

การตรวจสอบเชื้อไวรัสในเมลอนและแคนตาลูปที่ปลูก ในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน

Detection of Viruses in Melon and Cantaloupe Planted in Chiang Mai, Chiang Rai and Lamphun Provinces

ศลิษฐ์ ศุภกิจธนากร^{1, 2} และ อรอุมา เรืองวงษ์^{1, 2*}
Salit Supakitthanakorn^{1, 2} and On-Uma Ruangwong^{1, 2*}

¹สาขาวิชาโรคพืช ภาควิชากีฏวิทยาและโรคพืช คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200

¹Division of Plant Pathology, Department of Entomology and Plant Pathology, Faculty of Agriculture,
Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

²Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: Email: On-uma.r@cmu.ac.th

(Received: 2 April 2018; Accepted: 10 August 2018)

Abstract: Collection of melon and cantaloupe leaf samples showing virus disease symptoms were carried out in the production areas both greenhouse and open field in Chiang Mai, Chiang Rai and Lamphun provinces of northern Thailand. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with monoclonal and polyclonal antibodies were used for virus detection. The results showed that after virus detection from total 163 leaves samples, the highest disease incidence was 68.87% caused by *Melon yellow spot virus* (MYSV) followed by the genus *Begomovirus* (4.9%), *Papaya ringspot virus* (PRSV) (2.4%) and *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (2.4%). While *Begomovirus* and *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) were minimally detected with 1.8% and 1.2%, respectively. MYSV co-infected with *Begomovirus* were the highest incidence of mixed infections. Triple virus infections (PRSV, WSMoV and ZYMV) was detected from cantaloupe leaf. Virus particles were observed by using transmission electron microscope (TEM), the result showed that the average size of enveloped nearly-spherical particles of MYSV with 80-150 nm diameter, flexuous particle of PRSV with 650-850 nm long and twinned-icosahedral particles of *Begomovirus* with 25 x 35 nm diameter. The results indicated that MYSV was the most threatening virus for melon and cantaloupe production in northern Thailand under both greenhouse and field conditions.

Keywords: Virus, melon, cantaloupe, ELISA, transmission electron microscope

บทคัดย่อ: เก็บตัวอย่างใบเมลอนและแคนตาลูปที่แสดงอาการของโรคไวรัส จากพื้นที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน ทั้งในสภาพโรงเรือนและแปลงเปิด ตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีและโพลีโคลนอลแอนติบอดี ซึ่งจากการตรวจตัวอย่างใบพืชทั้งหมด 163 ตัวอย่าง ด้วยวิธี ELISA พบว่า *Melon yellow spot virus* (MYSV) เป็นเชื้อไวรัสที่ตรวจพบได้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 68.7 รองลงมา คือสกุล *Begomovirus* (ร้อยละ 4.9), *Papaya ringspot virus* (PRSV) (ร้อยละ 2.4) และ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (ร้อยละ 2.4) ในขณะที่ตรวจพบสกุล *Begomovirus* และ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) เป็นจำนวนร้อยละ 1.8 และ 1.2 ตามลำดับ นอกจากนี้ จากการสำรวจ พบการเข้าทำลายร่วมกัน ของเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ MYSV ที่เข้าทำลายร่วมกับสกุล *Begomovirus* ซึ่งพบได้มากที่สุด นอกจากนี้ พบการเข้าทำลายร่วมกันของ เชื้อไวรัส 3 ชนิด ได้แก่ PRSV, WSMoV และ ZYMV เมื่อตรวจสอบลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า MYSV มีรูปร่างค่อนข้างกลมและมีเยื่อหุ้มอนุภาค มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 80-150 นาโนเมตร พบอนุภาคไวรัสลักษณะเป็นเส้นยาวคดของ PRSV มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 650-85 นาโนเมตร และอนุภาคไวรัสที่อยู่เป็นทรง กลมคู่ของสกุล *Begomovirus* มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 22 x 38 นาโนเมตร จากผลการตรวจสอบตัวอย่างใบเมลอนและแคนตาลูปที่แสดงอาการโรคไวรัสใน 3 จังหวัด สามารถสรุปได้ว่า MYSV เป็นเชื้อไวรัสที่สร้างความเสียหายมากที่สุดต่อการปลูกเมลอนและแคนตาลูป ทั้งในสภาพโรงเรือนและแปลงเปิด

คำสำคัญ: ไวรัส เมลอน แคนตาลูป ELISA กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

