

การตรวจพบไวรัสสาเหตุโรคใบจุดและใบย่นในสตรอว์เบอร์รี  
พันธุ์พระราชทาน 80 ที่ปลูกในพื้นที่อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่

Detection of Viruses Caused Leaf Spot and Crinkle Leaf in Strawberry  
cv. Praratchatan 80 Growing in Fang District, Chiang Mai Province

นพดล ปนธะรังษี<sup>1\*</sup> ศิริินภา ไชยพล<sup>1</sup> ประไพพิศ สุวิทย์ชยานนท์<sup>2</sup>  
เกวาลิน คุณาศักดากุล<sup>3</sup> และ นิวัฒน์ ชันโท<sup>1</sup>  
Nopphadon Pontharangsee<sup>1\*</sup>, Sirinapa Chaipon<sup>1</sup>, Prapaipit Suwitchayanon<sup>2</sup>,  
Kaewalin Kunasakdakul<sup>3</sup> and Niwat Khantho<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ฝ่ายนวัตกรรมเกษตร บริษัท ดอยคำผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด กรุงเทพฯ 10400

<sup>1</sup>Department of Agricultural Innovation, Doi Kham Food Products Co., Ltd., Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup>สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตกาญจนบุรี จ. กาญจนบุรี 71150

<sup>2</sup>Division of Agricultural Science, Mahidol University, Kanchanaburi Campus, Kanchanaburi 71150, Thailand

<sup>3</sup>ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

<sup>3</sup>Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

\*Corresponding author: Email: n.pontharangsee@gmail.com

(Received: 17 February 2023; Accepted: 10 August 2023)

**Abstract:** Strawberry cultivation using stolon from repeatedly long-term mother plant is possibly accumulated with various viruses and affected to plant growth, flowering, fresh fruit yield, and qualities. The purpose of this research was to explore the infection of virus in strawberry cv. Praratchatan 80 in Ban Nong Tao and Ban Khop Dong (Mon Pin sub-district) and Ban Mae Ngon Khi Lek (Mae Ngon sub-district), Fang district, Chiang Mai province. A total of 175 strawberry leaf samples were collected from 43 symptomatic samples and 132 non-symptomatic samples. Virus detection was conducted by using a reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. The result showed that there were 134 samples (76.57%) of virus-infected strawberry. Of the detection number, 92 samples (52.57%) were identified as a single infection, including 80 samples (45.71%) of strawberry latent ringspot virus (SLRSV) and 12 samples (6.86%) of strawberry crinkle virus (SCV). Mixed infection of SLRSV and SCV was also detected at 42 samples (24.0%). Detected samples in each area were found 58 samples (77.33%) in Ban Nong Tao, 59 samples (78.67%) in Ban Khop Dong and 17 samples (68%) in Ban Mae Ngon Khi Lek. The nucleotide sequences of DNA synthesis for the CP gene – RNA 2 (SLRSV) and L protein gene (SCV) regions were obtained from PCR products with sizes of 497 bp and 345 bp, respectively. They were then analyzed and compared to the GenBank database. Results showed that the nucleotide sequence of 497 bp was similar to 5 isolates of SLRSV (Mint 454, NCGR MEN, Eg, Mint-CP2 and W16) at 89.21 - 99.8% identity and the sequence of 345 bp was similar to 4 isolates of SCV (1554, KG, H2399 and H2395) at 94.4 - 100% identity.

To the best of our knowledge, this is the first report of SLRSV and SCV virus infecting strawberry in Thailand.

**Keywords:** Strawberry virus disease, Praratchatan 80, RT-PCR, strawberry latent ringspot virus, strawberry crinkle virus

**บทคัดย่อ:** การปลูกสตรอว์เบอร์รีด้วยการใช้ต้นพันธุ์ที่ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการต่อไหลอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานทำให้เกิดการสะสมของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืช ส่งผลต่อการเจริญเติบโต การติดดอก ปริมาณและคุณภาพของผลสตรอว์เบอร์รี งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจและตรวจหาการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ที่เพาะปลูกใน 3 พื้นที่ ได้แก่ บ้านหนองเต่า บ้านขอบด้ง ตำบลม่อนปิ่น และบ้านแม่อนขี้เหล็ก ตำบลแม่อน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ โดยเก็บตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี จำนวน 175 ตัวอย่าง จากต้นที่แสดงอาการของโรค จำนวน 43 ตัวอย่าง และไม่แสดงอาการของโรคจำนวน 132 ตัวอย่าง นำมาศึกษาและตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) ผลการวินิจฉัยพบไวรัสรวมจำนวน 134 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 76.57 ของตัวอย่างทั้งหมด แบ่งเป็น การเข้าทำลายแบบเดี่ยว ร้อยละ 52.57 จากไวรัส strawberry latent ringspot virus (SLRSV) จำนวน 80 ตัวอย่าง และไวรัส strawberry crinkle virus (SCV) จำนวน 12 ตัวอย่าง และพบการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด ช่วงต้น จำนวน 42 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24 โดยแบ่งการตรวจพบในแต่ละพื้นที่ ได้แก่ บ้านหนองเต่า จำนวน 58 ตัวอย่าง (77.33%) บ้านขอบด้ง จำนวน 59 ตัวอย่าง (78.67%) และบ้านแม่อนขี้เหล็ก จำนวน 17 ตัวอย่าง (68%) ผลการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ตำแหน่ง CP gene – RNA 2 (SLRSV) และ L protein gene (SCV) จากผลผลิตดีเอ็นเอของปฏิกิริยา PCR ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 497 คู่เบส และ 345 คู่เบส ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ 497 คู่เบส มีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อไวรัส SLRSV จำนวน 5 ไอโซเลท (Mint 454, NCGR MEN, Eg, Mint-CP2 และ W16) ที่ระดับความเหมือน 89.21 - 99.8% และลำดับนิวคลีโอไทด์ 345 คู่เบส มีความคล้ายกับเชื้อไวรัส SCV จำนวน 4 ไอโซเลท (1554, KG, H2399 และ H2395) ที่ระดับความเหมือน 94.4 - 100% งานวิจัยนี้จึงนับเป็นการตรวจพบเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ในสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80 เป็นครั้งแรกของประเทศไทย

**คำสำคัญ:** โรคไวรัสสตรอว์เบอร์รี พระราชทาน 80 RT-PCR โรคใบจุดในสตรอว์เบอร์รี โรคใบย่นในสตรอว์เบอร์รี

## คำนำ

สตรอว์เบอร์รี (*Fragaria x ananassa* Duch.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมในการบริโภคสูง และมีการปลูกอย่างแพร่หลายในพื้นที่ภาคเหนือของประเทศไทย เช่น อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย อำเภอเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ อำเภอสะเมิง อำเภอกัลยาณิวัฒนา และอำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ เป็นต้น โดยสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกในปัจจุบันคือ พันธุ์พระราชทาน 80 (Praratchatan 80) เนื่องจากผลสุกมีกลิ่นหอม รสชาติหวาน ทรงผลสวย เป็นที่นิยมของผู้บริโภค นอกจากนี้

