

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทั่วไปของเจมินีไวรัส

เจมินีไวรัสมีลักษณะอนุภาคเป็นทรงกลมหลายเหลี่ยมขนาดเล็กอยู่ติดกันเป็นคู่ (icosahedral) อนุภาคของไวรัสประกอบด้วยกรดนิวคลีอิก 20-30 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีน 70-80 เปอร์เซ็นต์ แต่ละอนุภาคมีการเกาะตัวกันของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคเป็น 22 capsomers มีเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาคเดี่ยว 18-20 นาโนเมตร ขนาดความยาวรวมของอนุภาคคู่ประมาณ 30-36 นาโนเมตรจีโนมของเจมินีไวรัสเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นวงมีความยาวประมาณ 2,500 – 5,600 นิวคลีโอไทด์บรรจุอยู่ในอนุภาค จีโนมของเจมินีไวรัสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $7-8 \times 10^5$ ดาลตัน โปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $2.7 \times 10^3 - 3.4 \times 10^3$ ดาลตัน (Goodman, 1981) ซึ่งไวรัสอาจมีจีโนมเป็น DNA 1 หรือ 2 โมเลกุลเรียกว่า monopartite หรือ bipartite genome ตามลำดับ

2.2 การจัดจำแนกเจมินีไวรัส

การจัดจำแนกไวรัสในระยะแรกอาศัยคุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพเป็นเกณฑ์ในการจำแนกและหลังจากนั้นได้นำคุณสมบัติอื่นๆของไวรัสมาใช้ประกอบกันเพื่อจัดจำแนกไวรัสให้เป็น family, genus เช่น ชนิดของกรดนิวคลีอิก ลักษณะอนุภาค วิธีการเพิ่มปริมาณ รวมถึงการใช้พีชอาศัยและความสัมพันธ์ทางซีรัมวิทยาด้วย (Mathews, 1991; Francki, 1983)

ในช่วงปี 1996-1997 The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) ได้กำหนดเกณฑ์สำหรับจำแนกไวรัสพีชด้วยระบบอนุกรมวิธาน โดยจัดแบ่งเป็น Order Family และ Genus และจัดจำแนกเจมินีไวรัสไว้ใน Family *Geminiviridae* ซึ่งในปัจจุบันสามารถจัดจำแนกเจมินีไวรัสออกเป็น 4 กลุ่มตามคุณสมบัติทางโครงสร้างจีโนม (ภาพที่ 2.1) ชนิดของแมลงพาหะและพีชอาศัย (Briddon และคณะ, 1996; Rybicky และคณะ, 2000) ดังนี้

1. Genus *Mastrevirus* ได้แก่เจมินีไวรัสที่มีจีโนมเป็น DNA 1 โมเลกุล (monopartite) ถ่ายทอดโรคโดยเพลี้ยจักจั่น (Leafhoppers) และเข้าทำลายพืชใบเลี้ยงเดี่ยว (monocotyledonous plants) มี *Maize streak virus* เป็น type species

2. Genus *Curtovirus* ประกอบด้วยเจมีนีไวรัสที่มีจีโนมเป็น DNA 1 โมเลกุล (mono-partite) ถ่ายทอดโดยเพลี้ยจักจั่น (Leafhoppers) แต่มีการเข้าทำลายพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledonous plants) มี type species คือ *Beet curly top virus*