คำนำ

เมลอน (melon) และแคนตาลูป (cantaloupe) (*Cucumis melo* L. และ *C. melo* var. *cantalupensis* ตามลำดับ) จัดอยู่ในพืชวงศ์แตง (Cucurbitaceae) เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย นิยมปลูกมากในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แหล่งปลูกที่สำคัญในภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ และลำพูน (อภิชาติ และสุธิพงศ์, 2558) ปัญหาสำคัญในการปลูกเมลอนและแคนตาลูปคือโรค ซึ่งโรคที่พบในเมลอนและแคนตาลูปสามารถเกิดจากเชื้อสาเหตุโรคได้หลายชนิด เช่น โรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Acidovorax citrulli* (สุตารัตน์ และคณะ, 2561) โรคต้นแตกยางไหลที่เกิดจากเชื้อรา *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (จันทรา และอรอุมา, 2561) อย่างไรก็ตาม โรคที่มีความสำคัญเป็นอันดับต้น ๆ คือโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งมีผลกระทบทำให้ผลผลิตลดลงมากกว่าร้อยละ 50 และผลผลิตที่ได้มีคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน (Trkulja et al., 2013) เชื้อไวรัสที่สร้างความเสียหายให้กับพืชวงศ์แตงมีหลายชนิด เช่น *Cucumber mosaic virus*

(CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV), *Watermelon mosaic virus-2* (WMV-2) และ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) เป็นต้น (Ali et al., 2012; Romay et al., 2014) จากรายงานของ Lecoq et al. (2003) ในการตรวจหาเชื้อไวรัสจากผลเมลอนที่แสดงอาการต่างเหลืองอย่างรุนแรงด้วยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาและชีวโมเลกุล พบว่า PRSV และ ZYMV เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการผิดปกติบนผลเมลอน นอกจากนี้ Peng et al. (2011) รายงานว่า ผลเมลอนที่ถูก *Melon yellow spot virus* (MYSV) เข้าทำลาย มีขนาด รูปร่าง และสีผิวที่ผิดปกติไป เชื้อไวรัสโดยส่วนมากมีแมลงเป็นพาหะในการถ่ายทอด (insect transmission) ตัวอย่างเช่น แมลงหวี่ขาว (whitefly) สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสในสกุล *Begomovirus* เพลี้ยไฟ (thrips) สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสในสกุล *Tospovirus* และเพลี้ยอ่อน (aphids) สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้หลายสกุล เช่น *Cucumovirus* และ *Potyvirus* เป็นต้น (Whitfield et al., 2015)

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา (serology) ที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบและจัดจำแนกชนิด

ของเชื้อไวรัส โดยอาศัยความจำเพาะระหว่างแอนติเจน (เชื้อไวรัส) และแอนติบอดี (Mowat and Dawson, 1987) จากรายงานของ ยุทธ และเพชรรัตน์ (2551) ใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตง ได้แก่ เมล่อน แตงกวา แตงโม น้ำเต้า และสคว๊ช ที่ปลูกในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสได้ทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ *Papaya ringspot virus-W* (PRSV-W), *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), *Tospovirus* serogroup IV และ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) นอกจากนี้กัลยาณี และคณะ (2552) ใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจประเมินความต้านทานของมะเขือเทศที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ต้านทานต่อ *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV)

การวินิจฉัยและการศึกษาลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM) เป็นวิธีการที่ให้ผลการตรวจสอบแม่นยำและมีความรวดเร็ว ขึ้นอยู่กับลักษณะและรูปแบบของการเตรียมตัวอย่าง เทคนิค dip preparation เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการเตรียมตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสพืช เนื่องจากมีวิธีการเตรียมที่ไม่ซับซ้อนและรวดเร็ว นอกจากนี้ การย้อมสีแบบ negative staining สามารถทำให้มองเห็นอนุภาคของเชื้อไวรัสได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น (Zechmann and Zellnig, 2009) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้ คือ ตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายเมลอนและแคนตาลูปที่ปลูกใน 3 จังหวัดภาคเหนือของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน โดยใช้เทคนิค ELISA และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เพื่อเป็นข้อมูลในการวางแผนป้องกันกำจัดเชื้อไวรัสและแมลงพาหะได้อย่างถูกต้องและเหมาะสม

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบเมลอนและแคนตาลูปที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัสตั้งแต่ระยะการเจริญเติบโตจนถึงระยะก่อนการเก็บเกี่ยว เช่น อาการใบด่าง ใบเกิดจุดสีเหลือง ใบเกิดจุดตายของเนื้อเยื่อ ใบมีรูปร่างผิดปกติ

และใบที่แสดงอาการตมุน โดยเก็บตัวอย่างเป็นจำนวน 3 ใบต่อดัน จากพื้นที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ 5 แห่ง โดยแบ่งออกเป็น ในโรงเรือน 3 แห่ง ได้แก่ อ.ดอยหล่อ อ.หางดง และ อ.สันป่าตอง และอีก 2 แห่ง ในแปลงเปิด ได้แก่ อ.เมือง และ อ.แม่จาง สำหรับจังหวัดเชียงราย เก็บตัวอย่างพืชที่ปลูกในโรงเรือนจาก อ.แม่จัน และ อ.แม่สาย และพื้นที่ปลูกในจังหวัดลำพูนเป็นแปลงเปิดทั้ง 2 แห่ง ได้แก่ อ.เมือง และ อ.ป่าซาง นอกจากนี้ สังเกตและจดบันทึกชนิดของแมลงพาหะเชื้อไวรัสที่พบบนใบพืชนำตัวอย่างพืชมาตรวจเชื้อไวรัสในห้องปฏิบัติการ

