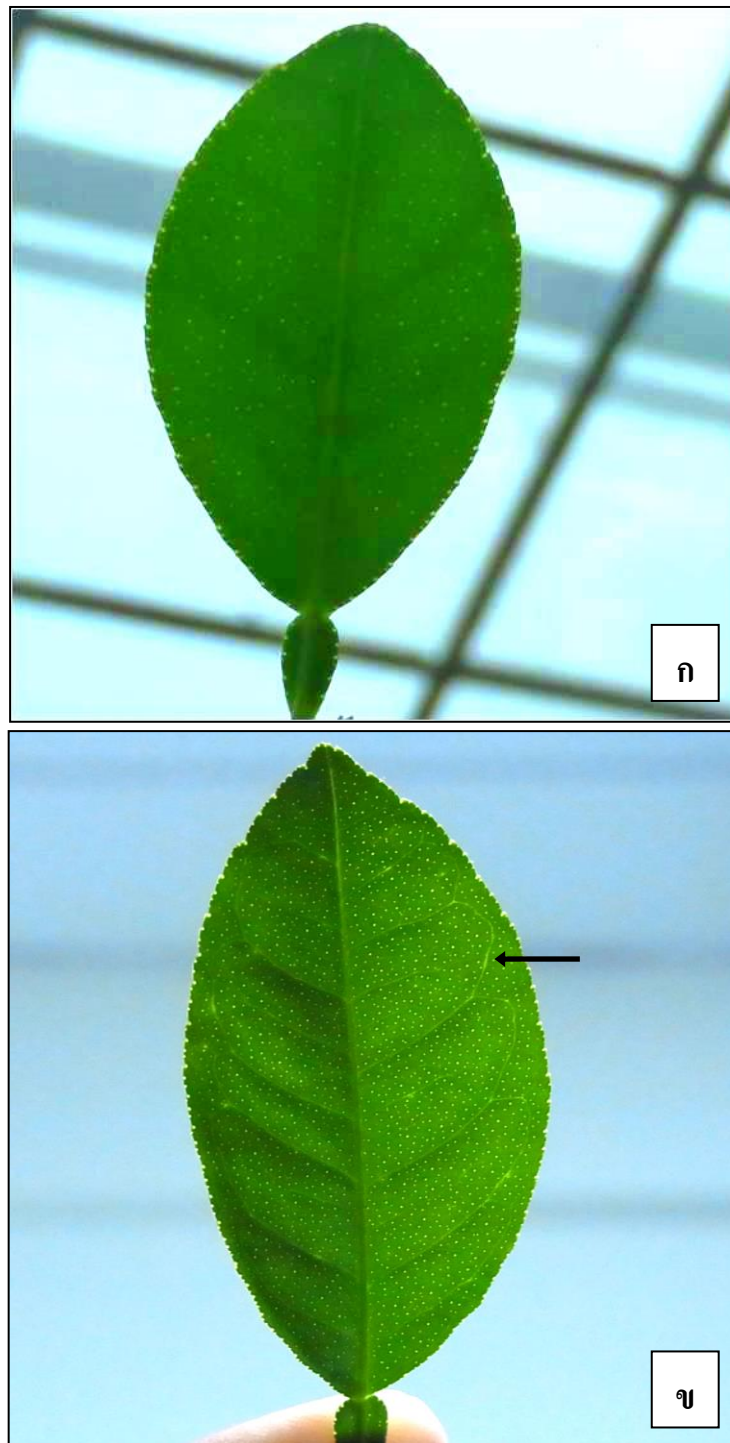
ตารางที่ 4 ลักษณะอาการของพืชทดสอบมะนาวซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ CTV ไอโซเลทที่แยกได้ โดยใช้แมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล

ไอโซเลท	อาการของพืชทดสอบมะนาว <sup>1/</sup>			ความสูงเฉลี่ย/เดือน <sup>2/</sup>	ความสูงลดลง <sup>3/</sup>
	VC	Y	SP	(ซม)	(%)
SM4-P2	3	0	1	1.9	34.5
SM4-P4	1	0	0	2.4	17.2
SM4-P5	1	0	0	2.3	20.7
SM4-P9	1	0	0	2.4	17.2
SM4-P10	2	0	0	2.3	20.7
SM4-P15	3	0	0	2.3	20.7
SM4-P19	2	0	1	2.7	6.9
DAT4-5-P2	3	0	0	1.5	48.3
DAT4-5-P5	3	0	0	1.5	48.3
DAT4-5-P8	2	1	0	1.6	44.8
DAT4-5-P10	2	0	0	1.7	41.4
DAT4-5-P15	2	0	0	2.4	17.2

<sup>1/</sup> คะแนนความรุนแรงของอาการ VC = Vein Clearing 0=ไม่พบอาการ, 1=อาการน้อยมาก (1-20 ซีด), 2=อาการน้อย (21-40 ซีด), 3=ปานกลาง (41-60 ซีด), 4=รุนแรง (61-80 ซีด), 5=รุนแรงมาก (>80 ซีด), Y = Yellow Leaf 0=ไม่พบอาการ, 1=อาการน้อยมาก, SP = Stem Pitting 0=ไม่พบอาการ, 1= พบร่องปุ่ม 1-15 ร่อง

<sup>2/</sup> ความสูงเฉลี่ยพืชทดสอบมะนาวติดเชื้อ CTV เฉลี่ยจาก 6 เดือนหลังการติดเชื้อ

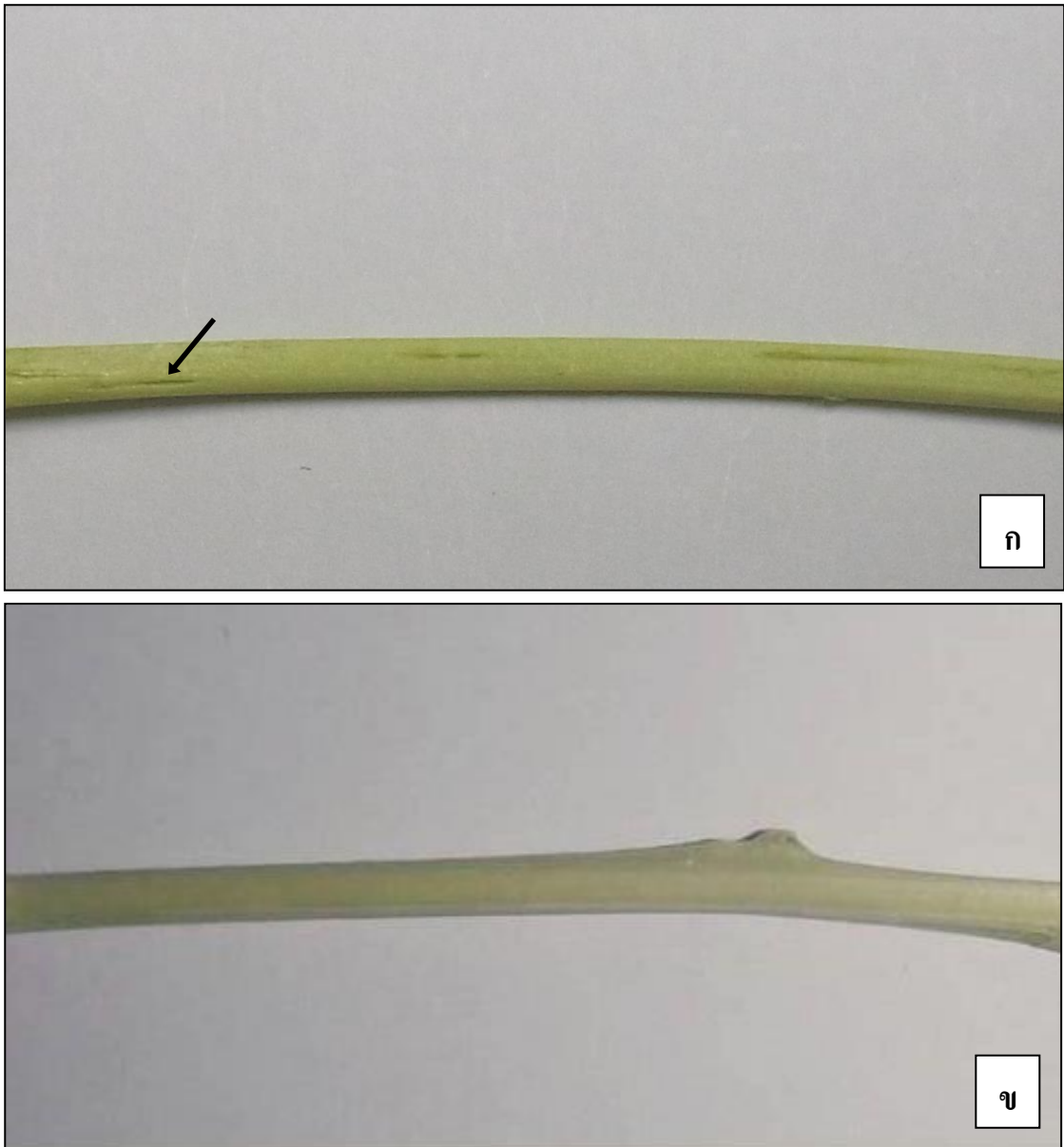
<sup>3/</sup> เปอร์เซ็นความสูงที่ลดลงของพืชทดสอบมะนาวติดเชื้อ CTV เมื่อเปรียบเทียบกับความสูงของมะนาวปกติ (ความสูงเฉลี่ยของมะนาวปกติ 3 ต้น คือ 2.9 ซมต่อเดือน)