ยังเป็นพืชที่เกษตรกรในระบบส่งเสริมของบริษัท โดยค่าผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด เพาะปลูกและส่งออกผลผลิตให้แก่โรงงานหลวงอาหารสำเร็จรูปที่ 1 (ฝาง) ใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ และจำหน่ายในรูปแบบรับประทานสด (สตรอว์เบอร์รีคัตพิเศษดอยคำ) ภายหลังพบว่า ผลผลิตสตรอว์เบอร์รีประสบปัญหาปริมาณและคุณภาพผลผลิตลดลง โดยในปี พ.ศ. 2564 เกษตรกรในระบบส่งเสริมของบริษัทฯ ผลิตสตรอว์เบอร์รีผลสดได้เพียง 27.23 ตันต่อพื้นที่ปลูก 45 ไร่ ลดลงจากปี พ.ศ. 2561 ถึง 13.98 ตัน (41.21 ตันต่อพื้นที่ปลูก 45 ไร่) (ข้อมูลปริมาณผลผลิตสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80

ตำบลดม่อนปิ่นและตำบลแม่งอน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ปี พ.ศ. 2561 - 2564, ส่งเสริมและพัฒนาเกษตรโรงงานหลวงอาหารสำเร็จรูปที่ 1 (ฝาง) ซึ่งเป็นผลมาจากปัญหาการเข้าทำลายของโรคและแมลงศัตรูพืช สภาพอากาศที่แปรปรวน โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากไวรัสที่สะสมอยู่ในต้นพันธุ์ ทำให้พืชแสดงอาการ ใบด่าง ม้วนงอ และแคระแกร็น เป็นอุปสรรคสำคัญต่อการเจริญเติบโต ปริมาณผลผลิต ขนาดผล ส่งผลกระทบต่อมูลค่าทางการตลาดลดลง

ไวรัส strawberry latent ringspot virus (SLRSV) และ strawberry crinkle virus (SCV) เป็นสาเหตุโรคที่มีการเข้าทำลายในลักษณะแฝงอยู่ในต้นพืช สังเกตอาการได้ยาก การตรวจวินิจฉัยโรคจึงจำเป็นต้องใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นหลัก เทคนิค RT-PCR สามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยไวรัสชนิดที่เป็น RNA โดย ไวรัส SLRSV ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Secoviridae สกุล *Nepovirus* มีสารพันธุกรรมแบบ bipartite positive-sense ssRNA ประกอบด้วย RNA 1 และ RNA 2 (Borodynko *et al.*, 2007) ที่มีรายงานการเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจอย่างแพร่หลายทั่วโลก เช่น สตรอว์เบอร์รี (*Fragaria* spp.), ราสป์เบอร์รี (*Rubus idaeus*), ท้อ (*Prunus* spp.), ลิลลี่ (*Lilium* spp.), กุหลาบ (*Rosa* spp.) และมะกอก (*Olea* spp.) โดยพบว่า พืชที่ถูกเข้าทำลายส่วนใหญ่จะไม่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน (Dulleman *et al.*, 2020; Tang *et al.*, 2013) ส่วนไวรัส SCV จัดอยู่ในวงศ์ Rhabdoviridae สกุล *Cytorhabdovirus* มีสารพันธุกรรมแบบ negative-sense ssRNA เป็นเชื้อที่มีความรุนแรงชนิดหนึ่งที่ทำให้เกิดการทำลายสตรอว์เบอร์รี (Fránová *et al.*, 2019) เมื่อเกิดการเข้าทำลายแบบเดี่ยว (single infections) ส่งผลให้ผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตลดลง 20 - 30% หากเกิดการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสชนิดอื่น (mixed infections) ทำให้ผลผลิตลดลงสูงถึง 80% อีกทั้งมีผลกระทบต่อการใช้ประโยชน์ของต้นแม่พันธุ์ลดลงอีกด้วย (Rao and Reddy, 2020; Thompson *et al.*, 2003)

จากปัญหาที่กล่าวมาผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญเรื่องการตรวจหาชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ในพื้นที่ที่ได้รับการส่งเสริมการเพาะปลูกสตรอว์เบอร์รีจากโรงงานหลวงฯ โดยใช้

เทคนิคที่มีความแม่นยำสูงในการตรวจสอบ เพื่อทราบถึงเชื้อสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตและคุณภาพของผลผลิตลดลง และเป็นแนวทางในการศึกษาเชื้อสาเหตุโรคไวรัสของสตรอว์เบอร์รี ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสกับพืชอาศัย และเป็นแนวทางในการพัฒนาต้นพันธุ์สตรอว์เบอร์รีปลอดโรค รวมถึงการปรับปรุงพันธุ์เพื่อใช้เป็นต้นแม่พันธุ์ในการเพาะปลูกและผลิตสตรอว์เบอร์รีในประเทศไทยต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่างโรค

เก็บตัวอย่างใบจากต้นสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 อายุประมาณ 100 - 120 วัน ที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส เช่น ใบด่าง (mosaic) จุดขีดต่าง (mosaic streak) จุดต่างวงแหวน (ringspot) ม้วนงอ (curling) ใบตุ่มนูน (crinkle) ต้นแคระแกร็น (stunting) และต้นสตรอว์เบอร์รีที่ไม่แสดงอาการของโรค (non-symptomatic) จากแปลงเกษตรกรผู้ปลูกสตรอว์เบอร์รีบ้านหนองเต่า (19°56'52.1"N 99°05'03.1"E) บ้านขอบด้ง (19°55'35.2"N 99°03'18.7"E) ตำบลดม่อนปิ่น และบ้านแม่งอนขี้เหล็ก (19°47'46.6"N 99°07'55.8"E) ตำบลแม่งอน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2564 - มกราคม พ.ศ. 2565 จำนวน 175 ตัวอย่าง บันทึกอาการที่ปรากฏบนใบและพื้นที่เก็บตัวอย่าง แล้วเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาสกัดอาร์เอ็นเอและตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)

### 2. การสกัดอาร์เอ็นเอ

นำตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รีมาสกัดอาร์เอ็นเอ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Barman *et al.* (2017) บดใบสตรอว์เบอร์รีสด 100 มิลลิกรัม ด้วยไนโตรเจนเหลวให้ละเอียด เติม 2X CTAB buffer (2% CTAB, 2% PVP, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA pH 8.0 และ 2M NaCl) ปริมาตร 650 ไมโครลิตร และ 2-mercaptoethanol ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปปั่น

ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมน้ำคลอโรฟอร์ม: isoamyl alcohol (24:1) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บั่นผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 15 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารละลายส่วนใส (supernatant) ใส่ลงในหลอด microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 12,000x g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนด้วย 75% ethanol ปริมาตร 1,400 ไมโครลิตร บั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ 7,500x g เป็นเวลา 5 นาที ตากตะกอนอาร์เอ็นเอที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วย DEPC water ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 58 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วัดค่าความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอด้วย Nanodrop™ One UV-Vis spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) ก่อนการตรวจหาเชื้อไวรัส