2. การตรวจด้วยเทคนิค ELISA

2.1 เทคนิค indirect plate-trapped antigen (PTA)-ELISA

ใช้เทคนิค PTA-ELISA ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) (รหัส 9F11), *Melon yellow spot virus* (MYSV) (รหัส 5E7), *Watermelon mosaic virus-2* (WMV-2) (รหัส 1H5) และสกุล *Potyvirus* (รหัส 1G8) (ผลิตโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) นอกจากนี้ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (polyclonal antibody) สำหรับการตรวจหาเชื้อ *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Papaya ringspot virus* (PRSV) และ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (ผลิตโดยคลินิกสุขภาพพืช คณะเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน) เตรียมตัวอย่างตามวิธีการที่ดัดแปลง มาจาก Gajanandana et al. (2006) ดังนี้ บดตัวอย่างใบพืชใน carbonate coating buffer pH 9.6 ในอัตราส่วนใบพืช 0.1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสด้านบน (supernatant) มาหยดลงในหลุมไมโครเพลทในปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างหลุมเพลทด้วย washing buffer (phosphate saline buffer with Tween-20; PSBT) ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 4 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เติม blocking buffer ปริมาตร 100

ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย washing buffer จากนั้นเติมโมโนโคลนอลหรือโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวรัสแต่ละชนิด ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเพลทด้วย washing buffer และเติม p-nitrophenyl phosphate (PNPP) substrate (Sigma, USA) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง MicroPlate Reader รุ่น Synergy H1 (BioTek, USA) ตัวอย่างที่มีเชื้อไวรัสจะมีการดูดกลืนแสงที่สูงกว่าชุดควบคุม 2 เท่า เมื่อได้ผลการตรวจเชื้อไวรัสแล้ว นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของการเกิดโรค (disease incidence) ตามวิธีการของ Ali *et al.* (2014) ดังนี้

Percentage of disease incidence (PDI)	=	$\frac{\text{No. of infected plants}}{\text{Total no. of observed plants}} \times 100$
---------------------------------------	---	--

2.2 เทคนิค indirect double antibody sandwich (DAS)-ELISA

ใช้เทคนิค DAS-ELISA ร่วมกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจ *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) (รหัส 18D11) เชื้อไวรัสในสกุล *Begomovirus* (รหัส M1 และ D2) (ผลิตโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) โดยหยดแอนติบอดีตัวจับ (capture หรือ primary antibody) ซึ่งเป็นโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัสแต่ละชนิด ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำตามวิธีการในข้อ 2.1

3. การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope; TEM)

นำตัวอย่างใบเมลอนที่ได้รับการปลูกเชื้อ MYSV และ PRSV และตัวอย่างใบเมลอนที่ตรวจพบ *Begomovirus* ด้วยเทคนิค ELISA มาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของอนุภาคไวรัสภายใต้ TEM โดยเตรียมตัวอย่างแบบ dip preparation และย้อมสีแบบ negative staining ตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Kumar *et al.* (2014) ดังนี้ บดตัวอย่างใบพืชร่วมกับ phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 กรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสด้านบนปริมาตร 7 ไมโครลิตร หยดลงบนกริดทองแดงที่เคลือบด้วยฟอรัมวาร์ (formvar-coated carbon grid) ขนาด 300 mesh ทิ้งไว้ นาน 2 นาที ล้างออกด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อจำนวน 2 ครั้ง ครั้งแรกล้างด้วยการหยดน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร และครั้งที่ 2 นำกริดไปคว่ำลงบนหยดน้ำกลั่นหนึ่งฝาเชื้อ เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลานำกระดาษกรองมาซับน้ำออก จากนั้นคว่ำกริดลงบน 1% glutaraldehyde นาน 5 นาที ซับ glutaraldehyde ออกด้วยกระดาษกรอง หยด 2% uranyl acetate ปริมาตร 7 ไมโครลิตรลงบนกริด ทิ้งไว้ นาน 4 นาที ซับออกด้วยกระดาษกรอง และนำไปตรวจสอบลักษณะของอนุภาคไวรัสภายใต้ TEM รุ่น JEM-2200FS (JOEL, USA) ที่กำลังขยาย 40,000-60,000 เท่า

