การถ่ายทอดเชื้อ *Columnea latent viroid* ผ่านทางเมล็ดของแตงกวา
Seed Transmission of *Columnea latent viroid* in cucumber

กนกมณี ตันสุวรรณ[1/] คนึงนิตย์ เหรียญวรากร[1/, 2/, 3*]
Kanokmanee Tansuwan[1/] Kanungnit Reanwarakorn[1/, 2/, 3*]

ABSTRACT

Columnea latent viroid (CLVd) seed transmission was studied in 6 cucumber varieties by inoculating CLVd on 5 seedlings of each variety. Inoculated plants were conrmed the CLVd-infection by Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR) technique. Cucurbit seeds were harvested from 30-35 days mature fruits after cross pollination of the infected plants. The cucurbit seeds were determined for the presence of 370 bp DNA fragment of CLVd to confirm seed transmission. The results showed that 7 samples of 3 varieties were 0.19 – 1.77% seed transmission. All PCR products of the CLVd positive samples were sequenced and aligned with GenBank database for sequence homology. They were 367-369 nucleotides in size and 97-99% sequence similarity with CLVd isolates. The results indicate that CLVd was seed transmission in cucumber plants.

Key words : viroid, cucurbit, seed transmission

[1/] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
[1/] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand
[2/] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
[2/] Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand
[3/] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900
[3/] Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand
*Corresponding author: Email: agrknr@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะการถ่ายทอดเชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) ผ่านทางเมล็ดของแตงกวาและแตงร้านรวม 6 สายพันธุ์ โดยปลูกเชื้อ CLVd ลงบนแตงกวาและแตงร้านสายพันธุ์ละ 5 ต้น ตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยเทคนิค Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR) จากนั้น เก็บเมล็ดจากผลแตงที่มีอายุประมาณ 30 – 35 วัน ภายหลังจากการผสมเกสรแบบข้าม (cross pollination) แล้วนำเมล็ดที่ได้จากต้นที่ติดเชื้อมาเพิ่มปริมาณ DNA ขนาด 370 bp ของเชื้อ CLVd เพื่อประเมินการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของไวรอยด์ในแตงกวาและแตงร้าน จากการตรวจ พบว่า มีเมล็ดที่ติดเชื้อจำนวน 7 ตัวอย่าง จากแตงกวาและแตงร้านรวม 3 สายพันธุ์ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อ คือ 0.19 – 1.77% นำผลผลิต PCR ของตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อทั้ง 7 ตัวอย่าง ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันการติดเชื้อ พบว่า เชื้อมีความยาว 367 - 369 นิวคลีโอไทด์ และนำผลมาเปรียบเทียบกับข้อมูลใน GenBank มีความเหมือนกับเชื้อ CLVd ที่ 97 – 99% จากการทดลองในครั้งนี้สรุปว่าเชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดในแตงกวาได้

คำสำคัญ : ไวรอยด์, พืชตระกูลแตง, การถ่ายทอดทางเมล็ด

บทนำ

แตงกวา (Cucumber) หรือ *Cucumis sativus* L. จัดให้อยู่ในวงศ์ *Cucurbitaceae* ซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับ แตงโม ฟักทอง แคนตาลูป มะระ และบวบต่าง ๆ (กมล, 2536) ปี พ.ศ. 2559 ประเทศไทยมีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์แตงกวาปริมาณ 10,563.29 กก. คิดเป็นมูลค่า 26,328,511.75 บาท และมีการส่งออกแตงกวาปริมาณ 64,917.87 กก. คิดเป็นมูลค่า 298,199,457.89 บาท นอกจากนี้มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์ควบคุมของแตงร้านในปริมาณ 18,507.98 กก. คิดเป็นมูลค่า 43,689,631.26 บาท และมีปริมาณการส่งออก 22,543.33 กก. คิดเป็นมูลค่า 83,473,427.20 บาท ประเทศไทยส่งออกเมล็ดแตงกวาและแตงร้านไปยังประเทศ อินเดีย บังคลาเทศ เวียดนาม ศรีลังกา กัมพูชา เนเธอร์แลนด์ ญี่ปุ่น พม่า และจีน (สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย, 2559) แตงกวาเป็นผักที่นิยมปลูกกันแพร่หลายทั่วทุกภาคของประเทศ มีอายุเก็บเกี่ยวสั้น จึงทำรายได้ให้กับผู้ปลูกในช่วงระยะเวลาที่สั้น ได้ดีกว่าพืชอีกหลายชนิด เป็นผักที่ปลูกได้ตลอดทั้งปี แต่เกษตรกรนิยมปลูกในช่วงฤดูฝน เนื่องจากเจริญเติบโตเร็วกว่าฤดูอื่น ดังนั้นในการปลูกแตงกวามักจะพบปัญหาเกี่ยวกับโรคที่เกิดจากเชื้อรา เช่น โรครากเน่าโคนเน่า โรคราน้ำค้าง (ภูมิปัญญาเกษตรไทย, 2560) นอกจากนี้ยังพบเชื้อแบคทีเรีย เชื้อไวรัส และเชื้อไวรอยด์ ซึ่งเชื้อไวรอยด์ที่เป็นสาเหตุสำคัญ ก่อให้เกิดโรคในแตงกวา ได้แก่ *Hop stunt viroid* (HSVd) *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd) และ *Columnea latent viroid* (CLVd)