### 3. การตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR

สังเคราะห์ cDNA โดยมีส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา ได้แก่ อาร์เอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, reverse primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5x reaction buffer ปริมาตร 4 ไมโครลิตร, 10 mM dNTP Mix ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, RiboLock RNase inhibitor (20 U/μL) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, M-MuLV reverse transcriptase (200 U/μL) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (RevertAid first strand cDNA synthesis kit, Thermo Scientific, USA) ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (nuclease-free water) ให้มีปริมาตรสุทธิ 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำ cDNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยเทคนิค PCR โดยมีส่วนผสมของสารละลายของปฏิกิริยา ดังนี้ DreamTaq PCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific, USA) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร, cDNA ปริมาตร 4.5 ไมโครลิตร, specific SCV และ SLRSV forward primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, specific

SCV และ SLRSV reverse primer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (Table 1) ปรับปริมาณด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ให้มีปริมาตรสุทธิ 25 ไมโครลิตร จีโนมของเชื้อไวรัส SLRSV ที่เลือกมาตรวจหาคือเป็นส่วนหนึ่งที่อยู่บน movement protein (MP) gene และ coat protein (CP) gene บน RNA2 ระหว่างนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 1,144 - 1,641 โดยมีขนาดประมาณ 497 คู่เบส (bp) จีโนมของเชื้อไวรัส SCV บนบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ที่เลือกมาตรวจหาคืออยู่บน L protein gene ระหว่างนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง 14,545 - 14,559 โดยมีขนาดประมาณ 345 คู่เบส (bp) โดยใช้ลำดับไพรเมอร์เทียบกับข้อมูลใน GenBank database (Klerks *et al.*, 2004; Koloniuk *et al.*, 2018; Tzanetakis *et al.*, 2006) จากนั้นทำปฏิกิริยา PCR ภายใต้สภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงต่างกันตาม specific primer (Table 2) (Mastercycler® nexusX2, Eppendorf, Germany) ตรวจหาค่าผลผลิตปฏิกิริยา PCR (PCR products) โดยเตรียม 1.5% agarose gel ในสารละลาย 1X TBE buffer ผสมสีย้อมเจล RedSafe™ dye (iNTRON Biotechnology, USA) ตรวจวิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค gel electrophoresis ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที และส่องภายใต้แสง UV ช่วงแสง 302 นาโนเมตร เตรียมชิ้นส่วนเจลที่ผ่านการตรวจสอบแล้วและมีผลเป็นบวก โดยส่งตัวอย่างผลผลิตดีเอ็นเอของปฏิกิริยา PCR (PCR product) ที่ได้ ไปทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตามกรรมวิธีของบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ ด้วยเครื่อง ABI3730x1 automated sequencer (Applied Biosystems, USA) นำผลการตรวจหาเชื้อไวรัสมาคำนวณหาร้อยละการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส (% infection rate) ตามวิธีการของ Rodrigues *et al.* (2019) โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

1. ร้อยละการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างทั้งหมด

$$\text{Infection rate (\%)} = \frac{\sum(PS) \times 100}{TNS}$$

2. ร้อยละการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสแต่ละรูปแบบ (การเข้าทำลายแบบเดี่ยวและการเข้าทำลายร่วม)

$$\text{Infection type (\%)} = \frac{\sum(SPS \text{ or } MPS) \times 100}{TNS}$$

Positive sample (PS) คือ ตัวอย่างที่มีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปรากฏผลบวกที่ 497 bp หรือ 345 bp

Single positive sample (SPS) คือ ตัวอย่างที่มีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปรากฏผลบวกที่ 497 bp หรือ 345 bp เพียงตำแหน่งเดียว

Mixed positive sample (MPS) คือ ตัวอย่างที่มีการตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปรากฏผลบวกที่ 497 bp หรือ 345 bp

Total number of samples (TNS) คือ จำนวนตัวอย่างที่นำมาตรวจสอบทั้งหมด

#### 4. การทดสอบการก่อโรค

ทดสอบการก่อโรคของเชื้อไวรัส SLRSV โดยดัดแปลงจากวิธีของ Tang *et al.* (2013) นำใบสตรอว์เบอร์รีจากต้นที่ตรวจพบเชื้อไวรัส SLRSV ด้วยวิธี RT-PCR มาบดใน 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 ก่อนปลูกเชื้อบ่มพืชทดสอบ (สตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80)

ไว้ในที่มืดเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ โรยผง silicon carbide (400 mesh) บนใบพืชทดสอบ จำนวน 3 ใบ ทาด้วยน้ำคั้น (sap inoculum) ให้ทั่วใบ ทั้งไว้ 10-20 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ ชุดควบคุมใช้ 0.05 M phosphate buffer pH 7.5 นำพืชทดสอบบ่มไว้ในโรงเรือนควบคุมสภาพแวดล้อม 25 - 28 องศาเซลเซียส สังเกตอาการบนใบพืชเป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์

ทดสอบการก่อโรคของเชื้อไวรัส SCV โดยการต่อกิ่ง (grafting) ตามวิธีการของ Fránová *et al.* (2019) โดยใช้ก้านใบ จากต้นกล้าสตรอว์เบอร์รีปลอดโรคเสียบเข้ากับก้านใบของต้นตอสตรอว์เบอร์รีที่ตรวจพบเชื้อไวรัส SCV สังเกตลักษณะอาการที่ปรากฏเป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์

ตรวจหาเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ด้วยวิธี RT-PCR ในพืชทดสอบหลังจากพืชแสดงอาการของโรค เพื่อยืนยันผลการทดสอบการก่อโรคของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิด

Table 1. Sequence of specific primers and forward reverse specific primers used in RT-PCR and positions within the viral genome.

Primer name	Sequencing (5' -3')	Amplification product	Target gene	Reference
SCV F	CATTGGTGGCAGACCCATCA	345 bp	L protein gene	Klerks <i>et al.</i> (2004)
SCV R	TTCAGG ACCTATTTGATGACA			
SLRSV F	CCTCTCCAACCTGCTAGACT	497 bp	Coat protein (CP) gene - RNA 2	Postman <i>et al.</i> (2004)
SLRSV R	AAGCGCATGAAGGTGTAAC			

Table 2. Amplification steps of RT-PCR assays

Primer	Initial denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	Cycle
SCV F, R	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C	72 °C	39*
	10 min	15 S	30 S	1 min	10 min	
SLRSV F, R	94 °C	94 °C	50 °C	72 °C	72 °C	30*
	5 min	1 min	1 min	1 min	10 min	

\*The quantity of cycles in the RT-PCR process, specifically for the denaturation, annealing, and extension steps exclusively, was assessed.