ภาพที่ 7 อาการเส้นใบสีขาวบนพืชทดสอบมะนาว

ก) มะนาวปกติ

ข) มะนาวไอโซเลท SM4-P4



ภาพที่ 8 อาการร่องนูนบนพืชทดสอบมะนาว (ลูกศร)

ก. ไอโซเลต SM4-P19

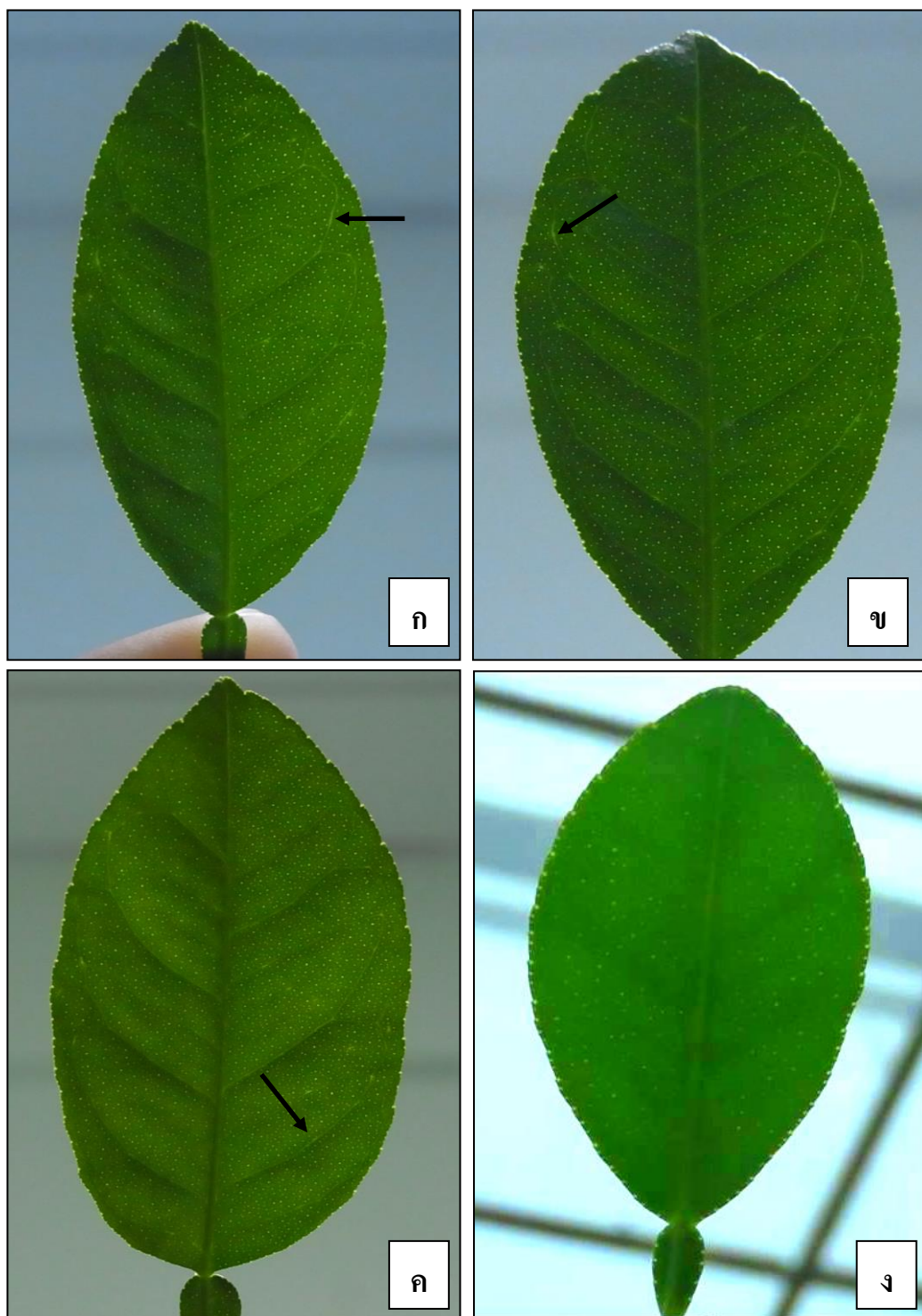
ข. มะนาวปกติ

## 2. การจำแนกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนโดยใช้ลักษณะอาการบนพืชทดสอบ

จากการคัดเลือกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้ในข้อ 1 และมีแนวโน้มเป็นสายพันธุ์อ่อนมาจำนวน 3 ไอโซเลท คือ SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 มาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะอาการที่เชื้อแต่ละไอโซเลทชักนำให้เกิดขึ้นกับพืชทดสอบ 3 ชนิด คือ มะนาว (*C. aurantifolia*) ส้มโอ (*C. grandis*) และเกรฟรุท (*C. paradisi*) ผลประเมินลักษณะอาการทางใบซึ่งประกอบด้วยอาการเส้นใบใส (Vein Clearing, VC), อาการเส้นใบแตก (Corky Vein, CV), อาการใบถ้วย (Cup Leaf, CL) และอาการใบเหลือง (Yellow Leaf, Y) โดยให้ระดับความรุนแรงตามเกณฑ์ของอาการที่ให้ไว้ใน ตารางที่ 1 พบว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลททำให้เกิดอาการเส้นใบใสเพียงเล็กน้อย (ระดับ 1) บนพืชทดสอบมะนาวเท่านั้น (ภาพที่ 8) แต่ไม่ก่อให้เกิดอาการเส้นใบแตก (ภาพที่ 10), ใบถ้วย และใบเหลืองที่พบในไอโซเลท CmO2-1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการวิจัยการพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย (ภาพที่ 10) บนพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด

ในการประเมินอาการทางลำต้น อาการลำต้นนูน (Stem Pitting, SP) โดยนับจำนวนร่อง (Pit) ที่ปรากฏบนกิ่งของพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด พบว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลทไม่ทำให้เกิดอาการลำต้นนูนบนพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 5) และเมื่อวัดความสูงเฉลี่ยที่ลดลงต่อเดือนของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสบนพืชทดสอบมะนาว เกรฟรุท และส้มโอ พบว่าไอโซเลท SM4-P5 ลดลง 46.30 เปอร์เซ็นต์, 33.75 เปอร์เซ็นต์ และ 35.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไอโซเลท SM4-P9 ลดลง 35.93 เปอร์เซ็นต์, 21.67 เปอร์เซ็นต์ และ 33.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไอโซเลท SM4-P10 ลดลง 30.74 เปอร์เซ็นต์, 23.75 เปอร์เซ็นต์ และ 24.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

เมื่อรวมคะแนนระดับความรุนแรงของอาการทุกประเภทในพืชทดสอบแต่ละชนิด ผลรวมของระดับความรุนแรงต่ำกว่า 20 คะแนน (ตารางที่ 5) ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลท คือ SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 เป็นเชื้อสายพันธุ์อ่อน



ภาพที่ 9 อาการเส้นใบไสบนพีชทดสอบมะนาว

ก. ไสยเลข SM4-P5

ข. ไสยเลข SM4-P9

ค. ไชโยเลข SM4-P10

ง. มะนาวปกติ



ภาพที่ 10 ลักษณะอาการเส้นใบแตก (corky vein) และอาการใบเหลือง (yellow) บนพืชทดสอบ มะนาวเมื่อติดเชื้อ CTV ไชโยเลข CmO2-1



ตารางที่ 5 ระดับความรุนแรงของอาการทางใบและอาการทางลำต้นที่เชื้อ CTV ที่แยกได้ชักนำให้  
เกิดบนพืชทดสอบ

ไอโซเลท	พืชทดสอบ	ความรุนแรงของอาการ <sup>1/</sup>					คะแนนรวม	ระดับอาการ <sup>2/</sup>
		VC	CV	CL	Y	SP		
SM4-P5	มะนาว	3	0	0	0	0	3	1
	เกรฟรุท	2	0	0	0	0	2	1
	ส้มโอ	2	0	0	0	0	2	1
SM4-P9	มะนาว	2	0	0	0	0	2	1
	เกรฟรุท	3	0	0	0	0	3	1
	ส้มโอ	2	0	0	0	0	2	1
SM4-P10	มะนาว	1	0	0	0	0	1	1
	เกรฟรุท	2	0	0	0	0	2	1
	ส้มโอ	3	0	0	0	0	3	1

<sup>1/</sup> คะแนนความรุนแรงของอาการ VC = Vein Clearing 0=ไม่พบอาการ, 1=อาการน้อยมาก (1-20 ซีด), 2=อาการน้อย (21-40 ซีด), 3=ปานกลาง (41-60 ซีด), 4=รุนแรง (61-80 ซีด), 5= รุนแรงมาก (>80 ซีด), CV = Corky Vein, CL = Cup Leaf, SP = Stem Pitting คะแนน 0=ไม่พบอาการ