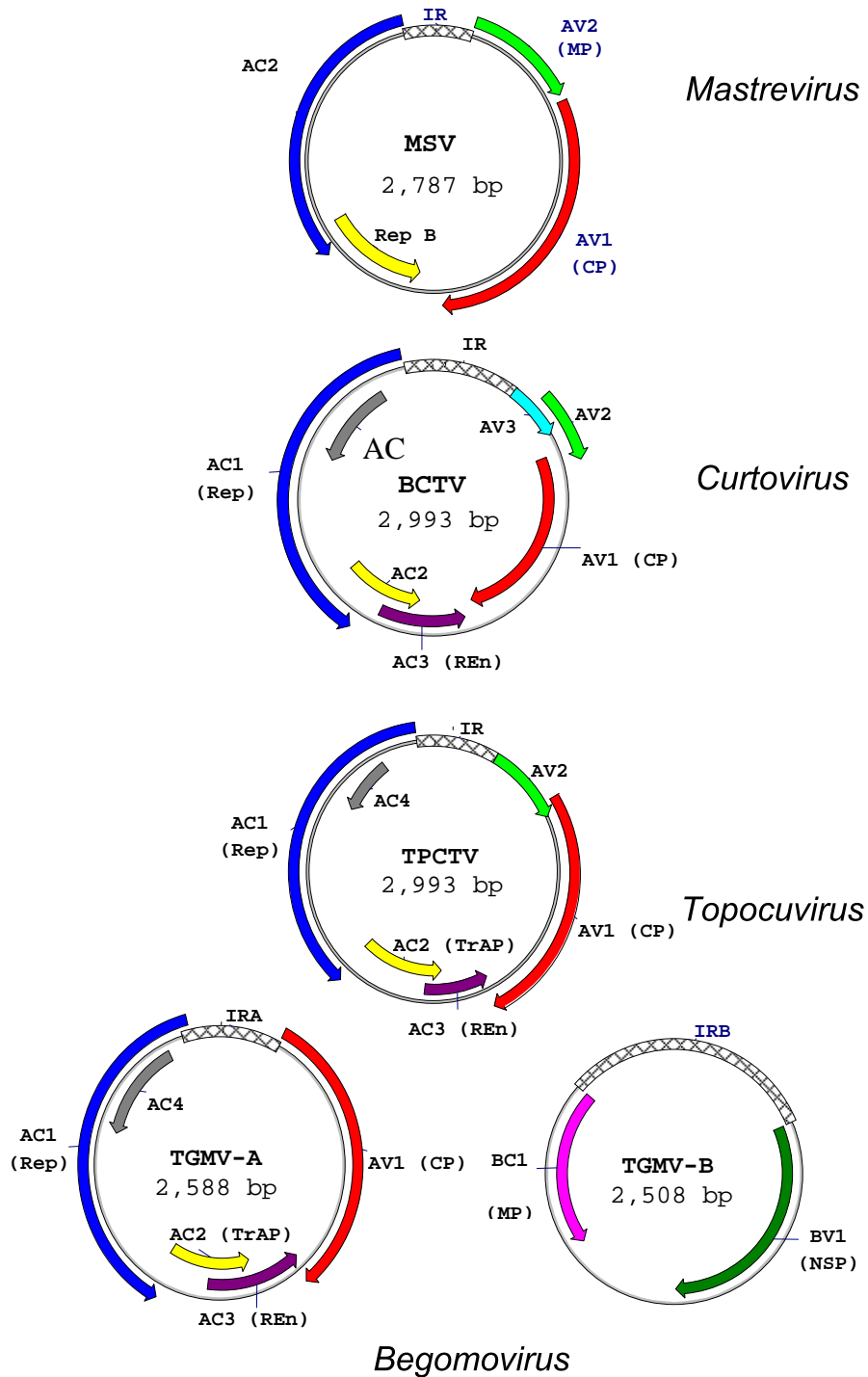
3. Genus *Topocuvirus* เป็นกลุ่มล่าสุดที่ถูกจัดตั้งขึ้น (Pringle, 1999) ประกอบด้วยเจมีนีไวรัสที่มีจีโนมเป็น DNA วงเดี่ยว (monopartite) มีพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledonous plants) เป็นพืชอาศัยและถ่ายทอดโดย treehopper มี type species คือ *Tomato pseudo-curly top virus*

4. Genus *Begomovirus* เป็นกลุ่มที่มีสมาชิกจำนวนมากที่สุด เข้าทำลายพืชใบเลี้ยงคู่ (dicotyledonous plants) และถ่ายทอดไวรัสโดยแมลงหริ่งขาว (whitefly, *Bemisia tabaci*) ส่วนจีโนมของ *Begomovirus* มีได้ 2 ลักษณะคือเป็นดีเอ็นเอ 1 โมเลกุล (monopartite) หรือ 2 โมเลกุล (bipartite) พบการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในหลายพื้นที่ โดยในประเทศแถบตะวันตกมักพบการระบาดของ begomovirus ที่มีจีโนมเป็น DNA 2 โมเลกุล เช่น *Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV (Kheyr-Pour และคณะ, 1991; Navot และคณะ, 1991 ในขณะที่ begomovirus ที่แพร่ระบาดในแถบตะวันออกส่วนมากจะมีจีโนมเป็นดีเอ็นเอ 1 โมเลกุล เช่น *Tomato leaf curl virus*, ToLCV (Dry และคณะ, 1993)