### 5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และการวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

นำข้อมูลการตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Blast (National Center for Biotechnology Information: NCBI)([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=Blast Search](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=Blast Search)) เปรียบเทียบกับข้อมูลจีโนมของเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ที่ได้รายงานใน GenBank database จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของแต่ละตำแหน่งมาวิเคราะห์เปรียบเทียบการจัดเรียงตำแหน่ง (multiple sequence alignment) โดยใช้คำสั่ง ClustalW และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (phylogenetic tree) ด้วยวิธีการจัดกลุ่มจากวิธี Maximum Likelihood และ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ โดยใช้ Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993; Tamura *et al.* 2021) ในโปรแกรม MEGA เวอร์ชัน 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 1. การเก็บตัวอย่างโรคและลักษณะอาการ

จากการเก็บตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80 อายุประมาณ 100 - 120 วัน จำนวน

175 ตัวอย่าง ในพื้นที่บ้านหนองเต่าและบ้านขอบด้ง (ตำบลม่อนปิ่น อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่) จำนวนพื้นที่ละ 75 ตัวอย่าง และบ้านแม่อนชี้เหล็ก (ตำบลแม่องอน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่) จำนวน 25 ตัวอย่าง พบตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี่ที่ไม่แสดงอาการของโรคไวรัส จำนวน 132 ตัวอย่าง และตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี่ที่แสดงอาการของโรคไวรัส จำนวน 43 ตัวอย่าง ได้แก่ อาการใบด่าง ใบด่างวงแหวน จุดขีดดำง ตุ่มนูน เนื้อใบย่น ขอบใบม้วนงอ และใบมีขนาดเล็ก (ลดรูป) (Figure 1, 2) และอาการแคะแกร็น ต้นชะงักการเจริญเติบโต (Figure 2)

#### 2. การตรวจหาเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ด้วยเทคนิค RT-PCR

การตรวจหาเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV จากตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80 ในพื้นที่บ้านหนองเต่า บ้านขอบด้ง และบ้านแม่อนชี้เหล็ก จำนวน 175 ตัวอย่าง ด้วย specific primer (SLRSV F,R และ SCV F,R) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็นสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80 ปลอดเชื้อ (healthy plant) พบว่า ปฏิกริยา PCR ของคู่ไพรเมอร์ SLRSV พบแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 497 คู่เบส (bp) (ผลเป็นบวก) จำนวน 122 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 69.71 ของ

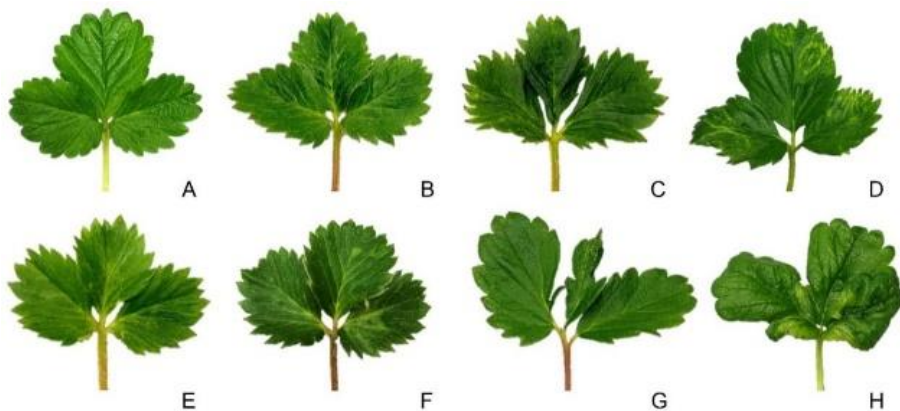


Figure 1. Virus-like symptoms on naturally infected strawberry Praratchatan 80 cultivar leaves showing non-symptomatic (A), crinkle (B), crinkle and malformation (C), ringspot (D), mosaic streak (E), mosaic and ringspot (F), malformation (G) and crinkle, leaf curling and malformation (H).



Figure 2. Virus-like symptoms found on leaves and strawberry plants in the field are as follows: non-symptomatic (A), leaf crinkle (B), tillering dwarf and leaf curling (C), ringspot and crinkle (D), and crinkle and dwarf (F), These symptoms were compared with those of a non-symptomatic plant (E).

ตัวอย่างทั้งหมด แบ่งออกเป็น พื้นที่บ้านหนองเต่า จำนวน 56 ตัวอย่าง บ้านขอบดิ่งจำนวน 50 ตัวอย่าง และบ้านแม่-งอนซีเหล็ก จำนวน 16 ตัวอย่าง (Figure 3) และคู่มือเมอร์ SCV พบแถบดีเอ็นเอปรากฏ 345 คู่เบส (bp) (ผลเป็นบวก) จำนวน 54 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 30.86 ของตัวอย่างทั้งหมด แบ่งออกเป็น พื้นที่บ้านหนองเต่า จำนวน 23 ตัวอย่าง บ้านขอบดิ่ง จำนวน 25 ตัวอย่าง และบ้านแม่-งอนซีเหล็ก จำนวน 6 ตัวอย่าง (Table 3) ทั้งนี้คู่มือเมอร์ ทั้งสองชนิดข้างต้น ไม่เกิดปฏิกิริยากับตัวอย่างสตรอว์-เบอร์รีปลอดเชื้อ

ผลการตรวจเชื้อพบตัวอย่างไบสตรอว์เบอร์รีที่มีการเข้าทำลายแบบเดี่ยว จำนวน 92 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 52.57 การเข้าทำลายของเชื้อไวรัส SLRSV จำนวน 80 ตัวอย่าง

(45.71 %) และการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส SCV จำนวน 12 ตัวอย่าง (6.86 %) นอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ SLRSV และ SCV จำนวน 42 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 24.0 ของตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างไบสตรอว์เบอร์รีที่ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นลบ) จำนวน 41 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 23.43 ของตัวอย่างทั้งหมด (Table 3) ซึ่งไม่แสดงอาการของโรคไวรัส

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์เชื้อไวรัสรวมกับการแสดงอาการบนใบและต้นสตรอว์เบอร์รี พบว่าไบสตรอว์เบอร์รีที่ไม่แสดงอาการของโรคมีการเข้าทำลายแบบเดี่ยวของเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด โดยตรวจพบเชื้อ SLRSV มากกว่า SCV ทั้งนี้มีเพียง 1 ตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ SCV ผลการวิเคราะห์

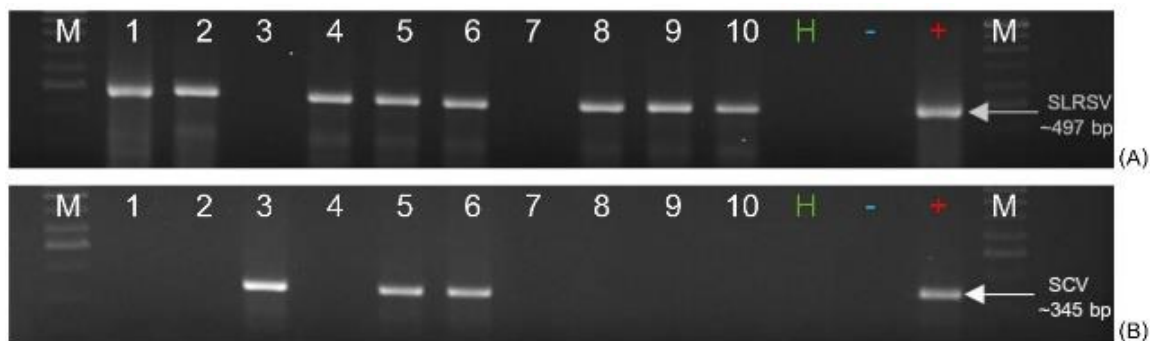


Figure 3. RT-PCR detection of strawberry latent ringspot virus (SLRSV) (A) and strawberry crinkle virus (SCV) (B) from strawberry Praratchatan 80 cultivar. Lane 1-10: strawberry leaves sample collected in Mon Pin and Mae Ngon sub-district, Fang district, Chiang Mai province. (A) Lane 1, 2, 4-6 and 8-10 (top) showed 497 bp SLRSV-specific amplicons. and (B) Lane 3, 5 and 6 (bottom) showed 345 bp SCV-specific amplicons. H: healthy plant; (-): negative (nuclease-free water); (+): positive SLRSV infected and M: 100 bp molecular weight marker.