<sup>2/</sup> 1= >20 คะแนน (mild strain), 2= 21-40 คะแนน (moderate strain), 3=<40 คะแนน (severe strain)

ตารางที่ 6 อัตราการเจริญเติบโต (ความสูง) ของพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส สายพันธุ์ที่แยกได้

ไอโซเลท	พืชทดสอบ	ความสูงเฉลี่ยต่อ 1 เดือน (ซม) <sup>1/</sup>	ความสูงลดลง (%) <sup>2/</sup>
SM4-P5	มะนาว	1.45	46.30
SM4-P9	มะนาว	1.73	35.93
SM4-P10	มะนาว	1.87	30.74
SM4-P5	เกรฟรุท	1.59	33.75
SM4-P9	เกรฟรุท	1.88	21.67
SM4- P10	เกรฟรุท	1.83	23.75
SM4-P5	ส้มโอ	1.60	35.48
SM4-P9	ส้มโอ	1.64	33.87
SM4- P10	ส้มโอ	1.88	24.19

<sup>1/</sup> ความสูงเฉลี่ยพืชทดสอบติดเชื้อ CTV เฉลี่ยจาก 6 เดือนหลังการติดเชื้อ

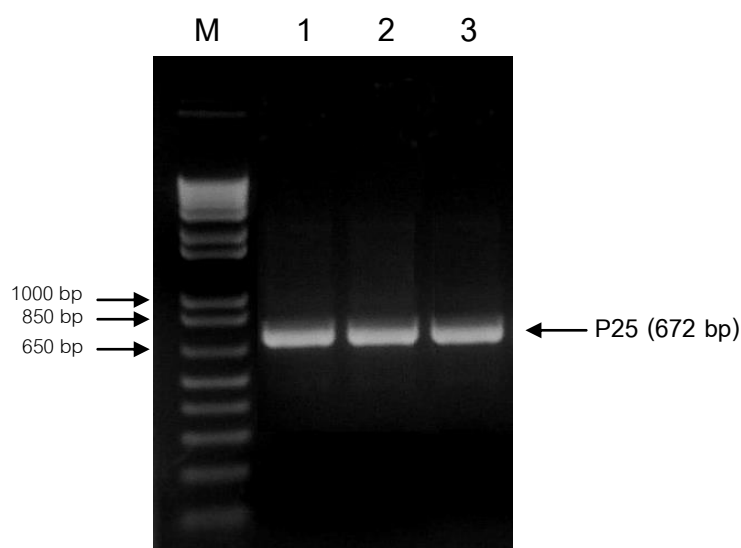
<sup>2/</sup> เปอร์เซ็นต์ความสูงที่ลดลงของพืชทดสอบติดเชื้อ CTV เมื่อเปรียบเทียบกับความสูงของของ มะนาว, เกรฟรุท และส้มโอปกติ จำนวน 4 ต้น คือ 2.70, 2.40 และ 2.48 ซม./เดือน ตามลำดับ

### 3. การจำแนกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนด้วยแบบแผนอาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25

ผลการเพิ่มขยายรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25 ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส โดยใช้ ds RNA (double stranded RNA) ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อส้มติดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสเป็น ำปิมพ์โดย RT-PCR พบผลผลิตดีเอ็นเอขนาด 672 bp (ภาพที่ 11) เมื่อนำผลผลิตดังกล่าวมา ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf* I ได้แบบแผน RFLP ที่แตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 12 และ 13 จำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์มีตั้งแต่ 5 ชิ้น จนถึง 10 ชิ้น และมีขนาด 37, 42, 49, 74, 91, 170, 261, 300, 337 และ 386 bp ดังสรุปไว้ใน ตารางที่ 7

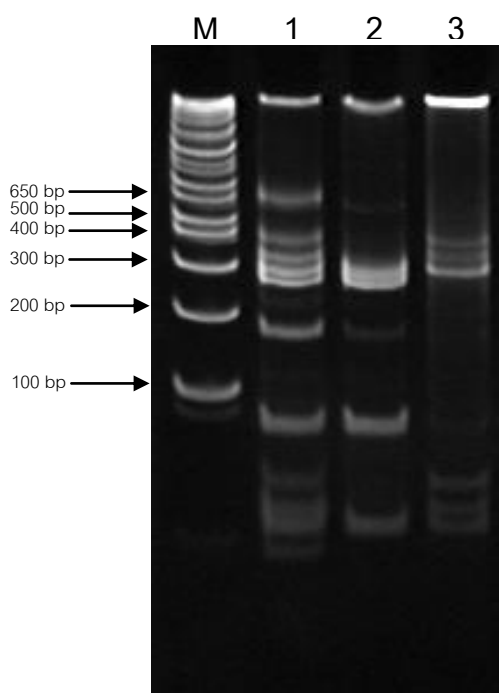
ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส 3 ไอโซเลท ที่แยกได้จาก มะนาว SM4 ติดเชื้อในแปลงปลูกด้วยแมลงพาหะและ ประเมินอาการได้ว่าอยู่ในกลุ่ม อาการอ่อน (mild) คือ SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 โดยใช้แบบแผน RFLP เปรียบเทียบกับแบบแผนของ

RFLP ซึ่งรายงานโดย Gillings และคณะ (1993) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8 พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลตให้แบบแผน RFLP ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 9) คือไอโซเลต SM4-P5 ให้แบบแผน RFLP เหมือนกับเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในมะนาว SM4 คือมีแบบแผนร่วม 6 แบบแผน คือกลุ่มแบบแผนที่ I (รุนแรง), II (ปานกลาง), III (รุนแรง), IV (อ่อน), VI (รุนแรง) และ VII (ปานกลาง) ไอโซเลต SM4-P9 ได้แบบแผนที่ไม่ปรากฏในแบบแผน RFLP ของ Gillings และคณะ (1993) และไอโซเลต SM4-P10 พบแบบแผนร่วม 2 แบบแผน คือแบบแผนที่ I (รุนแรง) และ II (ปานกลาง) นอกจากนี้ได้มีการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสไอโซเลตที่แยกได้โดยวิธี leaf grafting จำนวน 3 ไอโซเลต พบว่าไอโซเลต KS7-3 และ SM1-2 ให้แบบแผนที่เหมือนกัน คือ พบแบบแผนร่วม 2 แบบแผน ระหว่างแบบแผนที่ 2 (ปานกลาง) และ 7 (ปานกลาง) ไอโซเลต SM4-3 มีแบบแผนร่วม 3 แบบแผน คือ แบบแผนที่ I (รุนแรง), II (ปานกลาง) และ VII (ปานกลาง)



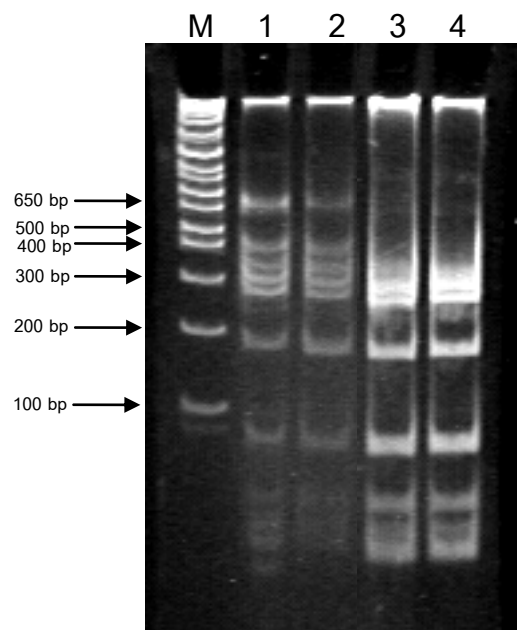
ภาพที่ 11 ผลผลิตดีเอ็นเอของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ของเชื้อ CTV ที่เพิ่มปริมาณโดย RT-PCR และใช้ไพรเมอร์จำเพาะต่อ P25 gene

ช่อง M	ดีเอ็นเอเปรียบเทียบ (ขนาด 1 kb)
ช่อง 1	ไอโซเลต SM4-P5
ช่อง 2	ไอโซเลต SM4-P9
ช่อง 3	ไอโซเลต SM4-P10



ภาพที่ 12 แบบแผน RFLP ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf* I ของเชื้อ CTV ไอโซเลทที่แยกโดยแมลงพาหะ

- ช่อง M ดีเอ็นเอเปรียบเทียบ (ขนาด 1 kb)
- ช่อง 1 ไอโซเลท SM4-P5 ชักนำอาการอ่อน
- ช่อง 2 ไอโซเลท SM4-P9 ชักนำอาการอ่อน
- ช่อง 3 ไอโซเลท SM4-P10 ชักนำอาการอ่อน



ภาพที่ 13 แบบแผน RFLP ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf* I ของเชื้อ CTV สายเชื้อในธรรมชาติ (ช่องที่ 1) และไอโซเลทที่แยกโดยวิธี leaf grafting (ช่องที่ 2-4)