เชื้อ CLVd จัดอยู่ในวงศ์ *Pospiviroidae* สกุล *Pospiviroid* ตรวจพบใน *Columnea erythrophea* ที่ไม่แสดงอาการ ซึ่งปลูกในเชิงการค้าในรัฐแมรี่แลนด์ เมื่อเชื้อถ่ายทอดสู่มะเขือเทศสายพันธุ์ Rutgers จะแสดงอาการใบม้วนงอ ต้นเตี้ยแคระเหมือนกับที่ได้รับเชื้อ *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) แต่อาการรุนแรงน้อยกว่า (Owens *et al*., 1978) Hammond *et al*., (1989) ได้ศึกษาพืชอาศัย ได้แก่ มะเขือเทศ Gynura ยาสูบ และแตงกวา พบว่า เชื้อ CLVd

สามารถทำให้มะเขือเทศ และแตงกวา แสดงอาการใบม้วนงอ ลดรูป และต้นเตี้ยแคระ ซึ่งคล้ายคลึงกับอาการที่พบในมันฝรั่ง นอกจากนี้ยังพบอาการเซลล์ตายเฉพาะจุด (Singh, 1973; Singh and Clark, 1973; Walter, 1981) สำหรับการถ่ายทอดเชื้อไวรอยด์มีรายงาน พบว่า เชื้อ PSTVd สามารถถ่ายทอดด้วยวิธีกล ทางละอองเรณู (pollen) และผ่านทางเมล็ด (seed transmission) ในมะเขือเทศและมันฝรั่ง (Benson and Singh, 1964; Singh, 1970; Gross *et al.,* 1978) และพบว่า เชื้อ *Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd) สามารถติดไปกับเมล็ด (seed borne) ในมะเขือเทศและสามารถตรวจพบเชื้อทั้งในเมล็ด และต้นกล้าของมะเขือเทศในเปอร์เซ็นต์ที่สูง (Singh and Dilworth, 2009) ศศิประภา (2551) รายงานว่าเชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีกลในมะเขือเทศและมันฝรั่ง และพบว่า ถ่ายทอดทางเมล็ดของมะเขือเทศได้ Matsushita and Tsuda (2016) ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดผ่านเมล็ดของเชื้อ CLVd โดยทดสอบในมะเขือเทศ (*Solanum lycopersicum*) มะเขือ (*Solanum melongena*) และเก๊กฮวย (*Glebionis coronaria*) พบว่า พืชที่มีการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดคือ มะเขือเทศซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อที่ 5.3 – 100% สำหรับการทดลองในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการถ่ายทอดของเชื้อ CLVd ผ่านทางเมล็ดแตงกวาและแตงร้าน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพิ่มปริมาณเชื้อ CLVd สำหรับใช้ในงานทดลอง

นำเชื้อ CLVd isolate NK – KUKPS1 (370 nt, accession no. KY235369, Reanwarakorn *et al*., 2017) ไปเพิ่มปริมาณบนมะเขือเทศพันธุ์สีดาทิพย์ 4 โดยนำใบมะเขือเทศที่ติดเชื้อไปบดใน 0.1 M phosphate buffer pH 9.0 (เติม 0.1% Na_2SO_3 ก่อนใช้) ในอัตราส่วนใบพืช 0.1 ก. ต่อ phosphate buffer 1 มล. จากนั้นเติมผงคาร์โบรันดัม ปริมาณ 0.05% ในน้ำคั้นพืช เพื่อเป็นตัวทำให้เกิดบาดแผล นำน้ำคั้นที่ได้ไปปลูกเชื้อลงบนใบมะเขือเทศที่เตรียมไว้ หลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 5 นาที ล้างใบด้วยน้ำกลั่น สังเกตลักษณะอาการประมาณ 7-14 วัน หลังจากปลูกเชื้อ และนำใบมาตรวจด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อยืนยันการติดเชื้อ