2.3 เจมีนีไวรัสที่พบในประเทศไทย

2.3.1 เจมีนีไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองมะเขือเทศ หรือ *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) ซึ่งปัจจุบันได้มีการเปลี่ยนชื่อเป็น *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) มีแหล่งการแพร่ระบาดในจังหวัดนครปฐมและบริเวณภาคกลาง ซึ่งศึกษาและรายงานโดย Attathom และคณะ (1994); Rochester และคณะ, (1994) และต่อมา Sawangjit และคณะ (2005) ได้รายงานการพบสายพันธุ์ใหม่ของ TYLCTHV ที่แพร่ระบาดในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ TYLCTHV-[CM] ทำให้เกิดโรคใบหงิกเหลืองกับมะเขือเทศในจังหวัดเชียงใหม่ TYLCTHV-[NK] และ TYLCTHV-[SK] ทำให้เกิดโรคใบหงิกเหลืองกับมะเขือเทศในจังหวัดหนองคายและสกลนคร ตามลำดับ เจมีนีไวรัสสาเหตุโรคนี้จัดอยู่ใน Genus *Begomovirus* มีจีโนมเป็นแบบ bipartite DNA-A หรือ component A มีขนาด 2,744-2,751 นิวคลีโอไทด์ และ DNA-B หรือ component B มีขนาด 2,737-2,750 นิวคลีโอไทด์ ลักษณะอาการโรคที่พบทั่วไปบนมะเขือเทศคือ ใบอ่อนที่แตกใหม่จะมีขนาดเล็กและม้วน หงิกงอ ส่วนใบล่างๆ ของต้น ขอบใบจะม้วนลงหรือขึ้น ผิวใบไม่เรียบและมีสีเหลือง (chlorosis) ต้นชะงักการเจริญเติบโตและแคระแกร็น ดอกร่วง ทำให้ผลผลิตลดลงมาก โดยถ้าเชื้อเข้าทำลายตั้งแต่ระยะต้นอ่อนพืชจะแสดงอาการรุนแรง ต้นแคระแกร็นมาก และไม่ให้ผลผลิตเลย TYLCTHV มีพืชอาศัยใน

Family Solanaceae ได้แก่ ยาสูบใบเล็ก (*Nicotiana benthamiana*) มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) ลำโพง (*Datura stramonium*) และสามารถถ่ายทอดโรคได้โดยแมลงหริ้วขาว



ภาพที่ 2.1 แผนภาพแสดงจีโนมของเจมินีไวรัสใน Family Geminiviridae ซึ่งประกอบด้วย 4 Genus คือ *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* และ *Begomovirus*

2.3.2 เจมินีไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคใบด่างเหลืองของถั่วเขียว หรือ *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) มีจีโนมเป็นแบบ bipartite โมเลกุลของ DNA-A มีขนาด 2,723 นิวคลีโอไทด์ DNA-B มีขนาด 2,675 นิวคลีโอไทด์ (Morinaga และคณะ, 1993) มีรายงานการพบโรคนี้เป็นครั้งแรกทางภาคเหนือเมื่อปี พ.ศ. 2520 พบแพร่ระบาดในหลายจังหวัด เช่น กำแพงเพชร พิษณุโลก พิจิตร เพชรบูรณ์ นครสวรรค์ และอุทัยธานี (Chiemsombat, 1991) ลักษณะอาการของโรคที่พบโดยทั่วไปคือบนใบมีจุดเล็กๆ สีเหลืองกระจายอยู่ทั่วไป ทำให้ใบมีสีเหลืองปนเขียว ต่อมาจุดสีเหลืองจะขยายใหญ่จนใบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจัด ใบยอดที่แตกใหม่จะมีสีเหลือง ต้นถั่วเขียวจะแคระแกร็น ไม่ออกดอกและไม่ติดผล สามารถถ่ายทอดโรคได้โดยแมลงหริ่งขาว (Morinaga และคณะ, 1993)

