รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : วิจัยอนุกรมวิธานชีววิทยาและการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

2. โครงการวิจัย : วิจัยอนุกรมวิธานชีววิทยาและการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โค้ดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติเพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

กิจกรรม : ศึกษาชีววิทยา นิเวศวิทยา ของศัตรูพืชและ ศัตรูธรรมชาติ (วงจรชีวิต การเข้าทำลาย พืชอาหาร และการแพร่กระจาย)

กิจกรรมย่อย : ศึกษาชีววิทยา และนิเวศวิทยาของโรคพืช

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การจำแนกชนิดเชื้อ *Crinivirus* ของพืชตระกูลแตงในประเทศไทย

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Identification of plant virus in the genus *Crinivirus* infecting cucurbitaceous plants in Thailand

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นายภูวนารถ มณีโชติ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : นางสุนัดดา เชาวลิต สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาววาสนา รุ่งสว่าง สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

นางสาววิจิตรา โชคบุญ สำนักวิจัยและพัฒนาการการเกษตรเขตที่ 6

5. บทคัดย่อ :

พืชตระกูลแตงเป็นพืชที่นิยมชนิดหนึ่งของประเทศไทยเพื่อใช้บริโภคและผลิตเมล็ดพันธุ์ โรคเส้นใบเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) และ *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) ไวรัสในสกุล *Crinivirus* เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ก่อความเสียหายต่อผลผลิตพริกในหลายประเทศ การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกชนิดของเชื้อ *Crinivirus* ที่เข้าติดเชื้อในพืชตระกูลแตง ในช่วงเดือนตุลาคม 2561 - กันยายน 2563 ได้เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา ฟักทอง มะระจีน และตำลึง ที่แสดงอาการเนื้อใบเหลือง ใบด่างและลำต้นแคระแกร็นในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม เชียงราย เชียงใหม่ จันทบุรี สระแก้ว และศรีสะเกษ จำนวน 110 ตัวอย่าง มาตรวจสอบหาเชื้อ *Crinivirus* ด้วยเทคนิค One step RT-PCR ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับบริเวณอนุรักษ์ของยีน RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) ของไวรัสในกลุ่ม *Crinivirus* ผลการตรวจด้วย เทคนิค One step RT-PCR ปรากฏว่าตรวจไม่เชื้อ *Crinivirus* จากตัวอย่างพืชตระกูลแตงทั้งหมดที่เก็บมาตรวจครั้งนี้

กรมวิชาการเกษตร

Abstract :

cucurbit plants are the most important vegetable crop in Thailand for domestic consumption and seed production. The criniviruses including *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) and *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) are the plant virus that caused yellowing symptoms and caused in high yield losses for cucurbit production. The aim of this research is to be identification of the criniviruses infected cucurbits based on biological and molecular characterization. During October 2019 – September 2020, the 137 samples of cucurbit plants including cucumber, pumpkin, Field pumpkin, bitter gourd, luffa and ivy gourd showing severe yellowing, chlorotic mottling, interveinal yellowing symptoms and stunting were collected from fields in Bangkok, Kanchanaburi, Suphan Buri, Nakhon Pathom, Chiang Rai, Chiang Mai, Chanthaburi, Sakaeo and Srisaket Province. Total RNAs of all samples were extracted and tested for *Crinivirus* infection by One step RT-PCR using universal primers which specific to conserved region on RNA-dependent RNA polymerase gene (RdRp) of criniviruses. By the RT-PCR result, criniviruses were not detected in all samples.