2. การปลูกเชื้อ CLVd บนแตงกวาพันธุ์การค้า

ปลูกเชื้อ CLVd บนแตงกวาพันธุ์การค้าที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 6 สายพันธุ์ แบ่งเป็นแตงกวาผลสั้น จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ แม่วัง (Maewang) บงกช (Bongkot) ภูฏาณ (Poothan) และพุ่มชบา (Pumchaba) แตงกวาผลยาวหรือแตงร้าน จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ นาโต้ (Nato) และ โอพี (OP) โดยปลูกเชื้อ CLVd ให้กับแตงกวาที่มีอายุประมาณ 14 วัน คือ มีใบจริง 1 – 2 ใบ สายพันธุ์ละ 5 ต้น และทำการผสมเกสรแบบข้าม (cross pollination) ภายในพันธุ์เดียวกันให้กับแตงกวาเมื่อออกดอกเพศเมียชุดแรก เพื่อเก็บผลผลิตสำหรับใช้ในการทดสอบการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของแตงกวาและแตงร้าน หลังจากนั้นตรวจสอบการติดเชื้อด้วยเทคนิค Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR) ภายหลังจากปลูกเชื้อแล้วในสัปดาห์ที่ 6

3. การทดสอบการติดเชื้อไปกับเมล็ด (seed borne) และการถ่ายทอดเชื้อ (seed transmission) ของเชื้อ CLVd

สุ่มเมล็ดจากต้นที่ติดเชื้อจากทุกสายพันธุ์

เพาะลงในกล่องพลาสติกใส ที่มีกระดาษกรองเปียกเพื่อให้ความชื้น เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ให้เมล็ดงอก นำต้นกล้าแตงกวามาแยกออกเป็น 2 ส่วน คือ ต้นอ่อน (seedling) และเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) จากนั้นนำทั้ง 2 ส่วนไปแยกสกัดอาร์เอ็นเอ โดยรวมตัวอย่างก่อนทำการสกัดจำนวน 5 ต้นอ่อน หรือเปลือกหุ้มเมล็ด เป็น 1 ตัวอย่าง เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค RT-PCR

4. การตรวจหาเชื้อ CLVd ด้วยเทคนิค Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบโดยเทคนิค RT–PCR ด้วยเครื่อง Thermal cycler เพื่อเพิ่มปริมาณกรดนิวคลิอิก โดยใช้ไพรเมอร์ CL-P2 (ศศิประภา, 2551) คู่ไพรเมอร์ คือ cCL-P2 : 5’ CTG CAG CCA TGC AAA GA 3’ และ hCL-P2 : 5’ GGT CAG GTG TGA ACC AC 3’ จากนั้นตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis ใช้ 2% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ในสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ และนำไปตรวจดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel documentation UV-transiluminator

5. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำดีเอ็นเอผลผลิตของ PCR ที่ได้มาแยกขนาด โดยใช้ 2% agarose gel ใน 0.5X TBE buffer ก่อนเทเจล เติม SYBR® Safe DNA Gel Stain (ใช้ปริมาตร 1 ไมโคลิตร ใน 2% agarose gel ละลายใน 0.5X TBE buffer ปริมาตร 10 มล.) เพื่อย้อมเจลให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง LED illuminator ตัดเฉพาะแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 370 นิวคลีโอไทด์ ใส่หลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มล. ชั่งน้ำหนักเจลไม่เกิน 400 มก. นำมาแยกดีเอ็นเอโดยใช้ The FavorPrepTM Gel/PCR Purication Kit (FAVORGEN®) ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต ตรวจสอบขนาดและปริมาณของดีเอ็นเอ ที่ได้อีกครั้งด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยนำดีเอ็นเอของเชื้อไวรอยด์ที่ได้ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง คือ EBK1-15, ShOP4-136, EOP3-239, ShPT5-23, ShPT5-29, RPT5-19 และ RPT5-20 ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของเชื้อไวรอยด์ที่มีรายงานใน GenBank ด้วยโปรแกรม Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE__TYPE=BlastSearch)

6. การตรวจสอบเชื้อ CLVd โดยใช้พืชทดสอบ (Bioassay)

นำ RNA ของตัวอย่างที่ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จำนวน 7 ตัวอย่าง (EBK1-15, ShOP4-136, EOP3-239, ShPT5-23, ShPT5-29, RPT5-19 และ RPT5-20) มาละลายใน Phosphate buffer pH 9.0 ในอัตราส่วน RNA 10 ไมโครลิตร ต่อ Phosphate buffer pH 9.0 40 ไมโครลิตร มาปลูกเชื้อลงบนต้นกล้ามะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ที่มี 1-2 ใบจริง โดยใช้ผงคาร์โบรันดัมในการทำแผลที่ใบพืชก่อนการปลูกเชื้อ หลังการปลูกเชื้อสังเกตลักษณะอาการผิดปกติของมะเขือเทศ มีลักษณะอาการเส้นใบไหม้ ใบหงิกผิดรูป ต้นเตี้ยแคระ ยืนยันการติดเชื้อด้วยเทคนิค RT – PCR ในสัปดาห์ที่ 4, 8 และ 12