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่าง

สามารถเก็บตัวอย่างใบพืชได้ทั้งหมด 163 ตัวอย่าง โดยแบ่งออกเป็นใบเมลอน 118 ตัวอย่าง และใบแคนตาลูป 45 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยอาการของคล้ายโรคไวรัสที่ตรวจพบส่วนมาก มีลักษณะดังนี้ ใบยอดแสดงอาการต่าง ใบยอดมีรูปร่างผิดปกติ ใบยอดแสดงอาการตุ่มนูน ใบยอดม้วนงอ ใบแก่แสดงอาการจุดตายของเนื้อเยื่อ ใบยอดและใบแก่แสดงอาการใบเหลือง และต้นแคระแกร็น เป็นต้น นอกจากนี้พบแมลงพาหะโรคไวรัส 3 ชนิด ได้แก่ เพลี้ยไฟ (ภาพที่ 1A) ซึ่งพบมากด้านใต้

Table 1. Number of melon and cantaloupe leaf samples collected from 3 provinces in northern Thailand and percentage of virus incidence detected by ELISA

Locations	Types of cultivation	Plants	No. of collection	Virus incidence (%)
Chiang Mai	greenhouse	melon	31	MYSV (80.6%), <i>Begomovirus</i> (3.2%) and WSMoV (6.4%)
	open field	cantaloupe	12	PRSV (25.0%), ZYMV (25.0%) and MYSV (8.3%)
		melon	4	No virus detected
Chiang Rai	greenhouse	melon	12	MYSV (58.3%)
Lamphun	greenhouse	melon	14	MYSV (78.5%), and <i>Begomovirus</i> (16.7%)
	open field	cantaloupe	33	MYSV (66.6%), <i>Begomovirus</i> (6.0%), PRSV (3.0%), WSMoV (3.0%) and ZYMV (3.0%)
		melon	57	MYSV (80.7%), <i>Begomovirus</i> (1.7%)
		Total	163	MYSV (68.7%), <i>Begomovirus</i> (6.1%), PRSV (2.4%), ZYMV (2.4%) and WSMoV (1.8%)

Remarks: MYSV: Melon yellow spot virus, PRSV: Papaya ringspot virus, WSMoV: Watermelon silver mottle virus and ZYMV: Zucchini yellow mosaic virus



Figure 1. Insect vectors of viruses found on melon and/or cantaloupe leaves observed under stereo microscope (20X magnification), thrips (A), aphids (B) and whitefly (C)

ใบอ่อนและใบแก่ของเมลอนและแคนตาลูปที่แสดงอาการจุดสีเหลืองและจุดตายของเนื้อเยื่อ เพี้ยอ่อน (ภาพที่ 1B) พบด้านใต้ใบแคนตาลูปที่แสดงอาการตุ่มนูน และพบแมลงหมีขาว (ภาพที่ 1C) บนใบอ่อนของเมลอนที่แสดงอาการม้วนงอ โดยใบแปลงเปิดสามารถพบแมลงได้ทั้ง 3 ชนิด ส่วนในโรงเรือนพบเพลี้ยไฟและแมลงหมีขาวแต่ไม่พบเพลี้ยอ่อน

2. การตรวจด้วยเทคนิค ELISA และลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสแต่ละชนิด

เมื่อตรวจสอบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างใบ 163 ตัวอย่าง (เมลอน 118 ตัวอย่าง และแคนตาลูป 45

ตัวอย่าง) พบว่า MYSV เป็นเชื้อไวรัสที่พบได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 68.7 จากตัวอย่างใบพืชที่ปลูกในโรงเรือนและแปลงเปิดโดยแบ่งเป็น พบในเมลอนที่ปลูกในโรงเรือนที่สำรวจในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และลำพูน คิดเป็นร้อยละ 80.6, 58.3 และ 78.5 ตามลำดับ และตรวจพบในเมลอนที่ปลูกในแปลงเปิดของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน คิดเป็นร้อยละ 8.3 และ 80.7 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) สำหรับแคนตาลูปที่ปลูกในแปลงเปิดของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน พบการเข้าทำลายของ MYSV คิดเป็นร้อยละ 25.0 และ 66.6 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) เชื้อไวรัสที่ตรวจพบมารองลงมาคือ สกุล *Begomovirus* คิดเป็น ร้อยละ 16.7 ในขณะที่ตรวจพบ PRSV และ ZYMV ได้ในร้อยละที่

เท่ากัน คือ 2.4 นอกจากนี้ ตรวจพบ WSMoV คิดเป็นร้อยละ 1.8 (ตารางที่ 1)

เพลี้ยไฟและแมลงหวี่ขาวที่พบได้ทั้งในโรงเรือนและแปลงเปิด มีความสัมพันธ์กับชนิดของเชื้อไวรัส ซึ่งตามรายงานการศึกษาของ Kato *et al.* (2000) พบว่า MYSV สามารถถ่ายทอดผ่านทางเพลี้ยไฟได้ และจากรายงานของ Whitfield *et al.* (2015) พบว่า แมลงหวี่ขาวสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสในสกุล *Begomovirus* นอกจากนี้ Dombrovsky *et al.* (2005) รายงานว่า เชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* มีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอด ซึ่งจากผลการตรวจตัวอย่างใบพืชในโรงเรือน ไม่พบเพลี้ยอ่อน สอดคล้องกับการตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* (PRSV และ ZYMV) จากตัวอย่างใบพืชในโรงเรือนที่นำมาตรวจสอบ

ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสในตัวอย่างใบพืชจาก 3 จังหวัดในภาคเหนือ พบว่า MYSV พบมากที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างจากรายงานของ ยุทธ และเพชรรัตน์ (2551) ที่รายงานการตรวจเชื้อไวรัสในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ เมล่อน แตงกวา น้ำเต้า และสควีช โดยพบว่า CMV เป็นเชื้อไวรัสที่สามารถตรวจพบได้มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 44 รองลงมาคือ PRSV-W และ CGMMV โดยคิดเป็นร้อยละ 28 และ 25 ตามลำดับ ในขณะที่งานวิจัยในครั้งนี้ตรวจไม่พบ CMV, CGMMV และ WMV-2 จากตัวอย่างเมล่อนและแคนตาลูปจำนวนทั้งหมด 163 ตัวอย่าง

ผลการตรวจ PRSV ด้วยเทคนิค ELISA ไม่สามารถระบุได้ว่า PRSV ที่ตรวจพบเป็นสายพันธุ์ (type)ใด ระหว่าง watermelon -infecting type (W type) หรือ papaya-infecting type (P type) เนื่องจากทั้งสองสายพันธุ์นั้นสามารถเข้าทำลายพืชวงศ์แตงได้เหมือนกัน ซึ่งไม่สามารถใช้เทคนิคทางชีววิทยาในการจัดจำแนกได้ ซึ่งการจัดจำแนกสามารถทำได้โดยการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบเท่านั้น (Mansilla *et al.*, 2013)

ลักษณะอาการเฉพาะของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสแต่ละสกุลที่ได้ทำการสำรวจในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าอาการจุดตายของเนื้อเยื่อพืช (ภาพที่ 2A-C) เป็นอาการเฉพาะที่เกิดจากเชื้อไวรัสในสกุล *Tospovirus* ซึ่งในงานวิจัยนี้สามารถตรวจพบได้ 2 ชนิด คือ MYSV และ

WSMoV สำหรับเชื้อไวรัสในสกุล *Begomovirus* พบว่าทำให้ใบพืชแสดงอาการใบม้วนงอลง เกิดเป็นสีเหลือง และแสดงอาการเหลืองทั้งใบ (ภาพที่ 2D-F) นอกจากนี้เชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* ได้แก่ PRSV และ ZYMV พบว่าทำให้ใบพืชเกิดอาการใบต่างร่วมกับเกิดตุ่มนูน (ภาพที่ 2G, H)

การเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด สามารถตรวจพบได้จากตัวอย่างที่สำรวจ (ภาพที่ 2I-K และภาพที่ 3A-C) โดยพบว่า MYSV เข้าทำลายร่วมกับสกุล *Begomovirus* มากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 4.2 (ภาพที่ 3A) จากใบเมล่อนทั้งในโรงเรือนและแปลงเปิด ที่แสดงอาการต่างอย่างรุนแรงร่วมกับอาการยอดแคระแกร็น (shoot stunting) (ภาพที่ 2I) พบใบแคนตาลูปที่ปลูกในแปลงเปิดที่ตรวจพบ PRSV และ ZYMV เข้าทำลายร่วมกัน คิดเป็นร้อยละ 6.6 (ภาพที่ 3B) นอกจากนี้พบตัวอย่างแคนตาลูปที่ปลูกในแปลงเปิดของจังหวัดลำพูน ที่ตรวจพบการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัส 3 ชนิด ได้แก่ PRSV, WSMoV และ ZYMV คิดเป็นร้อยละ 2.2 (ภาพที่ 3B) บนใบพืชที่แสดงอาการใบต่าง และมีจุดตายของเนื้อเยื่อร่วมด้วย (ภาพที่ 2K) ในธรรมชาติสามารถตรวจพบการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสได้หลายชนิด เช่น Fattouh (2003) ตรวจพบการเข้าทำลายร่วมกันของ CMV และ ZYMV ในซูกินี นอกจากนี้ Gil-Salas *et al.* (2012) ตรวจพบแตงกวาที่เข้าทำลายโดย *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV) ร่วมกับ *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) โดยปฏิสัมพันธ์ของการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัสอาจเป็นแบบส่งเสริม (synergism) หรือปฏิปักษ์ (antagonist) ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของอาการของโรค โดยขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อไวรัส และพืชอาศัย (Syller, 2012) อย่างไรก็ตาม จากการตรวจสอบพบเชื้อไวรัสในสกุล *Begomovirus* ที่เข้าทำลายเมล่อนและแคนตาลูป แต่ยังไม่สามารถระบุชนิดของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA เพียงอย่างเดียว จำเป็นต้องมีการตรวจสอบด้วยวิธีการอื่นเพิ่มเติมต่อไป