- |        |                                       |
|--------|---------------------------------------|
| ช่อง M | ดีเอ็นเอเปรียบเทียบ (ขนาด 1 kb)       |
| ช่อง 1 | เชื้อ CTV ที่ก่อให้เกิดโรคในมะนาว SM4 |
| ช่อง 2 | ไอโซเลท SM4-3 ชักนำอาการอ่อน          |
| ช่อง 3 | ไอโซเลท KS7-3 ชักนำอาการรุนแรง        |
| ช่อง 4 | ไอโซเลท SM1-2 ชักนำอาการรุนแรง        |

ตารางที่ 7 จำนวนชิ้นและขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ของเชื้อ CTV เมื่อตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf* I

ไอโซเลข <sup>1/</sup>	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SM4 <sup>NI</sup>	10	386	337	300	261	170	91	74	49	42	37
SM4-3 <sup>LG</sup>	9	386	337	300	261	170	91	74	49	42	
SM4-P5 <sup>A</sup>	10	386	337	300	261	170	91	74	49	42	37
SM4-P9 <sup>A</sup>	5	337	261	170	91	42					
SM4-P10 <sup>A</sup>	7	386	337	170	91	74	49	42			
KS7-3 <sup>LG</sup>	7	337	261	170	91	74	49	42			
SM1-2 <sup>LG</sup>	7	337	261	170	91	74	49	42			

<sup>1/</sup> A = ไอโซเลขแยกโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาลจากงานทดลองในข้อ 1

NI = เชื้อซีตรัสทรินเตซาไวรัสที่ปรากฏในต้นส้มที่เป็นโรคในแปลงปลูก (Natural infected CTV)

LG = ไอโซเลขที่แยกโดยวิธี leaf grafting

ตารางที่ 8 แสดงแบบแผน RFLP ที่ได้จากการตัดดีเอ็นเอของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25 ด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf I* ของเชื้อ CTV สายพันธุ์ต่างประเทศ รายงานโดย Gillings และคณะ (1993)

สายพันธุ์ <sup>1/</sup>	ระดับความรุนแรง	แบบแผน RFLP	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ	ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ (bp)					
				1	2	3	4	5	6
T36	Severe	I	4	386	170	74	42		
PB14	Moderate	II	5	337	170	74	49	42	
T3	Severe	III	6	300	170	74	49	42	37
T4	Mild	IV	5	300	170	91	74	37	
PB5	Mild	V	3	428	170	74			
Bla	Severe	VI	4	300	261	74	37		
B6	Moderate	VII	3	337	261	74			

- <sup>1/</sup> T36 สายพันธุ์จากฟลอริดา  
 PB14 สายพันธุ์จากออสเตรเลีย  
 T3 สายพันธุ์จากฟลอริดา  
 T4 สายพันธุ์จากฟลอริดา  
 PB5 สายพันธุ์จากออสเตรเลีย  
 Bla สายพันธุ์จากเกาะรียูเนียน  
 B6 สายพันธุ์จากแคลิฟอร์เนีย

ตารางที่ 9 การจัดกลุ่มแบบแผน RFLP ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน (P25) ของเชื้อ CTV ไอโซเลทซึ่งแยกโดยแมลงพาหะและแยกโดยวิธี leaf grafting เมื่อตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hinf* I

ไอโซเลท <sup>1/</sup>	ระดับอาการ	กลุ่มแบบแผน RFLP <sup>2/</sup>						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
SM4 <sup>NI</sup>	Mild	+	+	+	+	-	+	+
SM4-3 <sup>LG</sup>	Mild	+	+	-	-	-	-	+
SM4-P5 <sup>A</sup>	Mild	+	+	+	+	-	+	+
SM4-P9 <sup>A</sup>	Mild	-	-	-	-	-	-	-
SM4-P10 <sup>A</sup>	Mild	+	+	-	-	-	-	-
KS7-3 <sup>LG</sup>	Severe	-	+	-	-	-	-	+
SM1-2 <sup>LG</sup>	Severe	-	+	-	-	-	-	+

<sup>1/</sup> A = ไอโซเลทแยกโดยแมลงพาหะเพื่อย้อนลึกลับน้ำตาลจากงานทดลองในข้อ 1

NI = เชื้อ CTV ที่ปรากฏในมะนาว SM4 ที่เป็นโรคในแปลงปลูก

LG = ไอโซเลทที่แยกโดยวิธี leaf grafting

<sup>2/</sup> กลุ่มแบบแผน RFLP แยกตามรายงานของ Gillings และคณะ (1993) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 8 ;

+ = พบแบบแผน, - = ไม่พบแบบแผน

#### 4. การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อน

##### 4.1 คุณสมบัติในการแพร่กระจายโดยแมลงพาหะ

จากการนำไอโซเลทของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้และเป็นสายพันธุ์อ่อนคือ ไอโซเลท SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 มาถ่ายเชื้อลงบนต้นกล้ามะนาวโดยแมลงพาหะเพื่อย้อนแล้วตรวจเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในต้นมะนาวที่ได้รับการถ่ายเชื้อ (ตารางที่ 10) เพื่อหาอัตราการถ่ายเชื้อแต่ละไอโซเลทโดยแมลงพาหะ พบว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสไอโซเลท SM4-P5 มีอัตราการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ 75 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไอโซเลท SM4-P9 และไอโซเลท SM4-P10 มีอัตราการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะเท่ากันคือ 70 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11)



ตารางที่ 10 แสดงผลการตรวจพบเชื้อ CTV โดยเทคนิค ELISA ในต้นกล้ามะนาวที่ได้รับการ  
ถ่ายทอดเชื้อ CTV สายพันธุ์อ่อนโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*T. citricida*)

ไอโซเลท	ลำดับพีชทดสอบ	ELISA
		OD405 <sup>1/</sup> ( $\bar{X} \pm SD$ )
SM4-P5	SM4-P5-3	0.254±0.054
	SM4-P5-4	0.244±0.044
	SM4-P5-5	0.275±0.018
	SM4-P5-6	0.678±0.030
	SM4-P5-8	0.249±0.006
	SM4-P5-10	0.613±0.015
	SM4-P5-11	0.422±0.107
	SM4-P5-12	0.274±0.014
	SM4-P5-13	0.292±0.001
	SM4-P5-14	0.214±0.008
	SM4-P5-15	0.932±0.052
	SM4-P5-16	0.557±0.030
	SM4-P5-17	0.177±0.057
	SM4-P5-18	0.781±0.042
	SM4-P5-20	0.238±0.016
	SM4-P9	SM4-P9-2
SM4-P9-3		1.331±0.112
SM4-P9-4		0.203±0.003
SM4-P9-5		0.202±0.007
SM4-P9-6		0.735±0.059
SM4-P9-9		0.596±0.018
SM4-P9-11		0.210±0.014
SM4-P9-12		0.707±0.008
SM4-P9-13		0.200±0.014
SM4-P9-14		0.241±0.003
SM4-P9-15		0.749±0.090
SM4-P9-17		0.237±0.021
SM4-P9-18		0.260±0.017
SM4-P9-20		0.261±0.034
SM4-P10	SM4-P10-1	0.241±0.058
	SM4-P10-3	0.259±0.007
	SM4-P10-5	0.245±0.044
	SM4-P10-6	0.081±0.003
	SM4-P10-7	0.215±0.037
	SM4-P10-8	0.187±0.014
	SM4-P10-10	0.848±0.011
	SM4-P10-12	0.627±0.074
	SM4-P10-13	0.216±0.011
	SM4-P10-15	0.580±0.028
	SM4-P10-16	0.991±0.021
	SM4-P10-17	0.236±0.088
	SM4-P10-19	0.068±0.004
	SM4-P10-20	0.233±0.031

<sup>1/</sup> ค่า OD405( $\bar{X} \pm SD$ )ของต้นกล้ามะนาวที่ได้รับการถ่ายเชื้อสูงเป็น 2 เท่าของค่าดูดกลืนแสงของปฏิกิริยา ELISA จากใบมะนาวปกติ ( $\bar{X} \pm SD=0.022 \pm 0.012$ ) ถือเป็นปฏิกิริยาบวก (ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัส)

ตารางที่ 11 อัตราการถ่ายทอดเชื้อ CTV สายพันธุ์อ่อนโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล  
(*T. citricida*)<sup>1/</sup>

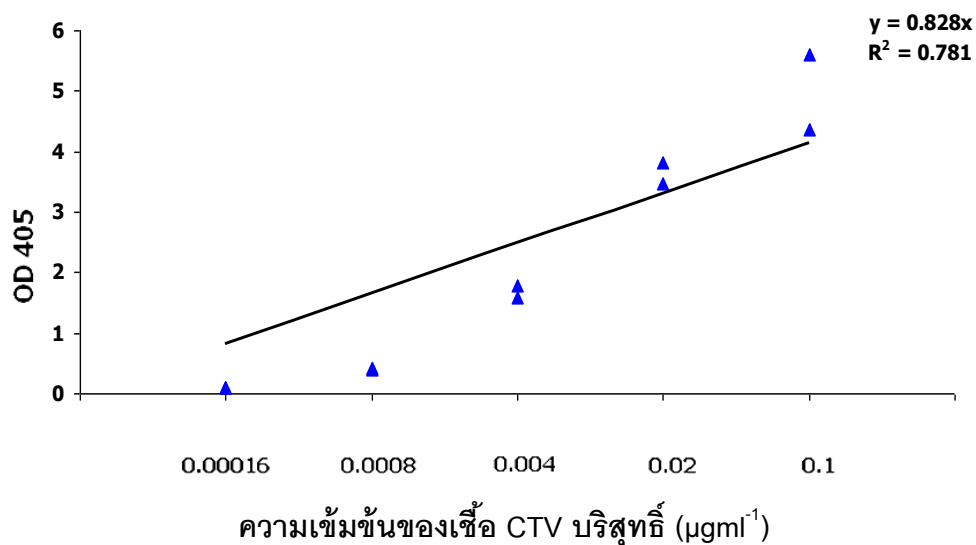
ไอโซเลท	มะนาวติดเชื้อ/มะนาวที่รับการถ่ายเชื้อ <sup>2/</sup>	อัตราการถ่ายทอดเชื้อ (%)
SM4-P5	15/20	75
SM4-P9	14/20	70
SM4-P10	14/20	70