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การติดเชื้อ (seed borne) และการถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ด (seed transmission) ของเชื้อ CLVd

การตรวจเชื้อ CLVd ในต้นอ่อน (seedling) และ เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) ของแตงกวาแตงร้านทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ พบว่า ตรวจพบเชื้อ CLVd เฉพาะบริเวณต้นอ่อน แต่ไม่พบเชื้อที่เปลือกหุ้มเมล็ด (Table 1) แตงกวาสายพันธุ์บงกช ตรวจพบเชื้อที่ต้นอ่อนจำนวน 1 ตัวอย่าง (Figure 1) จาก 60 ตัวอย่าง (bulked sample) ที่ตรวจ ซึ่งเท่ากับ 300 (60 x5) เมล็ดที่ถูกนำมาตรวจ แสดงว่า ต้นอ่อนอย่างน้อย 1/300 (0.33%) หรืออย่างมาก 5/300 (1.67%) ที่ติดเชื้อ CLVd ขณะที่แตงกวาพันธุ์ภูฏาณ ตรวจพบเชื้อจำนวน 4 ตัวอย่าง (Figure 2) จาก 226 ตัวอย่าง ซึ่งเท่ากับ 1,130 (226 x 5) เมล็ดที่ถูกนำมาตรวจ แสดงว่า มีต้นอ่อนอย่างน้อย 4/1,130 (0.35%) หรืออย่างมาก 20/1,130 (1.77%) ที่ติดเชื้อ CLVd ดังนั้น ในแตงกวาพันธุ์ภูฏาณจึงพบการติดเชื้อที่ต้นอ่อนคิดเป็น 0.35 - 1.77% และพบว่า แตงร้านพันธุ์โอพี ตรวจพบเชื้อจำนวน 2 ตัวอย่าง (Figure 3) จาก 214 ตัวอย่าง ซึ่งเท่ากับ 1,070 (214 x 5) เมล็ดที่ถูกนำมาตรวจ พบการติดเชื้อ CLVd คิดเป็น 0.19 - 0.93% การตรวจด้วยวิธีนี้ทำให้สามารถระบุได้ว่าเชื้อที่ตรวจพบอยู่ในส่วนต้นอ่อน ซึ่งมีความสอดคล้องกับการรายงานของ Matsushita and Tsuda (2016) ที่พบเชื้อ PSTVd ที่บริเวณคัพภะ (embryo) ในมะเขือเทศ และรายงานว่าเชื้อ CLVd มีการถ่ายทอดทางเมล็ด (seed transmission) ในมะเขือเทศได้ 5.3 – 100% แต่ไม่พบในมะเขือ (*Solanum melongena*) และเก๊กฮวย (*Glebionis coronaria*)

Table 1 RT – PCR results of seed coats and seedlings of germinated cucumber seeds from CLVd infected cucumber plants

Variety	No. of bulked sample[a]		CLVd detected sample[b]		% Infection
	Seed coat	Seedling	Seed coat	Seedling	
Maewang	88	88	0/88	0/88	
Bongkot	60	60	0/60	1/60	1.67
Pumchaba	20	20	0/20	0/20	
Poothan	226	226	0/226	4/226	1.77
OP	214	214	0/214	2/214	0.93
Nato	49	49	0/49	0/49	

[a] total number of tested samples with 5 bulked seedlings or seed coats for a tested sample

[b] CLVd detected bulked-samples / total number of tested bulked-samples

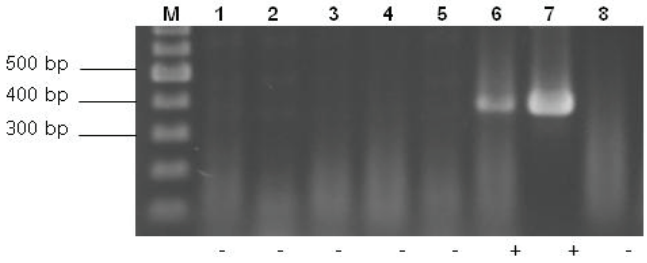

Figure 1 RT – PCR results of CLVd detection with CL-P2 primers of cucumber seedling cultivar Bongkot: M = molecular weight markers, 1 and 8 = healthy cucumber seedling cultivar Bongkot, 2 – 6 = germinated seedlings of seeds from CLVd infected cucumber plants and 7 = CLVd infected tomato leaves (positive control)