6. คำนำ

พืชตระกูลแตง เช่น แตงกวา ฟักทอง เมล่อน แตงโม แคนตาลูป สควอช และมะระ เป็นพืชที่มีการปลูกอย่างกว้างขวางทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยซึ่งมีการปลูกมากเพื่อใช้บริโภคและผลิตเมล็ดพันธุ์ส่งออก โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง การระบาดของโรคพืชโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญในการผลิตพืชตระกูลแตง เพราะทำให้พืชนั้นเกิดความเสียหายและผลผลิตลดลง ซึ่งถ้าหากพืชถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายในระยะต้นกล้าจะส่งผลให้ต้นพืชแคระแกรนหรือถ้าหากรุนแรงมากก็จะทำให้ต้นพืชตาย ซึ่งเชื้อไวรัสที่สำคัญของพืชตระกูลแตง ที่มีรายงานการระบาดในแหล่งปลูกในประเทศไทย เช่นไวรัสในกลุ่ม *Cucummovirus, Potyvirus, Tobamovirus, Tospovirus, Polerovirus* และ *Crinivirus* เป็นต้น เชื้อไวรัสในจีนัส *Crinivirus* ได้แก่ *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) และ *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV) พบว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลผลิตพืชตระกูลแตงลดลงอย่างมากและมีการระบาดตามพื้นที่ปลูกพืชตระกูลแตงทั่วโลก ทั้งในแถบเมดิเตอร์เรเนียน อเมริกา และเอเชียมากถึง 80-100% (Abou-Jawdah *et al*., 2000; Abrahamian *et al*., 2014; Marco and Aranda, 2005; Wintermantel *et al.,* 2009) โดยพืชที่ติดเชื้อจะแสดงอาการใบซีด จุดซีดระหว่างเส้นใบ ใบด่างลาย ใบเหลือง และลำต้นแคระแกรน การแพร่กระจายของโรคนี้เกิดขึ้นได้ง่ายและรวดเร็วโดยมีแมลงหวี่ขาว

กรมวิชาการเกษตร

(*Bemisia tabaci*) เป็นแมลงพาหะ (Kao *et al*., 2000; Louro *et al*., 2000; Orfanidou *et al.,* 2014)

สำหรับประเทศไทยข้อมูลของเชื้อ *Crinivirus* ยังมีน้อยมาก ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะจำแนกชนิดของเชื้อ *Crinivirus* ที่แยกจากพืชตระกูลแตง ศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาเกี่ยวกับอาการบนพืชอาศัยและพันธุกรรมของเชื้อ รวมทั้งวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเชื้อที่พบในแหล่งปลูกต่าง ๆ

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการโรคไวรัส
2. สารเคมี
   - ชุดไพรเมอร์สำหรับสังเคราะห์สารพันธุกรรมเชื้อไวรัส
   - ไนโตรเจนเหลว
   - ชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
   - One Step RT-PCR kit (Biotechrabbit, Germany)
   - 100 bp DNA Ladder with 6X Loading Dye (Biotechrabbit, Germany)
   - Agarose gel (SeaKem, USA)
   - RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (iNtRON Biotechnology, Korea)
   - 1X TAE Buffer
3. เครื่องมือและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์
   - โกร่งบดตัวอย่างพืช
   - เครื่องปั่นตกตะกอน Mini Spin (Eppendorf, USA)
   - เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ Pipetman Kit (Gilson, France)
   - อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
   - เครื่องควบคุมอุณหภูมิ Thermo cycler
   - เครื่องแยกสารพันธุกรรม Wide Mini-Sub Cell GT Basic System (Biorad, USA)
   - เครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System (BioRad, USA)
   - เครื่องผสมสาร Vortex mixer (Fisher Scientific, USA)
   - หลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร
   - หลอดไมโครทิวป์ขนาด 1.5 มล. และ 2 มล.

- วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการของโรค

สำรวจและเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่มีลักษณะอาการใบด่าง ใบเหลือง เส้นใบใส และเสียรูป จากแหล่งปลูกต่างๆ ได้แก่ จังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี นครปฐม

กรมวิชาการเกษตร

เชียงราย เชียงใหม่ จันทบุรี สระแก้ว และศรีสะเกษ โดยการสำรวจ ในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก ในกรณีที่พื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจแถวเว้นแถว พร้อมทั้งถ่ายภาพในแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบในแปลงปลูกและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืช

สกัดอาร์เอ็นเอรวมด้วยชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Purification Mini Kit (Favorgen, Taiwan) ตามคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