Table 3. Result of SLRSV and SCV detection by RT-PCR from strawberry Praratchatan 80 cultivar.

Location	Detected (samples)			Not detected (samples)	Total (samples)
	SLRSV	SCV	SLRSV+SCV		
1. Ban Nong Tao, Mon Pin	35	2	21	17	75
2. Ban Khop Dong, Mon Pin	34	9	16	16	75
3. Ban Mae Ngon Khi Lek, Mae Ngon	11	1	5	8	25
Total (sample)	80	12	42	41	175
% Infection	45.71	6.86	24.00	23.43	100.00

สอดคล้องกับรายงานของ Borodynko *et al.* (2007) และ Frazier *et al.* (1987) ที่กล่าวว่าในพืชส่วนใหญ่ที่พบการเข้าทำลายแบบเดี่ยวของเชื้อไวรัส SLRSV หรือ SCV มักไม่ทำให้พืชแสดงการพัฒนาของโรคและอาการของโรคอย่างชัดเจน แต่หากเกิดจากการเข้าทำลายแบบร่วมกัน (mixed infection) ของเชื้อไวรัส SLRSV และ SCV ทำให้พืชแสดงอาการใบตุ่มนูน ใบต่าง ใบต่างวงแหวน เนื้อใบย่น ขอบใบม้วนงอ ใบมีขนาดเล็กและแคระแกร็น (Figure 2, Table 4) เช่นเดียวกับรายงานของ Fránová *et al.* (2019) และ EL- Morsy *et al.* (2017) ที่พบว่า

ต้นสตอร์วเบอร์รี่ที่ถูกเชื้อไวรัส SCV เข้าทำลายร่วมกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น เช่น strawberry mild yellow edge virus (SMYEV), strawberry mottle virus (SMoV), strawberry vein banding virus (SVBV) และ strawberry latent ringspot virus (SLRSV) แสดงอาการ ใบต่างเขียว ใบขีด ขนาดใบเล็ก มีตุ่มนูน และแคระแกร็น ทั้งนี้การเข้าทำลายของเชื้อไวรัสเพียงชนิดเดียวหรือมีการเข้าทำลายแบบเดี่ยวอาจไม่เป็นอันตรายแก่พืช แต่การเข้าทำลายแบบร่วมกันจะทำให้พืชแสดงอาการของโรคได้อย่างรุนแรงและสร้างความ



Table 4. The characteristics of symptoms on strawberry Praratchatan 80 cultivar associated with virus detection by using RT-PCR technique

Detected virus	Symptoms
1. SLRSV	Non-symptomatic
2. SCV	Non-symptomatic and crinkle
3. SLRSV and SCV (Mixed infected)	Ringspot, crinkle, mosaic, mosaic streak, leaf curling, deformation, dwarf and stunning

เสียหายต่อผลผลิต (Martin and Tzanetakis, 2006; Moyer *et al.*, 2021)

### 3. การทดสอบการก่อโรค

จากการปลูกเชื้อไวรัส SLRSV บนต้นกล้าสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80 พบว่า ต้นกล้าแสดงอาการใบจุดต่าง กระจายทั่วทั้งใบ (Figure 4) เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี RT-PCR เกิดปฏิกิริยาผลบวก และชุดควบคุมไม่เกิดปฏิกิริยา (ให้ผลเป็นลบ) สอดคล้องกับรายงานการปลูกเชื้อไวรัส SLRSV บนสตรอว์เบอร์รี *F. ananassa* แสดงอาการใบเหลือง (yellowing) ใบจุดต่าง (mottling) (Kheder, 2021) เมื่อนำใบพืชทดสอบมาตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นบวก) ในพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อ และชุดควบคุมไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นลบ) ทั้งนี้ ความรุนแรงของอาการที่ปรากฏมีความแตกต่างกันตามพืชอาศัยที่เชื้อไวรัสเข้าทำลาย เชื้อไวรัส SLRSV สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกลแต่ไม่แสดงอาการในพืชหลายชนิด จึงเป็นไปได้ว่ามีการติดเชื้อแฝงได้ (Martin *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2013)

ต้นกล้าสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80 ที่ปลูกเชื้อไวรัส SCV ด้วยการต่อกิ่ง (grafting) โดยใช้ก้านใบสตรอว์เบอร์รีพันธุ์พระราชทาน 80 ปลอดโรค พบว่าหลังต่อกิ่งเป็นเวลา 2 - 3 สัปดาห์ ใบสตรอว์เบอร์รีแสดงอาการใบจุดต่าง เป็นปุ่มปม (Figure 5) และชุดควบคุมไม่แสดงอาการ เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี RT-PCR พบแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นบวก) ในพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อ และชุดควบคุมไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นลบ) เช่นเดียวกับรายงานของ Fránová *et al.* (2019) ได้ต่อ

กึ่ง *F. vesca* ปลอดโรค เข้ากับต้นตอที่มีเชื้อไวรัสไอโซเลท StrV-1 พบว่า แสดงอาการใบต่างเขียว (light green) เส้นใบใส (vein clearing) หลังเลี้ยงกิ่งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ และเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี RT-qPCR พบปรากฏแถบดีเอ็นเอ (ผลเป็นบวก) ของเชื้อไวรัสไอโซเลท StrV-1 นอกจากนี้ Frazier *et al.* (1987) รายงานว่าเชื้อไวรัส SCV สามารถถ่ายทอดโรคด้วยการต่อกิ่งได้ง่ายกว่าวิธีการถ่ายทอดโรคด้วยวิธีอื่น

### 4. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการตรวจสอบ PCR product ด้วยวิธี gel electrophoresis พบผลเป็นบวกทั้งหมด 134 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 175 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างที่ให้ผลบวกจำนวน 30 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็น ผลบวกของ SLRSV จำนวน 15 ตัวอย่าง และผลบวกของ SCV 15 ตัวอย่าง จาก 3 พื้นที่เก็บตัวอย่าง มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บนฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างสตรอว์เบอร์รีที่ตรวจพบ เชื้อไวรัส SLRSV มีความเหมือนกับเชื้อไวรัส SLRSV ไอโซเลท Mint 454 (HQ456535.1) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% identity) สูงสุดของแต่ละตัวอย่างระหว่าง 99.3 - 99.8%, ไอโซเลท NCGR MEN 454.001 (AY461735.1) 99.3 - 99.6%, ไอโซเลท Eg (MT648777.1) 97.7 - 97.8%, ไอโซเลท Mint-CP2 (AY438666.1) 98.7 - 99.0% และไอโซเลท W16 (DQ324375.1) 88.49 - 89.21% ผลลัพธ์ที่ได้ สอดคล้องกับ Postman *et al.* (2004) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า specific primer ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับ CP gene - RNA 2 ของเชื้อไวรัส SLRSV สามารถสังเคราะห์