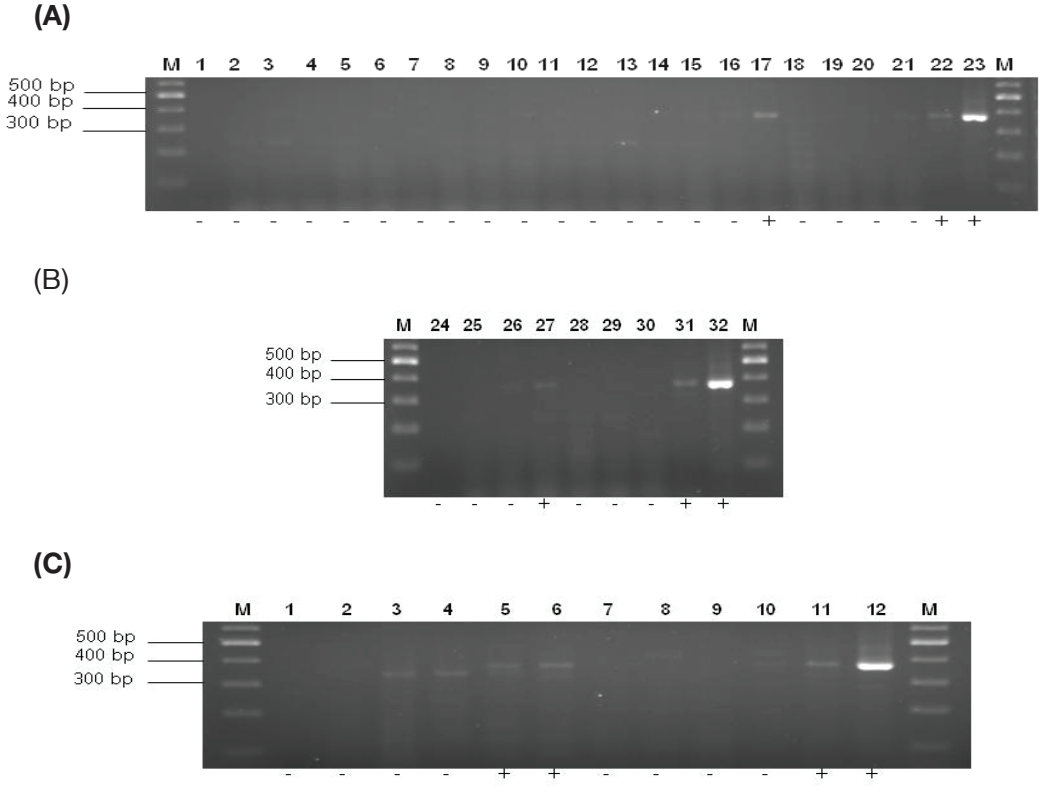

Figure 2 RT – PCR results of CLVd detection with CL-P2 primers of cucumber seedling cultivar Poothan: M = molecular weight markers, 1 = buffer, 2 = healthy cucumber seedling cultivar Poothan, 3 – 21 (A), 26 – 30 (B) and 3-10 (C) = germinated seedlings of seeds from CLVd infected cucumber plants, 22 (A), 31(B) and 11 (C) = CLVd infected cucumber leaves (positive control) and 23 (A), 32 (B) and 12 (C) = CLVd infected tomato leaves (positive control)

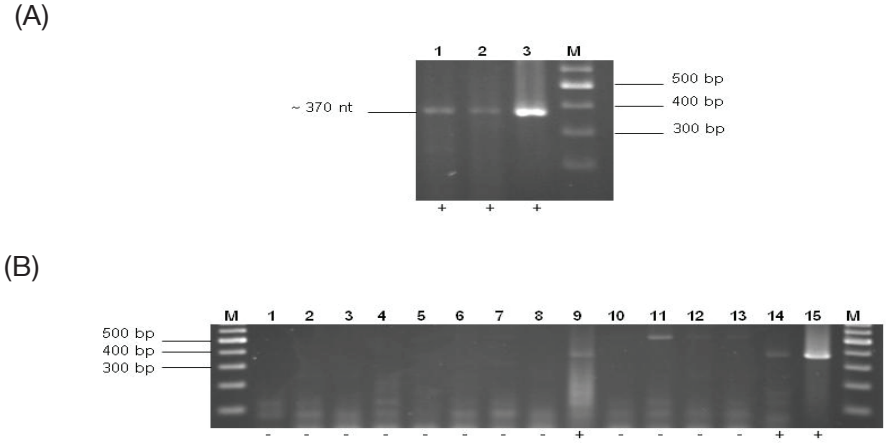

Figure 3 RT – PCR results of CLVd detection with CL-P2 primers of cucumber seedling cultivar OP: M = molecular weight markers, 1(B) = buffer, 2-5 (B) = healthy cucumber seedling cultivar OP, 1 (A) and 6 – 13 (B) = germinated seedlings of seeds from CLVd infected cucumber plants, 2 (A) and 14 (B) = CLVd infected cucumber leaves (positive control) and 3 (A) and 15 (B) = CLVd infected tomato leaves (positive control)

2. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการนำตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อไวรอยด์ที่เพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT – PCR ทั้งหมด 7 ตัวอย่าง คือ EBK1-15, ShOP4-136, EOP3-239, ShPT5-23, ShPT5-29, RPT5-19 และ RPT5-20 ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า มีขนาด 367, 368 และ 369 นิวคลีโอไทด์ นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ มาวิเคราะห์เปรียบเทียบหาเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของเชื้อ CLVd กับฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank (Figure 4) โดยใช้โปรแกรม Blastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE__TYPE=BlastSearch) พบว่า มีความเหมือนกับเชื้อ CLVd ไอโซเลต Rutgers 3 (Accession No. JF742635), Solanum 4 (Accession No. JF742633), Prayong-16 (Accession No. KC143294), Solanum 1 (Accession No. JF742632), LP4-7c4 (Accession No. JF446928), Chaipayon-16 (Accession No. KM214217), Solanum 16 (Accession No. JF742634) และ Rutgers 9 (Accession No. JF742636) ระหว่าง 97 – 99% จากการพิจารณาความเหมือน โดยทั่วไปจะพิจารณาค่า identity เป็นหลัก มีเกณฑ์ว่า ถ้าค่า identity อยู่ในระดับสูงกว่า 90% ขึ้นไปจะถือว่าเชื้อไวรอยด์ดังกล่าวเป็นชนิดเดียวกันกับเชื้อไวรอยด์ที่นำมาเปรียบเทียบ แต่ถ้าต่ำกว่า 90% ลงมา จะถือว่าเป็นไวรอยด์ต่างชนิดกัน (ปริเชษฐ์, 2548) ซึ่งการเปรียบเทียบในครั้งนี้ได้ค่า identity ของเชื้อทั้ง 7 โคลน กับเชื้อ CLVd ในฐานข้อมูล GenBank ที่ 97 – 99% (Table 2) จึงสรุปได้ว่า เชื้อไวรอยด์ทั้ง 7 ตัวอย่าง ที่พบในต้นอ่อนแตงกวา เป็นเชื้อ CLVd ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์อยู่ที่ 367- 369 นิวคลีโอไทด์

```
EBK1-15     CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAA     60
Rutgers3    CGGAACTAAACTCGTGGTTCCTGTGGTTCACACCTGACCCTGCAGCCATGCAAAGAAAAA     60
            ************************************************************

EBK1-15     AAGAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG     120
Rutgers3    AAGAACGGGAGGAAGAGCGCAAAGAGCGGTCTCAGGAGCCCCGGGGCAACTCAGACCGAG     120
            ************************************************************

EBK1-15     CGGGGTCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTCAGACAGGAGTAATCCCAGCTGAAACAGG     180
Rutgers3    CGGGGTCTTGACCAGTGGCGAGCGCCCTGTTCAGACAGGAGTAATCCCCGCTGAAACAGG     180
            ********************************************** ***********

EBK1-15     GTTTTCACCCTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTC     240
Rutgers3    GTTTTCACCCTTCCTTTCTTCTGGTTTCCTTCCTCTGCTTCAGCGGCCTCGCCCGGAGTC     240
            ************************************************************

EBK1-15     TTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCATCC     300
Rutgers3    TTGACCAGCGCAGGTTCTGACGCGACCGGTGGCATCACCGAGTTCGCTCAAGCCTCATCC     300
            ************************************************************

EBK1-15     TCCTTTTTCTTCATTCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAG     360
Rutgers3    TCCTTTTTCTTCATTCTAGCTTGGTCTCCGGGCGAGGGTGTTTAGCCCTTGGAACCGCAG     360
            ************************************************************

EBK1-15     TTGGTTCCT     369
Rutgers3    TTGGTTCCT     369
            *********
```

Figure 4 Nucleotide sequence alignment between a sequence sample of seedling EBK1-15 and CLVd isolate Rutgers3 in GenBank (Accession No. JF742635)

3. การตรวจสอบเชื้อ CLVd โดยใช้พืชทดสอบ (Bioassay)