1. 1. ชั่งใบพืชตระกูลแตงแต่ละตัวอย่างให้มีปริมาณ 100 มิลลิกรัม แล้วบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมบัพเฟอร์ FARB ปริมาตร 500 มิลลิลิตรและเติม Mercaptoethanol ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

2. ย้ายส่วนของพืชมาใส่ Filter Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวใสใส่ใน Collection tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

3. เติม 70% Ethanol ปริมาตร 1 เท่าของทิ้งส่วนของเหลวใสที่ได้ ผสมให้เข้ากันแล้วย้ายมาใส่ใน FARB Mini Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใส

4. ล้างอาร์เอ็นเอครั้งที่ 1 ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลวใส จากนั้นล้างอาร์เอ็นเอครั้งที่ 2 ด้วย Wash Buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที

5. นำ FARB Column มาวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บอาร์เอ็นเอรวมที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3. ไพรเมอร์และการสังเคราะห์ยีน *CP* บางส่วน (3′ end of *CP* gene) และยีน *CP*

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ universal primers เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน RdRp บน RNA1 ของไวรัสในจีนัส *Crinivirus* ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 745 คู่เบส (Wintermantel and Hladky, 2010) ดังนี้

Forward primer CriniRdRp251F 5'- TNGGNAARGGNGARAG -3'

Reverse primer CriniRdRp995R 5'- GTRTTNGAYAACCAHGTRTTHG -3'

เมื่อมีตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ universal primers ก็จะนำมาตรวจหาชนิดของไวรัสด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CYSDV หรือ CCYV โดยจะเพิ่มปริมาณส่วนของยีน Hsp70h บน RNA2 ดังนี้

<u>เชื้อ CYSDV ได้ขนาดดีเอ็นเอ 749 คู่เบส (Abrahamian *et al*., 2013)</u>

Forward primer CY-HSPF 5'- AATCAGTTTGTGACAGTCTAGG -3'

Feverse primer CY-HSPR 5'- GGTTTCTTCTCGCACTCCA -3'

กรมวิชาการเกษตร

เชื้อ CCYV ได้ขนาดดีเอ็นเอ 462 คู่เบส (Okuda *et al.*, 2010)

Forward primer CY-HSPF 5'- AATCAGTTTGTGACAGTCTAGG -3'

Reverse primer CY-HSPR 5'- GGTTTCTTCTCGCACTCCA -3'

ส่วนผสมของ One step RT-PCR ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

Nuclease free water	5	ไมโครลิตร
2x One step Mix	10	ไมโครลิตร
10 pmole Pol3870F	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole AS3	0.5	ไมโครลิตร
20x RT-RI Blend	1	ไมโครลิตร
RNA template	3	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) First strand synthesis	50 °C	20 นาที
Predenaturation	95 °C	2 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	95 °C	20 วินาที
Annealing	55 °C	20 วินาที
Extension	72 °C	45 วินาที
3) Final extension	72 °C	5 นาที

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม Redsafe Nucleic Acid Straining Solution ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 30 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, USA)

4. การโคลนยีน

แยกดีเอ็นเอผลผลิตออกจากเจลโดยใช้ชุดสำเร็จรูป FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit (Favorgen, Taiwan) ตามขั้นตอนของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบขนาดและปริมาณดีเอ็นเอที่ได้ด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis เชื่อมต่อดีเอ็นเอเข้ากับ พลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy (Promega, USA) โดยเติมดีเอ็นเอ 150 นาโนกรัม, T4 DNA ligase buffer ปริมาตร 10 ไมโครลิตร, pGEM-T easy vector 50 นาโนกรัม และ T4 DNA ligase 3 Units รวมปริมาตรสาร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C นานข้ามคืน นำพลาสมิดลูกผสมเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* (*E. coli*) สายพันธุ์ JM109ด้วยวิธี heat shock transformation คัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอไวรัส ด้วยวิธี blue-white selection แล้วตรวจสอบโคลนของพลาสมิดสายผสมที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR โดยนำเซลล์แบคทีเรียที่ให้โคโลนีสีขาวจำนวน 10 โคโลนีและสีฟ้า 1

กรมวิชาการเกษตร

โคโลนี มาผสมน้ำปริมาตร 8 ไมโครลิตรใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วตรวจสอบยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ *Crinivirus*