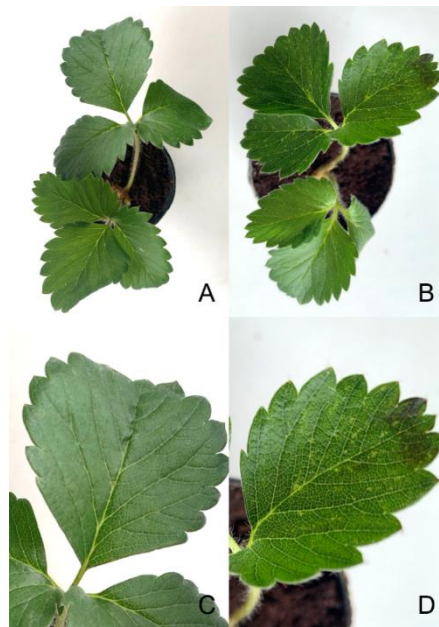


Figure 4. Symptoms on strawberry mechanically inoculated with SLRSV on cv. Praratchatan 80 showing mosaic leaf streak symptoms (B and D). The control (A and C) did not show any symptoms of the disease.

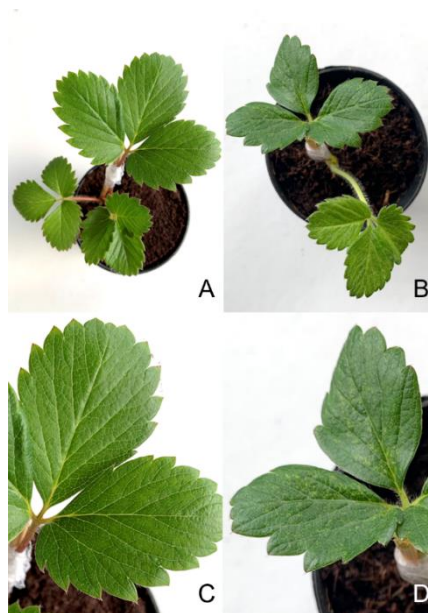


Figure 5. Symptoms on strawberry grafted with SCV-infected clones on cv. Praratchatan 80 showing mosaic and crinkle symptoms after grafting (B and D). The control (A and C) did not show any symptoms of the disease.

ผลผลิตดีเอ็นเอของปฏิกิริยา PCR ที่มีขนาดประมาณ 497 คู่เบส และใช้ตรวจสอบตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รีในพื้นที่อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ได้

ตัวอย่างใบสตรอว์เบอร์รีที่ตรวจพบเชื้อไวรัส SCV มีความเหมือนกับเชื้อไวรัส SCV ไอโซเลท 1554 (AY331385.1) โดยมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงสุดของแต่ละตัวอย่างระหว่าง 99.3 - 100 %, ไอโซเลท KG (AY331386.1) 99.3 %, ไอโซเลท H2399 (MZ326669.1) 98.7 - 98.8 % และไอโซเลท H2395 (MZ326668.1) 94.7 - 94.9 % สามารถสังเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอ ที่มีขนาดประมาณ 345 คู่เบส และใช้ตรวจสอบ L protein gene ของเชื้อไวรัส SCV ไอโซเลทต่าง ๆ ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์มีความแปรผันน้อยกว่า 10 % สามารถบ่งชี้ได้ว่าตำแหน่งของยีนที่ใช้ในการตรวจสอบเหมาะสมสำหรับใช้เป็นเป้าหมายในการตรวจวินิจฉัยโรค (Posthuma *et al.*, 2002)

## 5. การวิเคราะห์แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

เชื้อไวรัส SLRSV ตำแหน่ง CP gene - RNA 2 (497 bp) ไอโซเลทที่แยกจากสตรอว์เบอร์รี พันธุ์พระราชทาน 80 พื้นที่ตำบลม่อนปิ่น ตำบลแม่งอน อำเภอฝาง ที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ CM01-CM05 (AG05640531 - AG05640535) วิเคราะห์เปรียบเทียบ ลำดับนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ SLRSV ไอโซเลทต่างๆ ที่รายงานใน GenBank สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ โดยเชื้อไวรัสที่นำมาศึกษาครั้งนี้ (CM01-CM05) จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ ไอโซเลท Eg (MT648777.1), 454 (HQ456535.1), MEN 454.001 (AY461735.1), Mint - CP2 (AY438666.1), 6 - 6 (KF695119.1), Clematis 14-021 (MF796994), DSMZ PV - 0247 (MZ405641.1), W 16 (DQ324375.1) และ N 31 (DQ324374.1) (Group 1, Figure 6) และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท DSMZ PV - 1314 (MW854292.1), Mint 515 (HQ456537.1), Gorz 2 (DQ324376.2), Rosa 14 - 025 (MF797002.1), Lilium 13 - 023 (MF796976.1), Lilium 14 - 007 (MF796984.1), EA4 (JN859089.1), Lilium

13 - 024 (MF796978.1), Lilium 14 - 010 - 2 (MF796988.1) และ Golden peach - NZ (MN082041.1) (Group 2, Figure 6) เชื้อไวรัส SCV ตำแหน่ง L protein gene (345 bp) ไอโซเลทที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ CM01-CM05 (AG05640631 - AG05640635) เปรียบเทียบกับ ข้อมูลทางพันธุกรรมของเชื้อ SCV ไอโซเลทต่างๆ พบว่า ไอโซเลทที่นำมาศึกษา CM01-CM05 จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 ได้แก่ ไอโซเลท 1554 (AY331385.1), KG (AY331386.1) และ H2339 (MZ326669.1) (Group 1, Figure 7) และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลท H2395 (MZ326668.1), SAR1 (MG251308.1), SS26 (MG251309.1), F3 (MG251306.1), SAR15 (MG251310.1), SAR6 (MG251307.1), SS23 (MG251312.1) และ SS21 (MG251311.1) (Group 2, Figure 7) เชื้อไวรัสที่นำมาศึกษามีความสัมพันธ์กับเชื้อไวรัสที่รายงานการพบเชื้อในหลายภูมิภาคทั่วโลก ซึ่งให้เห็นว่า การตรวจพบในแปลงปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งไม่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทยมาก่อนนั้น อาจติดมากับต้นแม่พันธุ์ เมล็ดพันธุ์ แมลงพาหะ และวัสดุปลูกที่นำเข้ามา เนื่องจากเชื้อไวรัส SCV สามารถถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน และเชื้อไวรัส SLRSV สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ ละอองเรณู (pollen) และไส้เดือน ฝอยได้ (Allen *et al.*, 1970; Martin and Tzanetakis, 2006)