2.3.3 เจมินีไวรัสที่พบในถั่วเหลือง อาการของโรคที่พบบนถั่วเหลืองคืออาการใบยอดย่น พบการแพร่ระบาดของโรคในปี พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดเชียงใหม่ กำแพงเพชร สระบุรี และเลย (เครือพันธ์ และคณะ, 2530) ถ่ายทอดโรคได้โดยแมลงหริ่งขาว และวิธีการโดยการทาน้ำคั้นบนใบพืช มีพืชอาศัยใน Family Leguminosae เช่น ถั่วแขก และ Family Solanaceae หลายชนิด เช่น ยาสูบ มะเขือเทศ (Iwaki และคณะ, 1983) ถั่วเหลืองที่เป็นโรคจะแสดงอาการใบบิดเบี้ยวหรือหงิก เส้นใต้ใบมักมีสีเขียวเข้มและหนูนอกออกมาเป็นดิ่ง ใบแก่จะมีสีเขียวเข้ม บางใบมีแถบสีเขียวเข้มตามเส้นใบ ใบหยดย่น ผักบิดเบี้ยวและผิวผักย่น

2.3.4 เจมินีไวรัสในพริก Chiemsombat และ Kittipakorn (1996) ได้ตรวจพบดีเอ็นเอของเจมินีไวรัสในพริกที่แสดงอาการใบหงิกและใบเหลือง โดยใช้ดีเอ็นเอตัวตรวจที่สังเคราะห์จาก DNA-A ของ TYLCTHV ลักษณะอาการของโรคที่พบในพริกแต่ละพันธุ์นั้นจะมีอาการที่ต่างกัน ได้แก่ อาการใบเหลือง ใบหงิกม้วนงอ เส้นใบเหลือง ใบบิดเบี้ยวผิดปกติ พบว่าเจมินีไวรัสของพริกมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่างๆคล้ายคลึงกับ TYLCTHV ดังนี้ CP 72 เปอร์เซนต์ IR 75 เปอร์เซนต์ และ RC 81 เปอร์เซนต์

2.3.5 เจมินีไวรัสในพืชตระกูลแตง Chiemsombat และคณะ (1996) รายงานการตรวจพบเจมินีไวรัสในพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการต่างๆกัน เช่นใน ฟักทอง ฟัก น้ำเต้า มีอาการใบหงิกเหลืองในใบที่แตกใหม่และใบยอด แต่ใบล่างยังคงมีสีเขียว ในมะระและตำลึง ใบอ่อนแสดงอาการใบด่างเหลือง และจุดเหลืองที่ใบอ่อน ที่ใบแก่จะเป็นแผลแห้ง การเจริญของยอดลดลง

2.3.6 เจมินีไวรัสในบวบเหลี่ยม หรือ *Tomato leaf curl New Dehli virus*–[Luffa], ToLCNDV-[Luf] รายงานโดยเขาวภา และคณะในปี 2542 พบการแพร่ระบาดในจังหวัดนครปฐม และสุพรรณบุรี จัดอยู่ใน Genus *Begomovirus* DNA-A มีขนาด 2,746 นิวคลีโอไทด์ ลักษณะอาการโรคที่พบทั่วไปบนบวบเหลี่ยมคือ ใบยอดหงิกย่นและเป็นจุดสีเหลือง ใบมีขนาดเล็กกว่าใบปกติ ใบล่างเป็นจุดสีเหลือง สามารถถ่ายทอดโรคด้วยวิธีการคือผ่านทางน้ำคั้นใบพืชได้

2.3.7 เจมินีไวรัสในกระเจี๊ยบเขียว *Okra yellow vein virus*, OYVV เป็นสาเหตุโรคไวรัสเส้นใบเหลือง (Okra yellow vein virus disease) มีการแพร่ระบาดอย่างรุนแรง ทำให้ผักของ