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนโปรตีน CP

วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Blast) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ *Crinivirus* ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ *Crinivirus* ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar *et al*., 2018)

6. การศึกษาการตอบสนองของพืชอาศัยต่อเชื้อไวรัส

ศึกษาลักษณะอาการของเชื้อไวรัสบนพืชอาศัยต่าง ๆ ได้แก่ แตงกวา แตงโม เมลอน ซุกินี่ และฟักทอง เป็นต้น โดยนำแมลงหวี่ขาวที่ปราศจากเชื้อไวรัสมาปล่อยลงบนต้นพืชที่มีเชื้อ *Crinivirus* เพื่อให้ดูดกินน้ำเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายแมลงหวี่ขาวมาปล่อยลงบนต้นพืชปกติที่ปราศจากเชื้อไวรัส จำนวน 10 ตัวต่อต้น นาน 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการกำจัดแมลงหวี่ขาวโดยการพ่นสารเคมีกำจัดแมลงหวี่ขาวแล้วนำต้นพืชมาเก็บไว้ในกรงกันแมลง

การบันทึกผลโดยบันทึกระยะเวลาที่ต้นพืชทดสอบแสดงแสดงอาการของโรค บันทึกลักษณะอาการที่ปรากฏบนพืช และบันทึกภาพอาการที่ปรากฏ จากนั้นนำพืชทอดสอบมาตรวจหาเชื้อ *Crinivirus* ในต้นพืชด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ตามวิธีการข้อ 3

เวลาที่ทำการทดลอง - ตุลาคม 2561 - กันยายน 2563

สถานที่ทำการทดลอง 1. แปลงปลูกแตงกวาและพืชตระกูลแตงในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี สุพรรณบุรี เชียงราย เชียงใหม่ สระแก้ว และศรีสะเกษ

2. ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานไวรัสวิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ตัวอย่างพืชตระกูลแตงและการตรวจสอบหาเชื้อ *Crinivirus* ด้วยเทคนิค One Step RT-PCR

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตง ได้แก่ แตงกวา (ภาพที่ 1) มะระ (ภาพที่ 2 ก-ข) บวบ (ภาพที่ 2 ค-ง) ฟักทอง (ภาพที่ 2จ) ฟักแฟง (ภาพที่2ฉ) และ ตำลึง (ภาพที่2 ช-ณ) ที่แสดงอาการเส้นใบใส ใบด่าง ใบเหลืองและเสียรูปทรงในจังหวัดกรุงเทพมหานคร กาญจนบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี เชียงราย เชียงใหม่ สระแก้ว และศรีสะเกษ รวมตัวอย่างทั้งสิ้น 178 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) มาตรวจสอบด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ด้วย