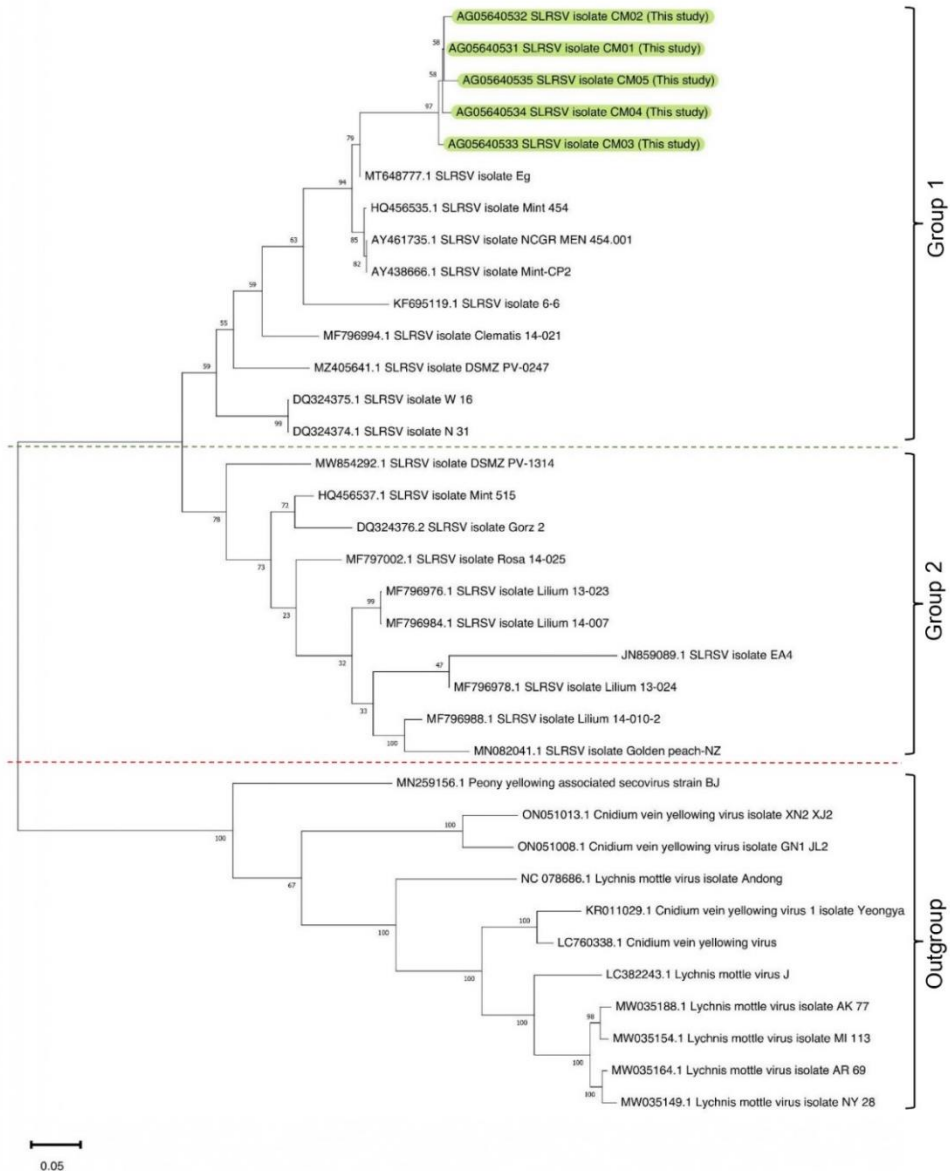


Figure 6. Phylogenetic tree analysis of *CP* gene-RNA 2 sequences of SLRSV showed that the 5 isolates of SLRSV in this study were closely grouped with isolate Eg (MT648777.1), Mint 454 (HQ456535.1), NCGR MEN 454.001 (AY461735.1), Mint-CP2 (AY438666.1), 6-6 (KF695119.1), Clematis 14-021 (MF796994), DSMZ PV-0247 (MZ405641.1), W 16 (DQ324375.1) and N 31 (DQ324374.1) (Group 1). The phylogenetic tree was constructed using MEGA version 11 based on the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model with 1000 bootstrap replicates. The numbers at internal nodes indicate bootstrap percentages, and the scale bar represents 0.05 substitutions per site.

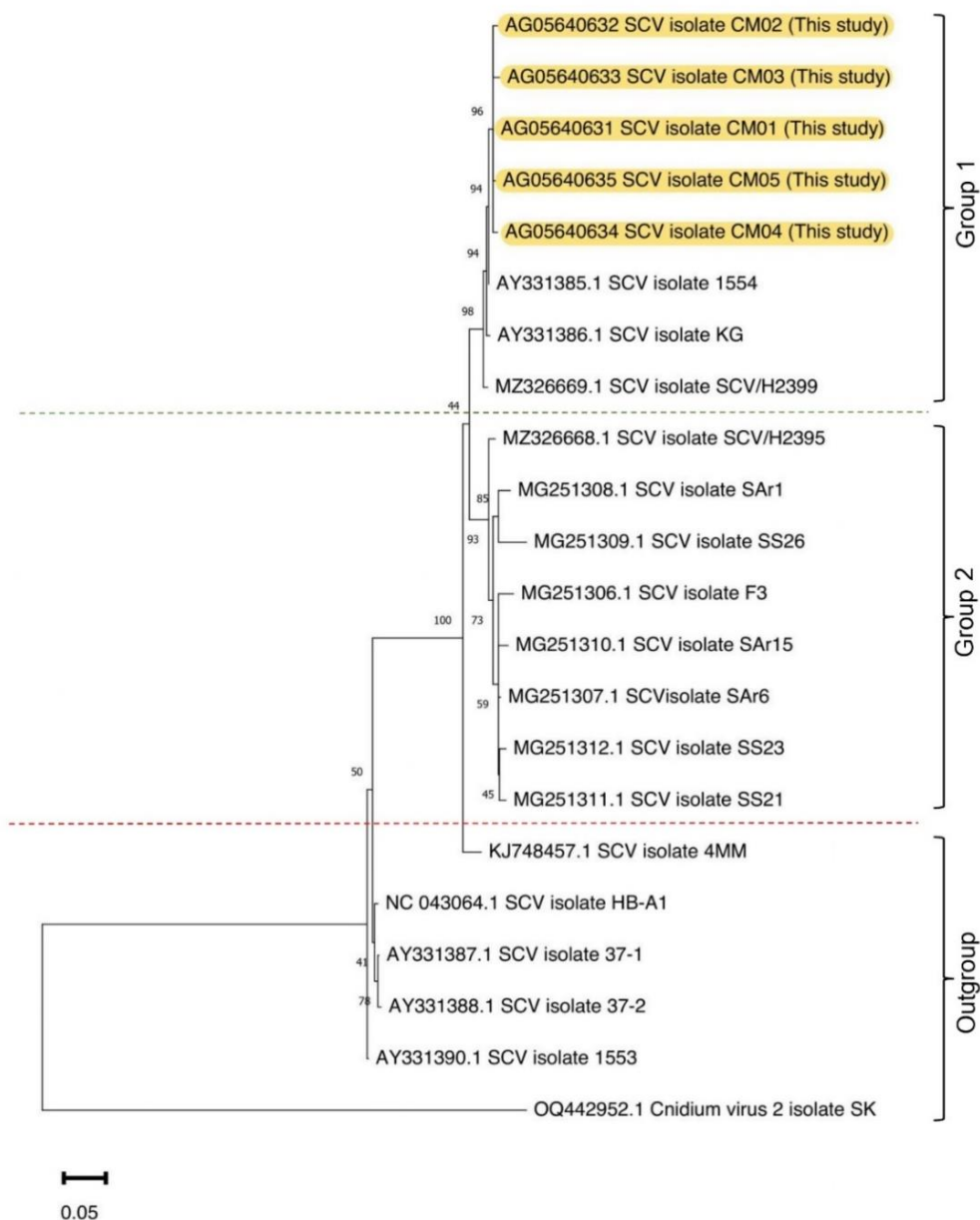


Figure 7. Phylogenetic tree analysis of *L* protein gene sequences of SCV showed that the 5 isolates of SCV in this study were closely grouped with isolate 1554 (AY331385.1), KG (AY331386.1) and H2399 (MZ326669.1) (Group 1). The phylogenetic tree was constructed using MEGA version 11 based on the Maximum Likelihood method and Tamura-Nei model with 1000 bootstrap replicates. The numbers at internal nodes indicate bootstrap percentages, and the scale bar represents 0.05 substitutions per site.