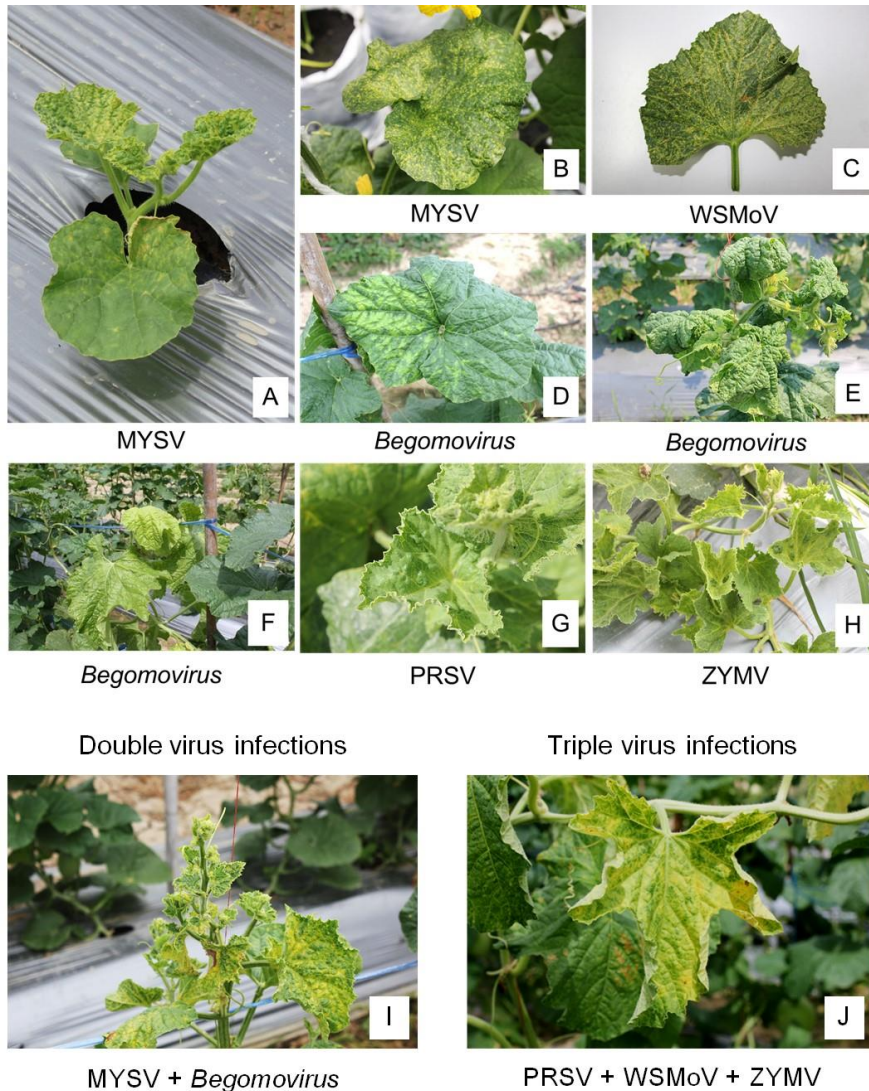


Figure 2. Symptoms of virus infection on melon and cantaloupe, melon infected by *Melon yellow spot virus* (MYSV) showing severe mosaic symptom on leaves and stunting (A), numerous chlorotic spots on melon leaves caused by MYSV (B), numerous chlorotic with necrotic spots on melon leaf infected by *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) (C), yellow patch symptom on melon leaf infected by *Begomovirus* (D), leaf curl symptom of melon leaves infected with *Begomovirus* (E), yellowing of cantaloupe leaves caused symptoms by *Begomovirus* (F), blistering symptom on cantaloupe leaves caused by *Papaya ringspot virus* (PRSV) (G), blistering and mosaic symptoms on cantaloupe infected by *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (H), double virus infection of MYSV+*Begomovirus*-infected melon leaves showing severe mosaic with shoot stunting symptoms (I), and PRSV+WSMoV+ZYMV-infected cantaloupe leaves showing severe mosaic with necrotic spots symptoms (J)

การตรวจสอบด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM)

จากการตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วย TEM พบว่า MYSV มีลักษณะอนุภาคค่อนข้างกลมและมีเยื่อหุ้มปกคลุมอยู่ชั้นนอกของอนุภาคไวรัส (enveloped nearly-spherical particle) โดยมีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของอนุภาคเท่ากับ 80-150 นาโนเมตร (ภาพที่ 4A) ซึ่งผลการตรวจนี้สอดคล้องกับรายงานของ Kato *et al.* (2000) ที่ได้ค้นพบเชื้อไวรัสชนิดใหม่ที่เข้าทำลายเมลอนในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีลักษณะของอนุภาคค่อนข้างกลมและมีเยื่อหุ้มมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 80-100 นาโนเมตร และได้ตั้งชื่อว่า *Melon yellow spot virus* (MYSV) ในกรณีของ PRSV จากการ