กรมวิชาการเกษตร

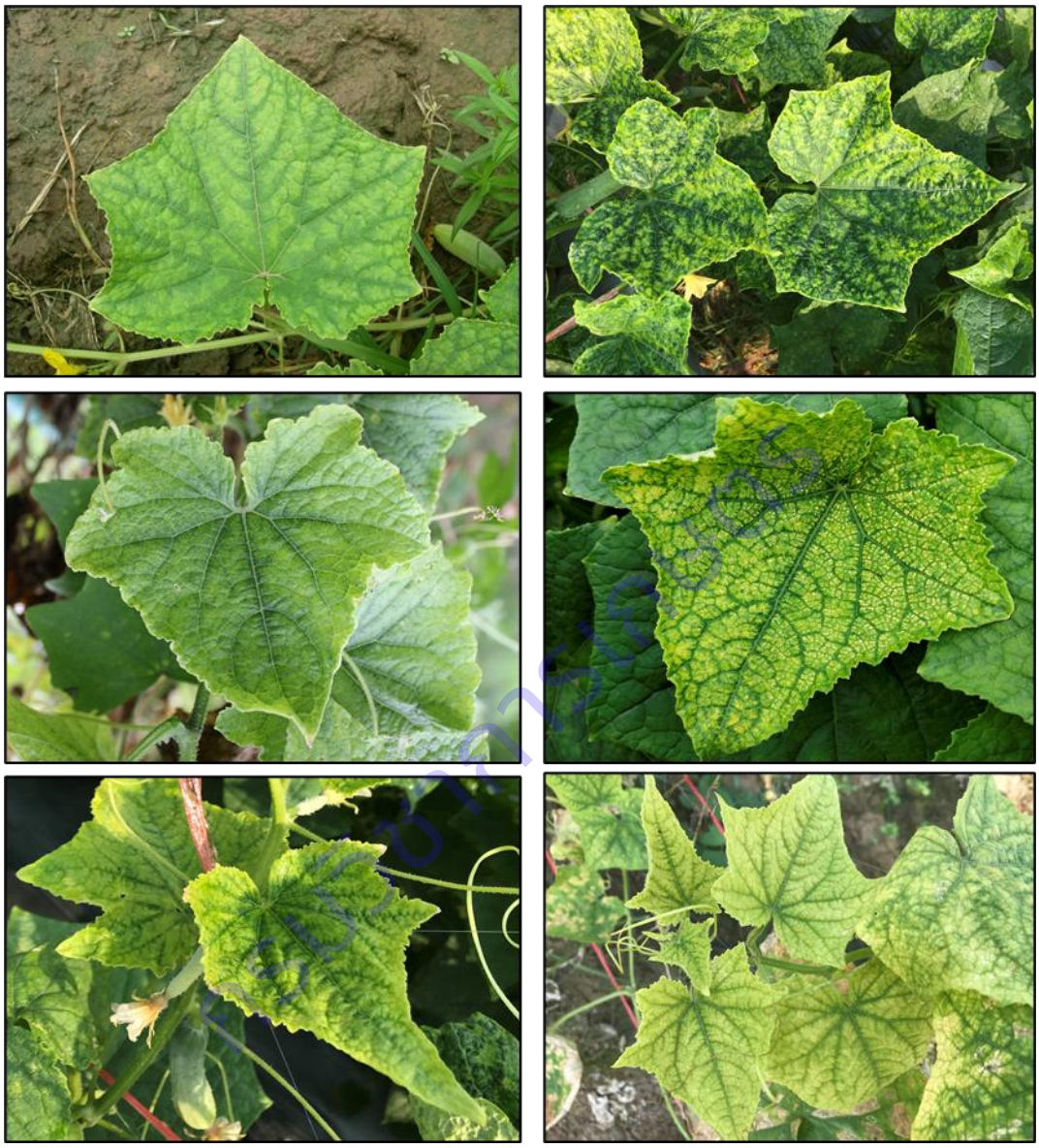
universal primers ของเชื้อไวรัสในกลุ่ม เชื้อ *Crinivirus* ผลปรากฏว่า ไม่พบแถบดีเอ็นเอเชื้อไวรัสในทุกตัวอย่าง

พืชตระกูลแตงนั้นมีรายงานไวรัสที่สามารถเข้าทำลายได้มากกว่า 70 ชนิด (Lecoq, 2003) เช่น *Watermelon mosaic virus* (WMV), *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV), *Cucurbit chlorotic yellows virus* (CCYV), *Beet pseudo-yellows virus* (BPYV) เป็นต้น (Orfanidou *et al*., 2019: Alicia Pozzi *et al*., 2020) ซึ่งไวรัสดังกล่าวจะทำให้พืชแสดงอาการใบด่างหรือเหลือง เส้นใบใส เสียรูปทรง ข้อปล้องสั้น และลำต้นแคระแกร็น หากเป็นการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสหลายชิดก็จะยิ่งทำให้อาการของโรครุนแรงมากขึ้น