## สรุป

จากการตรวจหาเชื้อไวรัสในสตรอว์เบอร์รี่พันธุ์พระราชทาน 80 จากแปลงเกษตรกรที่บ้านหนองเต่าและบ้านขอบด้ง ตำบลม่อนปิ่น และบ้านแม่อนขี้เหล็ก ตำบลแม่อน อำเภอฝาง จังหวัดเชียงใหม่ รวมทั้งหมด 175 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค RT-PCR และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ยืนยันการเข้าทำลายซึ่งเกิดจากเชื้อไวรัส 2 ชนิด ได้แก่ strawberry latent ringspot virus (SLRSV) และ strawberry crinkle virus (SCV) ในตัวอย่างใบที่ไม่แสดงอาการของโรคเป็นส่วนใหญ่ และพบการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสทั้งสองในตัวอย่างใบที่แสดงอาการของโรค งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยวิธีดังกล่าวมีความแม่นยำสูงเหมาะสมในการนำมาใช้สุ่มตรวจเชื้อไวรัสในสตรอว์เบอร์รี่ที่ปลูกในพื้นที่กว้าง เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของโรค และลดความเสียหายด้านปริมาณและคุณภาพของผลผลิต

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ดำเนินการภายใต้โครงการตรวจสอบต้นพันธุ์พืชปลอดโรคด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยได้รับการสนับสนุนงบประมาณวิจัยจาก บริษัท ดอยคำผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด

## เอกสารอ้างอิง

Allen, W.R., T.R. Davidson and M.R., Briscoe. 1970. Properties of a strain of Strawberry latent ringspot virus isolated from Sweet Cherry growing in Ontario. *Phytopathology* 60(8): 1262-1265

Barman, P., A.K. Choudhary and R. Geeta. 2017. A modified protocol yields high-quality RNA from highly mucilaginous *Dioscorea* tubers. *3 Biotech* 7(2): 150, doi: 10.1007/s13205-017-0775-9.

Borodynko, N., B. Hasiów, M. Figlerowicz and H. Pospieszny. 2007. Identification of the new strain of *Strawberry latent ringspot virus* isolated from black Locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Journal of Phytopathology* 155(11-12): 738-742.

Dullemans, A.M., M. Botermans, M.J.D. de Kock, C.E. de Krom, T.A.J. van der Lee, J.W. Roenhorst, I.J.E. Stulemeijer, M. Verbeek, M. Westenberg and R.A.A. van der Vlugt. 2020. Creation of a new genus in the family *Secoviridae* substantiated by sequence variation of newly identified *Strawberry latent ringspot virus* isolates. *Archives of Virology* 165(1): 21-31.

EL- Morsy, Sh.I., M.A. EL-Sheikh, R.A. Abd El-Razik, S.A. Youssef and A.A. Shalaby. 2017. Molecular identification of *Strawberry latent ring spot virus* (SLRSV) in Egypt. *Journal of Basic and Environmental Sciences* 4: 24-33.

Fránová, J., J. Pribylová and I. Koloniuk. 2019. Molecular and biological characterization of a new strawberry *Cytorhabdovirus*. *Viruses* 11(11): 982, doi: 10.3390/v11110982.

Frazier, N.W., E.S. Sylvester and J. Richardson. 1987. Strawberry crinkle. pp. 20-25. *In*: R.H. Converse (ed.). *Virus Disease of Small Fruits*. Agricultural Handbook No.631. USDA, Washington, DC.

Kheder, A.A. 2021. Developed one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (Rt-Lamp) assay for detection of *Strawberry latent ring spot virus*. *Journal of Virological Sciences* 9(1): 1-13.

Klerks, M.M., J.L. Lindner, D. Vaskova, J. Spak, J.R. Thompson, W. Jelkmann and C.D. Schoen. 2004. Detection and tentative

- grouping of *Strawberry crinkle virus* isolates. *European Journal of Plant Pathology* 110: 45-52.
- Koloniuk, I., J. Fránová, T. Sarkisova and J. Pribylová. 2018. Complete genome sequences of two divergent isolates of *strawberry crinkle virus* coinfecting a single strawberry plant. *Archives of Virology* 163(9): 2539-2542.
- Martin, R.R. and I.E. Tzanetakis. 2006. Characterization and recent advances in detection of strawberry viruses. *Plant Disease* 90(4): 384-396.
- Moyer, C., V.M. Whitaker and N.A. Peres. 2021. Viral diseases of strawberry. *EDIS* 2021(6), doi: 10.32473/edis-pp273-2021.
- Postman, J.D., I.E. Tzanetakis and R.R. Martin. 2004. First report of *Strawberry latent ringspot virus* in a *Mentha* sp. from North America. *Plant Disease* 88(8): 907, doi: 10.1094/PDIS.2004.88.8.907B.
- Posthuma, K. I., A.N. Adams, Y. Hong and M.J. Kirb. 2002. Detection of *Strawberry crinkle virus* in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathology* 51(3): 266-274.
- Rao, G.P. and M.G. Reddy. 2020. Overview of yield losses due to plant viruses. pp. 531 - 562. *In*: L.P. Awasthi (ed.). *Applied Plant Virology. Advances, Detection, and Antiviral Strategies*. Academic Press, London.
- Rodrigues, G.B., G.G. Rocha Sobrinho, T. Mituti, A. Bergamin Filho, L. Amorim, J.A. M. Rezende and Q.S. de Novaes, 2019. Etiology, occurrence and epidemiology of a begomovirus disease in passionflower in the southwest of Bahia. *Scientia Agricola* 76(4): 337-343.
- Tamura K., G. Stecher and S. Kumar. 2021. *MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11*. *Molecular Biology and Evolution* 38(7): 3022-3027.
- Tamura K. and M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512-526.
- Tang, J., L.I. Ward and G.R.G. Clover. 2013. The diversity of *Strawberry latent ringspot virus* in New Zealand. *Plant Disease* 97(5): 662-667.
- Thompson, J.R., S. Wetzel, M.M. Klerks, D. Vašková, C.D. Schoen, J. Špak and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods* 111(2): 85-93.
- Tzanetakis, I.E., J.D. Postman, R.C. Gergerich and R.R. Martin. 2006. A virus between families: Nucleotide sequence and evolution of *Strawberry latent ringspot virus*. *Virus Research* 121(2): 199-204.
-