ตรวจสอบ พบว่า มีลักษณะอนุภาคแบบเส้นยาวคด (flexuous particle) มีขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 650-850 นาโนเมตร (ภาพที่ 4B) โดยมีความใกล้เคียงกับรายงานของ ณัฐริกา และเกวลิน (2559) ที่ได้ตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* จากน้ำคั้นใบหอมแดงและพบว่าอนุภาคไวรัสมีขนาดยาวประมาณ 600-760 นาโนเมตร นอกจากนี้ จากการตรวจสอบพบอนุภาคทรงกลมที่อยู่เป็นคู่ (twinned-icosahedral) ของเชื้อไวรัสสกุล *Begomovirus* โดยมีขนาดของแต่ละอนุภาคเฉลี่ยเท่ากับ 25 x 35 นาโนเมตร (ภาพที่ 4C) ซึ่งมีลักษณะรูปร่างที่ใกล้เคียงกับเชื้อไวรัสในวงศ์ *Geminiviridae* ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 22 x 38 นาโนเมตร (Zerbini *et al.*, 2017)

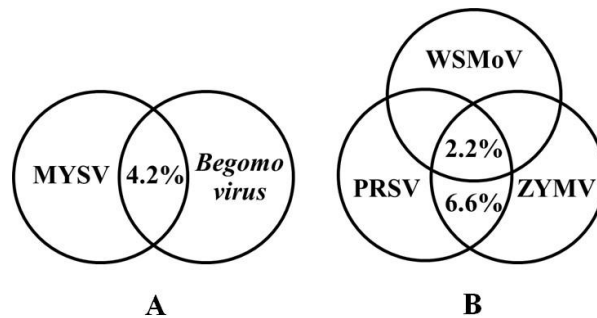


Figure 3. Percentage of mixed infection incidence detected by ELISA, double virus infection of *Melon yellow spot virus* (MYSV) + *Begomovirus* in melon (A), *Papaya ringspot virus* (PRSV) + *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) in cantaloupe (B) and triple virus infection of PRSV + ZYMV + *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) in cantaloupe (B)

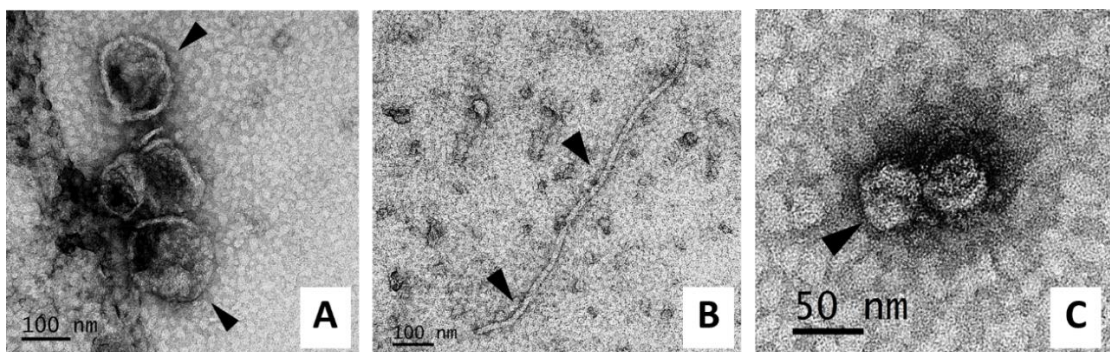


Figure 4. Transmission electron micrograph of viruses in melon (indicated by arrowheads) at 40,000-60,000 magnification, enveloped-spherical particles of *Melon yellow spot virus* (MYSV) (A), flexuous rod particle of *Papaya ringspot virus* (B) and twinned-icosahedral particles of *Begomovirus* (C)