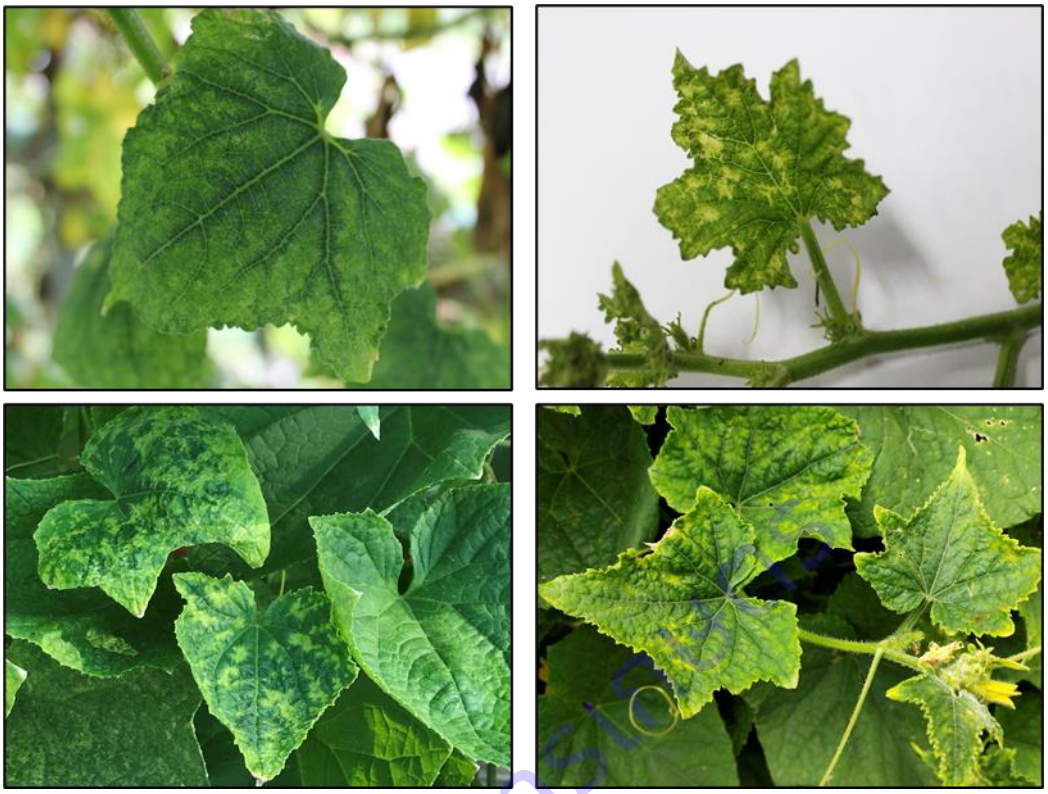
ตารางที่ 1 ผลตรวจหาเชื้อ *Crinivirus* ด้วยเทคนิค One Step RT-PCR ในตัวอย่างพืชตระกูลแตง ที่เก็บจากแปลงปลูกใน 9 จังหวัด

จังหวัด	จำนวนตัวอย่าง	ผลการตรวจวิเคราะห์
กรุงเทพมหานคร	25	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
กาญจนบุรี	25	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
สุพรรณบุรี	18	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
นครปฐม	15	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
เชียงราย	30	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
เชียงใหม่	20	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
จันทบุรี	15	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
สระแก้ว	36	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
ศรีสะเกษ	27	ไม่พบเชื้อ *Crinivirus*
รวมทั้งสิ้น	**178**	