การใช้พืชทดสอบ (Bioassay) (Nie and Singh, 2017) เป็นการทดสอบทางชีวภาพโดยนำพืชที่ติดเชื้อมาทดสอบอาการบนพืชอาศัยซึ่งมีความจำเพาะต่อเชื้อ (Legrand, 2015) เพื่อยืนยันการติดเชื้อเพิ่มเติมจากการตรวจด้วยเทคนิค RT–PCR จากการทดสอบครั้งนี้ พบว่า หลังจากปลูกเชื้อ 4, 8 และ 12 สัปดาห์ ต้นมะเขือเทศ Rutgers เริ่มแสดงอาการในสัปดาห์ที่ 12 1 ตัวอย่าง (ShOP4-136) และสัปดาห์ที่ 17 จำนวน 3 ตัวอย่าง คือ RPT5-23, RPT5-29 และ EBK1-15 แสดงว่าการที่นำ RNA จากตัวอย่างที่มีการส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์แล้วมาปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย เพื่อยืนยันผลซ้ำหลังจากการปลูกเชื้อแล้ว เชื้อสามารถเข้าไปเพิ่มปริมาณในพืชอาศัยและแสดงอาการของโรคได้ Singh and Ready (2003) ได้กล่าวถึงสภาพแวดล้อมทั้งอุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงวัน รวมถึงธาตุอาหาร มีผลต่อการเพิ่มปริมาณเชื้อในการทำ bioassay ได้สำเร็จ โดยทั่วไปเชื้อไวรอยด์มักจะชอบอุณหภูมิที่สูง (≥ 28 °ซ.) และความเข้มแสงสูงจะทำให้มีผลต่อการแสดงอาการของเชื้อมากขึ้น (Semancik *et al.*, 1988) จากการทดลองในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากเชื้อมีปริมาณที่น้อย รวมถึงการปลูกพืชในสภาพโรงเรือนที่มีความเข้มแสงน้อยกว่าข้างนอก เนื่องจากมีการพรางแสงด้วยแสลนสีดำเพื่อลดความร้อนในโรงเรือน และยังอาจมีปัจจัยหลาย ๆ อย่างที่ส่งผลต่อการเข้าทำลาย จึงทำให้เชื้อเพิ่มปริมาณในพืชทดสอบและแสดงอาการของโรคช้า เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง positive control ที่มีปริมาณเชื้อจำนวนมาก ทำให้แสดงอาการได้เร็วกว่า

Table 2 Percent sequence identity between 7 CLVd sequences of cucumber seedlings and selected CLVd isolates in GenBank used in this study

Isolate	Accession No.	% Identities														
		EBK1-15	ShOP4-136	EOP3-239	ShPT5-23	ShPT5-29	RPT5-19	RPT5-20	Solanum 4	Prayong-16	Rutgers 3	Solanum 1	LP4-7c4	Chaipayon-16	Solanum 16	Rutgers 9
EBK1-15	-	100	99.46	98.91	99.46	99.18	99.46	99.46	99.46	98.92	99.73	99.46	98.92	99.18	98.92	98.91
ShOP4-136	-		100	99.45	100	99.73	100	100	99.46	98.91	99.18	98.91	98.91	99.18	98.91	98.37
EOP3-239	-			100	99.45	99.18	99.45	99.45	98.91	98.36	98.63	98.36	98.36	98.63	98.36	97.81
ShPT5-23	-				100	99.73	100	100	99.46	98.91	99.18	98.91	98.91	99.18	98.91	98.37
ShPT5-29	-					100	99.73	99.73	99.18	98.64	98.91	98.64	98.64	99.91	98.64	98.10
RPT5-19	-						100	100	99.46	98.91	99.18	98.91	98.91	99.18	98.91	98.37
RPT5-20	-							100	99.46	98.91	99.18	98.91	98.91	99.18	98.91	98.37
Solanum 4	JF742633								100	98.92	99.19	99.46	98.92	99.73	98.92	98.91
Prayong-16	KC143294									100	98.64	98.37	98.92	98.64	98.37	97.83
Rutgers 3	JF742635										100	99.73	98.64	98.91	98.92	98.64
Solanum 1	JF742632											100	98.37	99.18	98.64	98.91
LP4-7c4	JF446928												100	98.64	98.37	97.83
Chaipayon-16	KM214217													100	98.64	98.64
Solanum 16	JF742634														100	97.83
Rutgers 9	JF742636															100