<sup>1/</sup> นำแมลงพาหะไปดูดกินต้นมะนาวซึ่งติดเชื้อแต่ละไอโซเลทนาน 24 ชั่วโมง เพื่อรับเชื้อ ย้ายแมลงพาหะไปดูดกินต้นกล้ามะนาวนาน 24 ชั่วโมงเพื่อถ่ายเชื้อโดยใช้แมลงพาหะถ่ายเชื้อ 1 ตัวต่อต้นกล้ามะนาว ใช้ต้นกล้ามะนาว 20 ต้นต่อการถ่ายเชื้อหนึ่งไอโซเลท

<sup>2/</sup> ตรวจการติดเชื้อของต้นกล้ามะนาวที่รับการถ่ายเชื้อ CTV แต่ละไอโซเลทจากแมลงพาหะโดยเทคนิค ELISA

#### 4.2 คุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณของเชื้อซีตรัสทริสเตชาไวรัสในพืชทดสอบ

จากการทำบริสุทธิ์เชื้อซีตรัสทริสเตชาไวรัสจากต้นมะนาว SM4 นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.00016, 0.0008, 0.004, 0.02 และ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำเชื้อบริสุทธิ์ในแต่ละความเข้มข้นไปตรวจหาเชื้อด้วยเทคนิค ELISA นำค่า OD 405 ที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟความเข้มข้นมาตรฐานของเชื้อซีตรัสทริสเตชาไวรัสดังผลใน ภาพที่ 14



ภาพที่ 14 กราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (standard curve) ของเชื้อ CTV ปริสุทธิ์ (SM4)

เมื่อทำการตรวจหาปริมาณความเข้มข้นของเชื้อซีตรัสทรินสเตชาไวรัสสายพันธุ์อ่อนที่จำแนกได้ คือ SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 ในเนื้อเยื่อของพืชทดสอบมะนาวโดยเทคนิค ELISA ใช้เนื้อเยื่อ (bark) ที่ติดเชื้อหนัก 0.1 กรัม จากยอดที่แตกใหม่อายุ 1 เดือน จำนวน 3 ยอดต่อต้น จากนั้นนำค่าปฏิกิริยา ELISA ของเชื้อ (OD 405) ไปเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน พบว่าไอโซเลท SM4-P5, SM4-P9, SM4-P10 และเชื้อ CTV จากมะนาว SM4 ให้ปฏิกิริยา OD 405 คือ 1.524, 2.211, 1.788 และ 3.729 ตามลำดับ เมื่อนำปฏิกิริยา OD 405 ไปเทียบหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัสจากกราฟความเข้มข้นมาตรฐาน พบว่าไอโซเลท SM4-P5, SM4-P9, SM4-P10 และ SM4 มีความเข้มข้น 0.64, 3.50, 0.81 และ 60.00 ไมโครกรัมของเนื้อเยื่อหนึ่งกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 12) ซึ่งหมายถึงไอโซเลท SM4-P9 ขยายพันธุ์ในเนื้อเยื่อสูงสุดเมื่อเทียบกับไอโซเลท SM4-P5 และ SM4-P10 แต่ต่ำกว่าเชื้อซีตรัสทรินสเตชาไวรัสที่พบในมะนาว SM4 ซึ่งติดเชื้อในแปลงปลูก

ตารางที่ 12 ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ CTV สายพันธุ์อ่อนที่แยกได้ในเนื้อเยื่อพืช

ไอโซเลข	ELISA OD405 ( $\bar{x} \pm SD$ )	ระดับความเข้มข้น ( $\mu\text{gml}^{-1}$ ) <sup>1/</sup>
SM4-P5	1.524 $\pm$ 0.066	0.064
SM4-P9	2.211 $\pm$ 0.068	0.350
SM4-P10	1.778 $\pm$ 0.092	0.081
SM4	3.764 $\pm$ 0.049	6.000

<sup>1/</sup> ความเข้มข้นของเชื้อ CTV ที่ปรากฏในเนื้อเยื่อพืช ซึ่งได้จากการนำค่าปฏิกิริยา ELISA OD405 เทียบหาความเข้มข้นของเชื้อ CTV จากค่ากราฟความเข้มข้นมาตรฐาน (ภาพที่ 14)

## บทที่ 4

### วิจารณ์

#### 1. การแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน

การแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสด้วยเพลี้ยอ่อน (single aphid transmission) ลงบนพืชทดสอบมะนาวสามารถแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสได้ 12 ไอโซเลท โดยแยกมาจากแหล่งของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่ติดเชื้อในแปลงปลูก 2 แหล่ง คือมะนาว (SM4) ซึ่งให้อาการเส้นใบในระดับปานกลางเพียงอย่างเดียว และส้มโอ DAT4-5 ให้อาการใบเหลือง กิ่งแห้ง จากปลายยอด แคระแกรนและทุดโทรม จากการประเมินอาการบนพืชทดสอบมะนาว พบว่าแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสออกมาได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มไอโซเลทที่ให้อาการอ่อน (mild symptom) กลุ่มไอโซเลทที่ให้อาการปานกลาง (moderate symptom) และกลุ่มไอโซเลทที่ให้อาการรุนแรง (severe symptom) เมื่อพิจารณาอาการของมะนาว SM4 และส้มโอ DAT4-5 ซึ่งเป็นแหล่งของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสดังกล่าวแล้วข้างต้นร่วมกับอาการที่ไอโซเลทของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสซึ่งแยกได้จากแหล่งเชื้อทั้งสองชักนำไปเกิดขึ้น บ่งชี้ว่าแหล่งของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสทั้งสองมีการติดเชื้อร่วมมากกว่า 1 สายพันธุ์ เนื่องจากไอโซเลทของไวรัสที่แยกได้ชักนำไปเกิดอาการของโรคที่มีระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 4)

จากความแตกต่างของลักษณะอาการที่เกิดขึ้นบนพืชทดสอบทำให้ประเมินในเบื้องต้นว่าอาจแยกสายพันธุ์เชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่ติดเชื้อร่วมในแหล่งเชื้อ SM4 และแหล่งเชื้อ DAT4-5 ออกจากกันได้

#### 2. การจำแนกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนโดยใช้ลักษณะอาการบนพืชทดสอบ

ผลการประเมินอาการทางใบบนพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด บ่งชี้ว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลท คือ SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 เป็นเชื้อสายพันธุ์อ่อน เนื่องจากเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลทนั้นทำให้เกิดอาการเส้นใบสีเพียงเล็กน้อย (ระดับ 1) บนพืชทดสอบมะนาวเท่านั้น ไม่พบอาการเส้นใบแตก ใบถั่ว และอาการร่องปุ่มบนเนื้อไม้ ดังรายงานของ Ochoa และคณะ (1993) ที่พบว่าไอโซเลทที่จัดอยู่ในกลุ่มสายพันธุ์อ่อนจะเกิดอาการเส้นใบสีเพียงเล็กน้อยบนพืชทดสอบ กลุ่มปานกลาง และกลุ่มรุนแรงแสดงอาการปานกลาง

ถึงรุนแรงของอาการเตี้ยแคระ เส้นใบสี เส้นใบแตก และใบถั่ว บนพืชทดสอบมะนาว อาการเตี้ยแคระ และใบบิดบนมาซเกรฟรุท และรายงานของ Corazza-Nunes และคณะ (2006) ระบุว่า พืชทดสอบมะนาวมีความไวในการก่อให้เกิดอาการเส้นใบสี (vein clearing), ใบม้วน (leaf curling), ต้นเตี้ยแคระ (dwarfism) และร่องปุ่มในเนื้อไม้ (stem pitting)

### 3. การจำแนกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนด้วยแบบแผนอาร์เอฟแอลพี (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism) ของรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25

ในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสด้วยแบบแผน RFLP โดยเปรียบเทียบกับแบบแผน RFLP ที่รายงานโดย Gillings และคณะ (1993) เพื่อยืนยันหรือพิสูจน์สายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสร่วมกับลักษณะอาการที่ชักนำให้เกิดบนพืชทดสอบของไอโซเลทที่แยกโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้ม 3 ไอโซเลท คือ SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 การทดลองครั้งนี้พบว่าไอโซเลท SM4-P5 และ SM4-P10 มีแบบแผน RFLP มากกว่าหนึ่งแบบแผนอยู่ร่วมกัน โดย SM4-P5 มี 6 แบบแผน (ตารางที่ 9) ซึ่งเป็นแบบแผนของเชื้อสายพันธุ์อ่อนสายพันธุ์ปานกลาง และสายพันธุ์รุนแรง (ตารางที่ 9) สรุปคือไอโซเลท SM4-P5 มีสายพันธุ์ไวรัส 6 สายพันธุ์ร่วมกัน สำหรับไอโซเลท SM4-P10 ปรากฏแบบแผน RFLP 2 แบบแผนคือแบบแผนของสายพันธุ์รุนแรงและสายพันธุ์ปานกลาง (ตารางที่ 9) แสดงว่าไอโซเลท SM4-P10 ประกอบด้วยไวรัส 2 สายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าไอโซเลท SM4-P9 มีแบบแผน RFLP ที่ไม่พบในรายงานของ Gillings และคณะ (1993) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้มีความคล้ายคลึงกับงานทดลองของ Zhou และคณะ (2007) ที่พบว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้ในประเทศจีนส่วนใหญ่มีแบบแผน RFLP ร่วมกันมากกว่าหนึ่งแบบแผน และพบแบบแผนที่แตกต่างกันของ Gillings และคณะ (1993) เช่นกัน สำหรับแบบแผน RFLP ที่พบในไอโซเลทของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้โดยวิธี leaf grafting พบแบบแผนร่วมเช่นเดียวกับที่พบในไอโซเลทจากแมลงพาหะ ไอโซเลท SM4-3 พบ 3 แบบแผน ประกอบด้วยแบบแผนของเชื้อสายพันธุ์รุนแรง 1 แบบแผน และของสายพันธุ์ปานกลาง 2 แบบแผน ขณะที่ไอโซเลท KS7-3 และ SM1-2 พบแบบแผน RFLP 2 แบบแผนของสายพันธุ์ปานกลาง

เมื่อจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยใช้ลักษณะอาการบนพืชทดสอบสรุปได้ว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลท คือ SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 เป็นเชื้อสายพันธุ์อ่อน แต่เมื่อจำแนกด้วยแบบแผน RFLP พบว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสมีการติดเชื่อร่วมมากกว่า 1 สายพันธุ์ ดังนั้นการแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน

(single aphid transmission) เพียงรอบเดียวไม่สามารถแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสออกมาเป็นเชื้อสายพันธุ์เดี่ยวๆ ได้ ดังการทดลองของ Broadbent และคณะ (1996) ได้ทำการแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสด้วยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน (single aphid transmission) เพื่อแยกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่ติดเชื้อร่วมในแปลงปลูก แต่จากการทดลองพบว่าการแยกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดอาการต้นกล้าเหลือง (seedling yellow) ไม่สามารถแยกได้ในรอบแรก บางครั้งพบสายพันธุ์นี้ในรอบที่สอง ดังนั้นในการแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนเพื่อให้ได้เชื้อไวรัสสายพันธุ์เดี่ยวต้องทำการแยกเชื้อโดยแมลงพาหะอย่างน้อย 3 รอบ และอีกทั้งในการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสด้วยแบบแผน RFLP ในครั้งนี้ได้ดำเนินการทดลองเพียงครั้งเดียวทำให้แบบแผน RFLP ที่ได้อาจยังขาดความชัดเจน และปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์จำเพาะ *Hinf I* ที่ใช้อาจไม่เพียงพอในการตัดดีเอ็นเอได้ทั้งหมด ดังจะเห็นได้จากในบางไอโซเลท ยังพบการปรากฏของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 672 bp ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเพิ่มขยายรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25 โดย RT-PCR (ภาพที่ 12) อาจสรุปได้ว่าอาการที่เกิดขึ้นบนพืชทดสอบที่เกิดจากการปลูกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสไอโซเลทซึ่งแยกโดยแมลงพาหะและแยกโดย leaf grafting อาจเกิดจากปฏิสัมพันธ์ของสายพันธุ์ซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่อยู่ร่วมกัน ซึ่งเสนอแนะให้มีการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันสมมุติฐานข้อนี้

#### 4. การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อน

##### 4.1 คุณสมบัติในการแพร่กระจายโดยแมลงพาหะ

คุณสมบัติของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนที่จะนำมาใช้ในการป้องกันการติดเชื้อสายพันธุ์รุนแรงจะต้องมีคุณสมบัติทางชีววิทยา (biological characteristics) ที่ทำให้เกิดอาการที่ไม่รุนแรง มีการเคลื่อนที่อยู่ภายในพืชอย่างสม่ำเสมอและสามารถแพร่กระจายไปยังยอดอ่อนของพืชที่แตกออกมาใหม่ได้อย่างรวดเร็ว และควรเลือกสายพันธุ์อ่อนที่มีอัตราการถ่ายทอดหรือแพร่กระจายเชื้อสูงโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน (Mooney *et al.*, 1994) จากการศึกษาคุณสมบัติในการแพร่กระจายโดยแมลงพาหะโดยใช้เพลี้ยอ่อนส้ม (*T. citricida*) โดยใช้แมลงพาหะถ่ายเชื้อลงบนพืชทดสอบมะนาว พบว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนไอโซเลท SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 ถ่ายทอดโดยแมลงพาหะในอัตรา 70-75 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 11) ซึ่งสูงกว่าอัตราการถ่ายทอดที่รายงานโดย Broadbent และคณะ (1996) ซึ่งระบุว่าเพลี้ยอ่อน

ส้ม *T. citricida* มีอัตราการถ่ายทอดเชื้อไอโซเลทที่ให้อาการ stem pitting (อาการรุนแรง) ที่ 36.7 เปอร์เซ็นต์

#### 4.2 คุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณของเชื้อชิตรัสทริสเตซาไวรัสในพืช

##### ทดสอบ

ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อชิตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อน ไอโซเลท SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 ในน้ำคั้นจากพืชทดสอบที่ติดเชื้อ พบว่าไอโซเลท SM4-P9 มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อชิตรัสทริสเตซาไวรัสสูงสุดแต่ต่ำกว่าปริมาณเชื้อชิตรัสทริสเตซาไวรัสในแหล่งเชื้อมะนาว SM4 ทั้งนี้เนื่องจากโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาใช้ในการทดลองผลิตจากสายพันธุ์เชื้อ SM4 และอีกทั้งสายพันธุ์เชื้อ SM4 เป็นสายเชื้อที่มีการติดเชื้อร่วมหลายสายพันธุ์ (รัตนา สดุดี และคณะ, 2552) จึงส่งผลให้มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อชิตรัสทริสเตซาไวรัสที่สูงสุด ส่วนไอโซเลท SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 เป็นไอโซเลทที่แยกมาจากแหล่งเชื้อ SM4 ทำให้มีจำนวนสายพันธุ์ลดน้อยลงทำให้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อชิตรัสทริสเตซาไวรัสที่ลดลงด้วย

ดังนั้นคุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณของเชื้อชิตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนในเนื้อเยื่อพืชที่ดี จะส่งผลต่อประสิทธิภาพที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมป้องกันหรือชะลอการติดเชื้อหรือการแสดงออกของอาการที่มีสาเหตุมาจากเชื้อชิตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์รุนแรง (Powell *et al.*, 1999) ต่อไป



## บทที่ 5

### สรุป

การทดลองครั้งนี้สามารถแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสได้รวมทั้งสิ้น 12 ไอโซเลท โดยแยกได้จากแหล่งเชื้อมะนาว SM4 และส้มโอ DAT4-5 จำนวน 7 และ 5 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยจัดกลุ่มเชื้อที่แยกได้ตามลักษณะอาการที่ชักนำให้เกิดขึ้น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ให้อาการเส้นใบใสรระดับเล็กน้อยถึงปานกลางและทำให้ความสูงเฉลี่ยต่อเดือนของพืชทดสอบลดลง 17-20 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ไอโซเลท SM4-P4, SM4-P5, SM4-P9, SM4-P10 และ DAT4-5-P15 กลุ่มที่ให้อาการเส้นใบใสรระดับปานกลางถึงรุนแรง และทำให้ความสูงเฉลี่ยต่อเดือนของพืชทดสอบลดลง 10-20 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ไอโซเลท SM4-P15 และ SM4-P19 และในไอโซเลท SM4-P19 ยังพบอาการลำต้นบวมระดับเล็กน้อย และกลุ่มที่ให้อาการรุนแรงเนื่องจากให้อาการเส้นใบใสรระดับปานกลางถึงรุนแรง และความสูงเฉลี่ยต่อเดือนของพืชทดสอบต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ ไอโซเลท SM4-P2, DAT4-5-P2, DAT4-5-P5, DAT4-5-P8 และ DAT4-5-P10 นอกจากนี้ยังพบอาการลำต้นบวมและอาการใบเหลืองในพืชทดสอบที่ติดเชื้อไอโซเลท SM4-P2, SM4-P19 และ DAT4-5-P8 ผลการประเมินเบื้องต้นพบว่าไอโซเลท SM4-P4, SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 มีแนวโน้มเป็นเชื้อสายพันธุ์อ่อนเนื่องจากให้อาการเส้นใบใสรเพียงเล็กน้อย

จากการคัดเลือกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสไอโซเลทที่มีแนวโน้มเป็นสายพันธุ์อ่อน มาจำนวน 3 ไอโซเลท คือ SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 มาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลักษณะอาการที่เชื้อแต่ละไอโซเลทชักนำให้เกิดขึ้นกับพืชทดสอบ 3 ชนิด คือ มะนาว (*C. aurantifolia*) ส้มโอ (*C. grandis* L.) และเกรฟรุท (*C. paradisi* Macfad.) พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลททำให้เกิดอาการเส้นใบใสรเพียงเล็กน้อย (ระดับ 1) บนพืชทดสอบมะนาวเท่านั้น โดยมีระดับอาการต่ำกว่า 20 คะแนน ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส ทั้ง 3 ไอโซเลทที่แยกได้เป็นเชื้อสายพันธุ์อ่อน

การจำแนกสายพันธุ์ซีตรัสทริสเตซาไวรัส โดยการวิเคราะห์แบบแผน RFLP โดยการนำรหัสพันธุกรรมเปลือกโปรตีน P25 มาตัดด้วยเอนไซม์จำเพาะ *Hin* f I พบว่าได้แบบแผน RFLP ที่แตกต่างกัน โดยจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์มีตั้งแต่ 5-10 ชิ้น และมีขนาด 37, 42, 49, 74, 91, 170, 261, 300, 337 และ 386 bp ผลการวิเคราะห์แบบแผน RFLP ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อน 3 ไอโซเลท คือ SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท มีแบบแผน RFLP ที่แตกต่างกัน โดยพบแบบแผนร่วมมากกว่า 1 แบบแผน เมื่อ

เปรียบเทียบกับแบบแผน RFLP ซึ่งรายงานไว้โดย Gillings และคณะ (1993) โดยไอโซเลท SM4-P5 พบแบบแผน RFLP ของเชื้อกลุ่มสายพันธุ์รุนแรง ปานกลาง และอ่อนร่วมกัน ไอโซเลท SM4-P10 พบแบบแผนของเชื้อกลุ่มสายพันธุ์รุนแรงและปานกลาง และไอโซเลท SM4-P9 พบแบบแผนที่ไม่ปรากฏในรายงานของ Gillings และคณะ (1993) แต่จากการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัส โดยใช้ลักษณะอาการบนพืชทดสอบสรุปได้ว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสทั้ง 3 ไอโซเลทเป็นเชื้อในกลุ่มสายพันธุ์อ่อน บ่งชี้ว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้ด้วยแมลงพาหะประกอบด้วยสายพันธุ์มากกว่า 1 สายพันธุ์ และปฏิกิริยาสัมพันธ์ของสายพันธุ์ไวรัสที่อยู่ร่วมกันอาจชักนำให้เกิดอาการอ่อน

การทดสอบคุณสมบัติของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนทั้ง 3 ไอโซเลทที่แยกได้ในการแพร่กระจายโดยแมลงพาหะ (*T. citricida*) พบว่าพบว่าไอโซเลท SM4-P5 มีอัตราการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะ 75 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไอโซเลท SM4-P9 และไอโซเลท SM4-P10 มีอัตราการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะเท่ากัน คือ 70 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดสอบคุณสมบัติในการเพิ่มปริมาณของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในพืชทดสอบมะนาวไอโซเลท SM4-P5, SM4-P9 และ SM4-P10 เปรียบเทียบกับเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในมะนาว SM4 ได้ความเข้มข้น 0.064, 0.350, 0.081 และ 6.000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของน้ำคั้นของเนื้อเยื่อ พบว่าไอโซเลท SM4-P9 มีแนวโน้มในการขยายพันธุ์ในเนื้อเยื่อมะนาวสูงกว่าไอโซเลท SM4-P5 และ SM4-P10 แต่ต่ำกว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสในแหล่งเชื้อมะนาว SM4

จากการแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสด้วยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนลงบนพืชทดสอบมะนาวแล้วจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสด้วยพืชทดสอบ (biological index) ร่วมกับการจำแนกด้วยวิธีการทางชีวโมเลกุล (RFLP) พบว่าการแยกเชื้อโดยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อน 1 ตัวต่อพืชทดสอบ (single aphid transmission) เพียงรอบเดียวไม่สามารถแยกสายพันธุ์ของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสออกเป็นสายพันธุ์อ่อนเดี่ยวๆ ได้ แต่จากการประเมินอาการบนพืชทดสอบพบว่าเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสที่แยกได้ทำให้เกิดอาการอ่อน

## เอกสารอ้างอิง

- ปรีชา ส่งเสริม. 2548. การถ่ายทอดเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสโดยเพลี้ยอ่อนส้มสีน้ำตาล (*Toxoptera citricida*). ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ไมตรี พรหมมินทร์, กิตติศักดิ์ กียรติยะอังกูร, เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และนวลจันทร์ ดีมา. 2529. ความแตกต่างของลักษณะอาการของโรคทริสเตซาในมะนาวที่เกิดจาก isolate ที่ต่างกัน. วารสารวิชาการเกษตร 4: 143-148.
- รัตนา สดุดี. 2537. โรคโทรมของส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco): เชื้อสาเหตุและปัจจัยส่งเสริมความรุนแรงของโรค. วารสารสงขลานครินทร์ 16(4): 353-368.
- รัตนา สดุดี, ปิยวิทย์ โทธรรม, ปรีชา ส่งเสริม, อมาวดี ไชยชนะ และอริสา รัตนูปถัมภ์. 2552. ผลกระทบของเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ลำต้นนุ่มต่อพืชตระกูลส้ม. รายงานการประชุมวิชาการพืชสวนแห่งชาติครั้งที่ 8 ณ โรงแรมดิเอ็มเพรส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่, 6-9 พฤษภาคม 2552 หน้า 106.
- รัตนา สดุดี, มลคล แซ่ลิ้ม และสุภาพ เกียรติทับทิว. 2543. การควบคุมโรคทริสเตซาในส้มจุกโดยการปลูกเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง. รายงานการวิจัยภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- รัตนา สดุดี, สมปอง เตชะโต และ John Milne. 2551. การพัฒนาวิธีการทางเซรุ่มวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มในประเทศไทย. รายงานวิจัยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).
- สิริภัทร์ พงษ์เสฐ. 2526. การวินิจฉัยโรคทริสเตซาของส้มเขียวหวาน. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Atta, S., Liu, Y., Cao, M., Yang, F., Zhou, Y. and Zhou, C. 2011. Molecular characterization of *Citrus tristeza* virus isolates from Pakistan based on CPG/*Hinf* I restriction fragment length polymorphism (RFLP) groups analysis. *African Journal of Biotechnology* 10(44): 8689-8694.
- Ayazpour, K., Sijam, K., Vadamalau, G. and Jaafar, H. 2011. Molecular characterization of citrus tristeza virus strains in Peninsular Malaysia. *African Journal of Microbiology Research* 5(18): 2838-2846.
- Bänziger, H. 1997. Keys for the identification of aphids (homoptera) II. Field Identification of common wingless aphids of crops in Thailand. *Agriculture and Co-operatives*. Bangkok, Thailand, 23 p.
- Bar-Joseph, M., Gumpf, D.J., Dodds, J.A. Rosner, A., and Ginzberg, I. 1985. A simple purification method for citrus tristeza virus and estimation of its genome size. *Phytopathology* 75: 195-198.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R. and Lee, R.F. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review Phytopathology* 27: 291-316.
- Barzegar, A., Sohi, H.H. and Rahimian, H. 2005. Comparative sequence analysis of coat protein gene of Iranian *citrus tristeza virus* isolates. *Journal of Phytopathology* 153: 457-463.
- Bekolo, N., Zachée, A., Louis, B.M. and Akoa, A. 2007. Discrimination of citrus tristeza virus (CTV) strains using Mexican lime/citrange troyer combinations (*Citrus poncirus/Citrus trifoliata* x *Poncirus sinensis*). *African Journal of Biotechnology* 6(4): 375-378.

- Broadbent, P., Bransky, R. H. and Indsto, J. 1996. Biological characterization of Australian isolate of citrus tristeza virus and separation of subisolate by single aphid transmissions. *Plant Disease* 80: 329-333.
- Broughton, S. 2007. Aphids in citrus. Western Australia, Department of Agriculture and Food, 2007. Farmnote (South Perth, W.A.), Australia, 2 p.
- Corazza-Nunes, M.J., Machado, M.A., Stach-Machado, D.R., Nunes, W.M.C. and Müller, G.W. 2006. Characterization of citrus tristeza virus isolate from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) accessions of citrus active germplasm bank. *Summa Phytopathologica* 32(4): 322-327.
- Costa, A.S. and Muller, G. 1980. Tristeza control by cross protection. *Plant Disease* 64: 538-541.
- Davino, S., Rubio, L. and Davino, M. 2005. Molecular analysis suggests that recent *citrus tristeza virus* outbreaks in Italy were originated by at least two independent introductions. *European Journal of Plant Pathology* 111: 289-293.
- Dodds, A. 1993. dsRNA in diagnosis. *In*: Matthews REF, ed. *Diagnosis of Plant Virus Diseases*. CRC Press, Boca Raton, pp. 94-273.
- Figueroa, J., Foguet, L., Castellanos, A.I.F. and Stein, B. 2009. Biological characterization of citrus tristeza virus strains in lemon in Tucumán, Argentina. *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán* (2009) Tomo 86(1): 37-41.

- Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Paul, C., Hilf, M.E., Lee, R.F., Brlansky, R.H., Yokomi, R.K. and Hartung, J.S. 2005. Biological characterization of an international collection of citrus tristeza virus (CTV) isolates. Proceedings of the 16<sup>th</sup> Conference, International Organization of Citrus Virologists, USA, 3-6 November 2004, pp. 75-93.
- Gillings, M., Broadbent, P., Indsto, J. and Lee, R.F. 1993. Characterization of isolates and strains of *Citrus tristeza* closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 44: 305-317.
- Halbert, S.E. and Brown, L.G. 2003. Brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). (online) Available from: <http://edis.ifas.ufl.edu>. (accessed November 12, 2009)
- Hilf, M.E., Mavrodieva, V.A. and Garnsey, S.M. 2005. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of citrus tristeza virus : characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. Phytopathology 95: 909-917.
- Jiang, B., Hong, N., Wang, G.P., Hu, J., Zhang, J.K., Wang, C.X., Liu, Y. and Fan, X.D. 2008. Characterization of citrus tristeza virus strains from southern china based on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein gene. Virus Genes 37: 185-192.
- Kano, T., Natsuaki, T., Isaka, M. and Suastika, G. 2006. Restriction fragment length polymorphism analysis of *citrus tristeza virus* isolate in Japan and its application to cross-protection experiments. Bulletin of the National Institute of Fruit Tree Science 5: 63-70.

- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O., Hilf, M.E., Kooni, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Lewandowski, D.J. and Dawson, W.O. 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
- Koizumi, M. 2001. Citrus tristeza virus : symptoms and control. (online) Available from: <http://fftc.imita.org/library.php?func=view&id=20110714095638> (accessed October 22, 2009)
- Komazaki, S. 1993. Biology and virus transmission of citrus aphids. (online) Available from: <http://www.fftc.agnet.org/library.php?func=view&style=type&id=20110712190621> (accessed December 25, 2009)
- Korkmaz, S. 2002. Investigation of biological properties, double-stranded RNA patterns and antigen concentration in citrus species infected with citrus tristeza virus. *Phytoparasitica* 30 (4): 420-428.
- Mooney, P., Dawson, T. and Harty, A. 1994. Citrus tristeza virus preimmunization strategies. (online) Available from: <http://www.hortnet.co.nz/publications/science/kk0894.htm> (accessed November 20, 2009)
- Muller, G.W. and Rezende, J.A.M. 2004. Preimmunization: applications and perspectives in virus disease control. *Disease of Fruits and Vegetables* 1: 361-395.
- Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Garnsey, S.M. and Lee, R.F. 1998. Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolate causing stem pitting in sweet orange. *Plant Disease* 82: 1276-1280.

Ochoa, F., Carballo, O., Trujillo, G., Izaquirre, M.L.M. and Lee, R.F. 1993. Biological characterization and evaluation of cross protection potential of citrus tristeza virus isolate in Venezuela. Proceedings of the 12<sup>th</sup> Conference, International Organization of Citrus Virologists, USA, 23-27 November 1992, pp. 1-7.

Powell, C.A., Pelosi, R.R., Rundell, P.A., Stover, E. and Cohen, M. 1999. Cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolate of *citrus tristeza virus*. Plant Disease 83: 989-991.

Rocha-Pena, M., Lee, R. F., Lastra, R., Niblett, C. L., Ochoa-Corona, F., Yokomi, R. K. and Garnsey, S. M. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Plant Disease 79: 437-445.

Roistacher, C.N. 1991. Graft-Transmissible disease of Citrus : Handbook for Detection and Diagnoses. International Organization of Citrus Virologist. Rome, FAO, 286 p.

Senan, A.A., Bonsi, C.K. and Basiouny, F.M. 1997. Indexing of *citrus tristeza virus* using serological and biological tests. Proceeding of the Florida State Horticultural Society 119: 77-79.

van der Vyver, J.B., van Vuuren, S.P., Luttig, M. and da Graca, J.V. 2002. Changes in the Citrus Tristeza Virus status of pre-immunized grapefruit field trees. Proceedings of the 15<sup>th</sup> Conference, International Organization of Citrus Virologists, Cyprus, 11-16 November 2001, pp. 175-185.



- Yokomi, R.K., Lastra, R., Stoetzel, M.B., Damsteegt, V.D., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Rocha-Pena, M. and Niblett, C.L. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. *Journal Economic Entomology* 87: 1078-1085.
- Zhou, C.Y., Hailstones, D.L., Broadbent, P., Connor, R. and Bowyer, J. 2002. Studies on mild strain cross protection against stem-pitting citrus tristeza virus. *Proceedings of the 15<sup>th</sup> Conference, International Organization of Citrus Virologists, Cyprus, 11-16 November 2001*, pp. 151-157.
- Zhou, Y., Zhou, C.Y., Song, Z., Liu, K.H. and Yang, F.Y. 2007. Characterization of citrus tristeza virus isolates by indicators and molecular biology methods. *Agricultural Sciences in China* 6(5): 537-579.

ภาคผนวก

1. สูตรการเตรียม TBE 5 เท่า pH 8.0 ปริมาตร 1 ลิตร
 

Tris base (0.45 M)	54 กรัม
Boric acid (0.45 M)	27.5 กรัม
EDTA pH 8.0 (0.01 M)	20 มิลลิลิตร (0.5 M EDTA)
  
2. สูตรการเตรียม Loading dye ปริมาตร 10 มิลลิลิตร
 

Glycerol	5 มิลลิลิตร
EDTA (1 mM)	40 ไมโครลิตร (0.2 M EDTA)
Bromophenol (0.25%)	0.04 กรัม
Xylene cyanol (0.25%)	0.04 กรัม
  
3. สูตรการเตรียม Polyacrylamide gel 8%
 

TBE buffer (5×stock)	9 มิลลิลิตร
Acrylamide:Bis (30% stock)	12 มิลลิลิตร
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	25 ไมโครลิตร
Ammonium persulfate (10% stock)	286 ไมโครลิตร
Sterile deionized water	24 ไมโครลิตร
  
4. สูตรการเตรียม Agarose gel 1.5%
 

Agarose (Molecular grade)	0.45 กรัม
0.5 เท่า TBE buffer	30 มิลลิลิตร
  
5. สูตรการเตรียม STE buffer 1 เท่า ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
 

Tris-Cl (0.5 M)	50 มิลลิลิตร
NaCl (5 M)	10 มิลลิลิตร
EDTA (0.5 M)	1 มิลลิลิตร
  
6. สูตรการเตรียม Coating buffer ปริมาตร 1 ลิตร
 

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1.59 กรัม
--------------------------	-----------

NaHCO <sub>3</sub>	2.93 กรัม
NaN <sub>3</sub>	0.20 กรัม
(pH 9.6)	

7. สูตรการเตรียม Phosphate buffer saline (PBS) ปริมาตร 1 ลิตร

NaCl	8.00 กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2.90 กรัม
KCl	0.20 กรัม
(pH 7.2 – 7.4)	

8. สูตรการเตรียม Washing buffer (PBS-T) ปริมาตร 1 ลิตร

PBS	1.0 ลิตร
Tween 20	0.5 มิลลิลิตร

9. สูตรการเตรียม Conjugate buffer ปริมาตร 1 ลิตร

PBS-T	1.0 ลิตร
Polyvinylpyrrolidone Mr 40,000	20 กรัม

10. สูตรการเตรียม Substrate buffer ปริมาตร 1 ลิตร

Diethanolamine	97 มิลลิลิตร
NaN <sub>3</sub>	0.2 มิลลิลิตร
(ปรับ pH ให้ได้ 9.8 ด้วย HCl)	

11. สูตรการเตรียม Stopping reaction solution ปริมาตร 1 ลิตร

NaOH	120 กรัม
------	----------

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวพุดตาล ทิพเพ็ง	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5210620033	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (การจัดการศัตรูพืช)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2551

### ทุนการศึกษา

- ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยวิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- ทุนสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

### การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

พุดตาล ทิพเพ็ง และรัตนา สดุดี. 2555. การแยกเชื้อซีตรัสทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อ่อนด้วยแมลงพาหะเพลี้ยอ่อนส้ม [*Toxoptera citricida* (Kirkaldy)]. ว. วิทยาศาสตร์เกษตร. 43(2)(พิเศษ): 269-272.

Tippeng, P. and Sdoodee, R. 2011. Characterisation of citrus tristeza closterovirus isolates from Thailand using restriction analysis of their coat protein gene. The 4<sup>th</sup> Asian conference on plant pathology concurrent with The 18<sup>th</sup> Biennial Australasian plant pathology society conference. New Frontiers in Plant Pathology for Asia and Oceania 26-29 April 2011. Darwin Convention Centre Darwin, NT, Australia. (ภาคโปสเตอร์)