ศรีวิชาการเกษตร

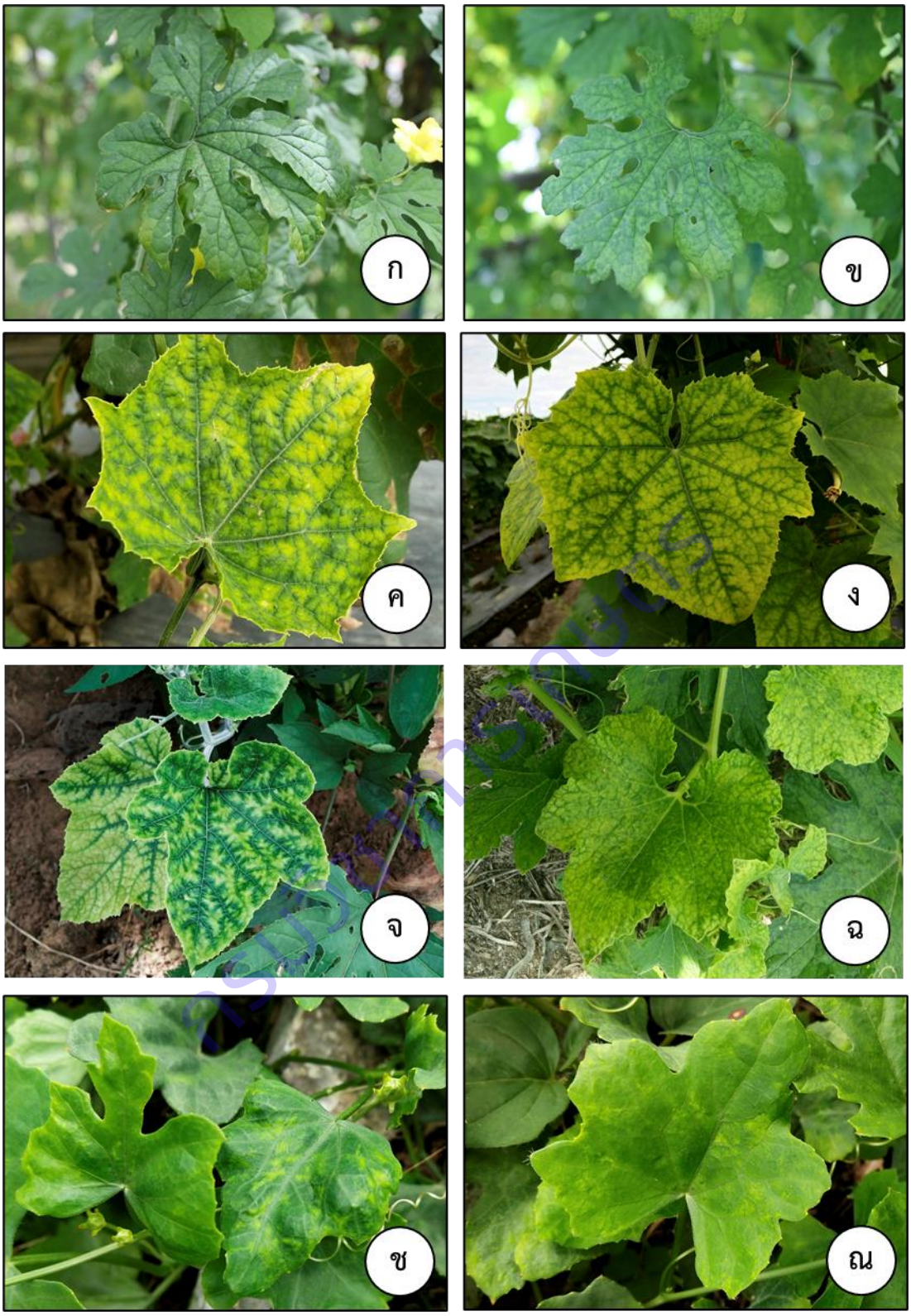


ภาพที่ 1 แตงกวาที่แสดงอาการใบด่าง ใบด่างประ เส้นใบใส เนื้อใบเหลือง คล้ายอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ *Crinivirus* ที่พบในแปลงปลูก



ภาพที่ 1 (ต่อ)

กรมวิชาการเกษตร



ภาพที่ 2 พืชตระกูลแตงที่แสดงอาการใบด่าง ใบด่างประ เส้นใบใส เนื้อใบเหลือง คล้ายอาการของโรค

ที่

เกิดจากเชื้อ *Crinivirus* ที่พบในแปลงปลูก ได้แก่ (ก-ข): มะระ, (ค-ง): บวบเหลี่ยม, (จ): ฟักทอง,