สรุปผลการทดลอง

การถ่ายทอดเชื้อ CLVd ผ่านทางเมล็ดในแตงกวา และแตงร้านรวมทั้งหมด 6 สายพันธุ์ คือ แม่วัง บงกช พุ่มชบา ภูฏาณ โอพี และนาโต้ โดยการปลูกเชื้อ CLVd ลงบนแตงกวาและแตงร้านที่ระยะต้นกล้า และผสมเกสรแบบข้าม พบว่า เมล็ดที่เก็บจากต้นที่ติดเชื้อสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดได้ โดยตรวจด้วยเทคนิค RT – PCR พบเชื้อ CLVd ที่ต้นอ่อนของแตงกวาพันธุ์บงกช ภูฏาณ และแตงร้านพันธุ์โอพี คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ 0.33 – 1.67, 0.35 – 1.77 และ 0.19 – 0.93% ตามลำดับ และผลผลิต PCR ของตัวอย่างที่พบเชื้อมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ 367 – 369 นิวคลีโอไทด์ เช่นเดียวกับเชื้อ CLVd และมีความเหมือนกับเชื้อ CLVd ในฐานข้อมูล GenBank ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือนระหว่าง 97 – 99% จึงสรุปได้ว่าเชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดสู่ต้นอ่อนในแตงกวาได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

เอกสารอ้างอิง

กมล เลิศรัตน์. 2536. *การผลิตเมล็ดพันธุ์แตงกวา*, หน้า.189-213. *ใน* การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก กองขยายพันธุ์พืช. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.

ปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. *การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภูมิปัญญาเกษตรไทย. 2560. การจัดการโรคและแมลงศัตรูแตงกวา. แหล่งที่มา: http://tom.ji42.com/?p=21763 (สืบค้น: 8 กุมภาพันธ์ 2561)

สมาคมการค้าเมล็ดพันธุ์ไทย. 2559. ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุม. แหล่งที่มา: http://www.thasta.com/web/index.php/2016-05-29-01-47-24/2016-05-29-01-48-39 (สืบค้น: 10 มีนาคม 2560).

ศศิประภา มาราช. 2551. *โคลนก่อโรคของเชื้อ Columnea latent viroid และผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้า* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Hammond, R., D.R. Smith and T.O. Diener. 1989. Nucleotide sequence and proposed secondary structure of *Columnea latent viroid*: A natural mosaic of viroid sequences. *Nucleic Acids Research* 17: 10083–10094.

Benson, A. P. and R. P. Singh. 1964. Seed transmission of *Potato spindle tuber virus* in tomato. *Am. Potato J* 41: 294.

Gross, H.J., H.Domdey, C. Lossow, P.Jank, M.Raba, H. Alberty and H.L.Stinger. 1978. Nucleotide sequence and secondary structure of *Potato spindle tuber viroid*. *Nature* 273: 203-208.

Legrand, P. 2015. Biological assays for plant viruses and other graft – transmissible pathogens diagnosis : a new. *EPPO Bulletin* 45: 240 – 251.

Nie X. and R.P. Singh. 2017. Viroid detection and identication by bioassay. page. 347 – 356. *In Viroids and satellites*. Sara Tenney Publisher.

Matsushita, Y. and S.Tsuda. 2016. Seed transmission of *Potato spindle tuber viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*, *Tomato apical stunt viroid* and *Columnea latent viroid* in horticulture plants. *Eur J Plant Pathol*. 145: 1007-1011.

Owens, R.A., D.R Smith and T.O. Diener. 1978. Measurement of viroid sequence homology by hybridization with complementary DNA prepared in vitro. *Virology* 89: 388-394.

Reanwarakorn, K., S. Bhuvitrakorn and J. Porsoongnurn. 2017. *Columnea latent viroid* in tomato. Journal Unpublished. (Accession No. KY235369)

Singh, R. P. 1970. Seed transmission of *Potato spindle tuber virus* in tomato and potato. *Am Potato J.* 47: 225–227.

Singh, R.P. 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber "virus". *Am Potato J*. 50: 111 - 123.

Singh, R.P. and A.D. Dilworth. 2009. *Tomato chlorotic dwarf viroid* in ornamental plant *Vinca minor* and its transmission through tomato seed. *Eur J Plant Pathol*. 123: 111 – 116.

Singh, R.P. and M.C. Clark. 1973. Similarity of host response to both *Potato spindle tuber* and *Citrus exocortis viruses*. *FA0 Plant Prot Bull*. 21: 121-125.

Semancik, J.S., C.N. Roistacher, R. Rivera – Bustamante and N.Duran – Vila. 1988. *Citrus cachexia viroid* a new viroid of citrus: relationship to viroid of the exocortis disease, complex. *J Gen virol*. 69: 3059 – 3068.

Singh, R.P. and K.F.M. Ready. 2003. Biological indexing. page. 89 – 94. *In Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, VIC,

Walter, B. 1981. Un viroide de la tomate en Afrique de l'Ouest: Identit6 avec le viroide du "Potato Spindle Tuber" *C.R. Acad. Sc., Paris* 292:537-542.