กระเจี๊ยบมีสีเหลืองไม่สามารถส่งออกไปขายยังต่างประเทศได้ อนุภาคของเชื้อสาเหตุมีขนาดประมาณ 18 x 30 นาโนเมตร จัดอยู่ใน Genus *Begomovirus* เนื่องจากเข้าทำลายพืชใบเลี้ยงคู่และถ่ายทอดโรคโดยแมลงหิวข้าว (เครือพันธุ์ และคณะ, 2544)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากรายงานการศึกษาเรื่องเจมีนีไวรัสชนิดใหม่สาเหตุโรคใบหงิกเหลืองของบวบเหลี่ยมของเยาวภา ตันติวานิช และคณะในปี 2542 เรื่องเจมีนีไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกเหลืองของพืชตระกูลแตงของเครือพันธุ์ กิตติปกรณ และคณะในปี 2544 เรื่อง *Cucurbit geminiviruses in Thailand* ของ Chiemsombat และคณะในปี 1996 และการศึกษาของ Sawangjit S ในปี 2009 เรื่อง *The complete nucleotide sequence of Squash leaf curl China virus-[Wax gourd] and its phylogenetic relationship to other geminiviruses* รวมทั้งการศึกษาอื่นๆของเชื้อเจมีนีไวรัสกลุ่มนี้ แสดงให้เห็นว่าไวรัสกลุ่มนี้ยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ก่อให้เกิดความเสียหายแก่ผู้ผลิตพืชตระกูลแตงหลากหลายชนิดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เนื่อง จากพบว่าเจมีนีไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคของพืชตระกูลแตงนี้มีอัตราการเกิดโรคและการแพร่ระบาดในแปลงปลูกอย่างต่อเนื่อง สาเหตุเนื่องจากไวรัสสามารถถ่ายทอดได้ทางน้ำคั้นใบพืชและที่สำคัญคือมีแมลงหิวข้าวเป็นพาหะที่ก่อให้เกิดการแพร่ระบาดของโรคและเชื้อสาเหตุอย่างต่อเนื่องเป็นบริเวณกว้างจึงทำให้เกิดสมมติฐานว่าในแปลงปลูกพืชตระกูลแตงชนิดต่างในพื้นที่หลายจังหวัดในภาคกลางของประเทศไทยยังคงมีการแพร่ระบาดของไวรัสกลุ่มนี้อยู่อย่างต่อเนื่อง

สถานภาพการวิจัยในเรื่องการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายหรือความผันแปรทางพันธุกรรมของเจมีนีไวรัสในพืชตระกูลแตงในต่างประเทศนั้นอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในประเทศต่างๆ ที่เป็นผู้ผลิตพืชตระกูลแตงทั้งในลักษณะการบริโภคผลสดหรือการผลิตเมล็ดพันธุ์ โดย การวิจัยจะแบ่งเป็น 2 ลักษณะใหญ่คือ การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของจีโนมของไวรัสหรือการศึกษาความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์เฉพาะยีนหลักๆที่สำคัญซึ่งส่วนมากได้แก่ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (*Coat protein, CP*) ยีนควบคุมการเพิ่มปริมาณ (*Replicase, Rep*) และ ส่วน Intergenic region (IR) เช่น การศึกษาเรื่อง *A New Bipartite Geminivirus (Begomovirus) Causing Leaf Curl and Crumpling in Cucurbits in the Imperial Valley of California* ของ Guzman และคณะ ในปี 2000 การศึกษาเรื่อง *Cucurbit leaf curl virus, a New Whitefly Transmitted Geminivirus in Arizona, Texas, and Mexico* ของ Brown และคณะ ในปี 2000 เรื่อง *The complete nucleotide sequence of two distinct geminiviruses infecting cucurbits in Vietnam* ของ Revill และคณะในปี 2003 เรื่อง *Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua* ของ Ala-Poikela

และคณะในปี 2005 และการศึกษาเรื่อง *Biology and Molecular Characterization of Cucurbit leaf crumple virus, an Emergent Cucurbit-Infecting Begomovirus in the Imperial Valley of California* ของ Hagen และคณะในปี 2008 ซึ่งจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไวรัสในกลุ่มเจมีนีไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคของพืชตระกูลแตงมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมซึ่งสามารถเกิดได้ในธรรมชาติตลอดเวลา การเปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์หรือเกิดจากการ recombination ของไวรัสในกลุ่มเดียวกัน ทำให้มีข้อมูลทางพันธุกรรมที่เปลี่ยนไปจากเดิม ดังนั้นผู้วิจัยจึงเกิดสมมติฐานว่าหากเชื้อไวรัสกลุ่มนี้ยังคงมีการแพร่ระบาดในแปลงปลูกธรรมชาติก็มีความเป็นไปได้สูงที่ไวรัสเหล่านั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมตัวเองทำให้เกิดเจมีนีไวรัสชนิดหรือสายพันธุ์ใหม่ ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP และ IR บนจีโนมของเชื้อไวรัสดังกล่าวเพื่อนำมาวิเคราะห์ความหลากหลายของเชื้อเจมีนีไวรัสสาเหตุโรคพืชตระกูลแตงสายพันธุ์ไทย