(ฉ): ฟักแฟง และ (ช-ณ): ตำลึง

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการตรวจไม่พบเชื้อ *Crinivirus* จากตัวอย่างพืชตระกูลแตงที่แสดงอาการอาการเส้นใบและใบเหลือง ทั้ง 110 ตัวอย่างนั้น อาจเนื่องมาจากว่าลักษณะอาการของโรคที่พบเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น ๆ ซึ่งพบว่ามีเชื้อไวรัสมากกว่า 70 ชนิด ที่สามารถเข้าติดเชื้อในพืชตระกูลแตงได้ ดังนั้นหากต้องการตรวจหาเชื้อ *Crinivirus* จะต้องเก็บตัวอย่างพืชมาตรวจให้มากกว่านี้ และควรเก็บตัวอย่างในพื้นที่ให้มากขึ้นในหลายจังหวัดที่มีการปลูกพืชตระกูลแตง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแหล่งปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่เป็นแหล่งปลูกและผลิตเมล็ดพันธุ์ที่ใหญ่ที่สุดของประเทศ สำหรับวิธีการตรวจสอบต้องอาศัยวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น เทคนิค Next Generation Sequencing (NGS) มาใช้มในการตรวจสอบ

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

1. เป็นข้อมูลยืนยันสถานภาพกมารไม่ปรากฏของเชื้อ Crinivirus ในพืชตระกูลแตงใชช่วงระหว่างที่มีการศึกษาวิจัย ตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2562-กันยายน 2563

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

12. เอกสารอ้างอิง

Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., Fayad, A., Lecoq, H., Delécolle, B., Trad-Ferré, J., 2000. C*ucurbit yellow stunting disorder virus*: A new threat to cucurbits in Lebanon. *J. Plant Pathol.* 80(1), 55-60.

Abrahamian, P.E., Abou-Jawdah, Y., 2014. Whitefly-transmitted criniviruses of cucurbits: current status and future prospects. *Virus Dis.* 25(1), 26-38.

Abrahamian, P.E., Seblani, R., Sobh, H. and Abou-Jawdah, Y., 2013. Detection and quantitation of two cucurbit criniviruses in mixed infection by real-timeRT-PCR. *J. Virol. Methods* 193(2): 320-326.

Pozzi, A.E., Bruno, C., Luciana, C.E., Celli, M.G., Conci, V.C. and Perotto, M.C. 2020. Relative incidence of cucurbit viruses and relationship with bio-meteorological variables. *Australas. Plant Pathol*. 49: 167–174.

Kao, J., Jia, L., Tian, T., Rubio, L., and Falk, B.W., 2000. First report of *Cucurbit yellow stunting disorde rvirus* (Genus *Crinivirus*) in North America. *Plant Dis*. 84(1): 101-101.

กรมวิชาการเกษตร

Kumar, S., Stecher, G., Li. M, Knyaz, C, and Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol*. 35(6): 1547-1549.

Lecoq, H. 2003. Cucurbits. In G. Loebenstein, and G. Thottapilly (Eds.), Virus and virus-like diseases of major crops in developing countries (pp. 665–688). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Louro, D., Vicente, M., Vaira, A.M., Accotto, G.P. and Nolasco, G., 2000. *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (Genus *Crinivirus*) Associated with the yellowing disease of cucurbit crops in Portugal. *Plant Dis*. 84(10): 1156-1156.

Marco, C.F. and Aranda, M.A., 2005. Genetic diversity of a natural population of *Cucurbit yellow stunting disorder virus*. *J. Gen. Virol*. 86(Pt 3): 815-822.

Okuda, M., Okazaki, S., Yamasaki, S., Okuda, S. and Sugiyama, M., 2010. Host range and complete genome sequence of *Cucurbit chlorotic yellows virus*, a new member of the genus *Crinivirus*. *Phytopathology* 100(6): 560-566.

Orfanidou, C., Maliogka, V.I. and Katis, N.I., 2014. First report of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in cucumber, melon, and watermelon in Greece. *Plant Dis.* 98(10): 1446-1446.

Wintermantel, W.M. and Hladky, L.L., 2010. Methods for detection and differentiation of existing and new crinivirus species through multiplex and degenerate primer RT-PCR. J. Virol. Methods 170(1-2): 106-114.

Wintermantel, W.M., Hladky, L.L., Cortez, A.A., Natwick, E.T., 2009. A new expanded host range of *Cucurbit yellow stunting disorder virus* includes three agricultural crops. Plant Dis. 93(7): 685-690.

ลิขสิทธิ์กรมวิชาการเกษตร