สรุป

จากการตรวจสอบเชื้อไวรัสในเมลอนและแคนตาลูปที่ปลูกในจังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย และ ลำพูน รวมทั้งหมด 163 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค ELISA พบว่า MYSV เป็นเชื้อไวรัสที่ตรวจพบได้มากที่สุด (ร้อยละ 68.7) รองลงมาคือเชื้อไวรัสในสกุล *Begomovirus* (ร้อยละ 6.1) PRSV (ร้อยละ 2.4) และ ZYMV (ร้อยละ 2.4) ในขณะที่ตรวจพบ WSMoV เป็นจำนวนน้อย โดยคิดเป็นร้อยละ 1.8 นอกจากนี้ตรวจพบการเข้าทำลายร่วมกันของเชื้อไวรัส โดยพบมากที่สุด คือ MYSV เข้าทำลายร่วมกับเชื้อไวรัสในสกุล *Begomovirus* รองลงมาคือ PRSV เข้าทำลายร่วมกับ ZYMV และตรวจพบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส 3 ชนิด ได้แก่ PRSV, WSMoV และ ZYMV ลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสเมื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า MYSV มีลักษณะอนุภาคแบบค่อนข้างกลมและมีเยื่อหุ้ม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 80-150 นาโนเมตร อนุภาคของ PRSV มีลักษณะเป็นเส้นยาวคด มีขนาดความยาวเฉลี่ยประมาณ 650-850 นาโนเมตร และสกุล *Begomovirus* มีลักษณะอนุภาคไวรัสเป็นทรงกลมที่อยู่เป็นคู่ มีขนาดเฉลี่ยของแต่ละอนุภาคเท่ากับ 25 x 35 นาโนเมตร นอกจากนี้พบว่า ในสภาพโรงเรือนไม่พบเพลี้ยอ่อนซึ่งเป็นแมลงพาหะของเชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* และตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในสกุล *Potyvirus* จากตัวอย่างใบเมลอนและแคนตาลูปที่ปลูกในโรงเรือน แสดงว่าการปลูกเมลอนและแคนตาลูปในโรงเรือนสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสสกุลนี้ได้ อย่างไรก็ตาม ในสภาพโรงเรือนจำเป็นต้องมีการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟและแมลงหวี่ขาว เนื่องจากเป็นแมลงพาหะของเชื้อไวรัส MYSV และสกุล *Begomovirus* ตามลำดับ ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่ตรวจพบได้มากทั้งในโรงเรือนและแปลงเปิด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานักวิทยาศาสตร์และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน

คณะกรรมการอุดมศึกษา และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณ ดร.อรรพวง หิมาวันโต จากห้องปฏิบัติการโมโนโคลนอลแอนติบอดีศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้อนุเคราะห์แอนติบอดีสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กัลยาณี ชัยชนะ ประสาทพร สมิตะมาน และ มณีฉัตร นิกรพันธุ์. 2552. การปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโรคไวรัสใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศ. วารสารเกษตร 25(3): 219-227.
- จันทร์หา อูปลี และ อรุมา เรืองวงษ์. 2561. การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียที่เป็น นปฏิปักษ์ต่อเชื้อสาเหตุโรคต้นแตกยางไหลของเมลอน. วารสารเกษตร 34(2): 179-191.
- ณัฐริกา วรรณรัตน์ และ เกวลิน คุณาศักดากุล. 2559. การผลิตหอยมอดปลอดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. วารสารเกษตร 32(3): 347-356.
- ยุทธ หน่มะ และ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. 2551. โรคไวรัสในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. หน้า 12-18. ใน: รายงานสัมมนาวิทยาศาสตร์เกษตรมหาวิทยาลัยขอนแก่น ครั้งที่ 28, ขอนแก่น.
- สุดารัตน์ แก้วน้ำอ่าง อังสนา อัครพิศาล และ อรุมา เรืองวงษ์. 2561. การคัดเลือกไรโซแบคทีเรียในการควบคุมโรคผลเน่าที่เกิดจากแบคทีเรียของเมลอน. วารสารเกษตร 34(2): 193-204.
- อภิชาติ ศรีสะอาด และ สุธิพงศ์ ถิ่นชวน้อย. 2558. เมล่อน & แคนตาลูป เงินล้าน. นาคาอินเตอร์-มีเดีย, กรุงเทพฯ. 136 หน้า.
- Ali, A., A. Hussain and M. Ahmad. 2014. Occurrence and molecular characterization of Cucumber green mottle mosaic virus in cucurbit crops of KPK, Pakistan. Brazilian Journal of Microbiology 45(4): 1247-1253.

- Ali, A., O. Mohammad and A. Khattab. 2012. Distribution of viruses infecting cucurbit crops and isolation of potential new virus-like sequences from weeds in Oklahoma. *Plant Disease* 96(2): 243-248.
- Dombrovsky, A., H. Huet, N. Chejanovsky and B. Raccach. 2005. Aphid transmission of a *Potyvirus* depends on suitability of the helper component and the N terminus of the coat protein. *Archives of Virology* 150(2): 287-298.
- Fattouh, F.A. 2003. Double infection of a cucurbit host by *Zucchini yellow mosaic virus* and *Cucumber mosaic virus*. *Pakistan Journal of Plant Pathology* 2: 85-90.
- Gajanandana, O., C. Seepiban, S. Pansa-ard, A. Bhunchoth, A. Warin, O. Himananto, P. Pongsapic, P. Chiemsombat and R. Hongprayoon. 2006. Production of antibodies for detection of tospoviruses in Thailand. pp. 556-563. *In: Proceedings of the 44th Kasetsart University Annual Conference*. Kasetsart University, Bangkok.
- Gil-Salas, F.M., J. Peters, N. Boonham, I.M. Cuadrado and D. Janssen. 2012. Co-infection with *Cucumber vein yellowing virus* and *Cucurbit yellow stunting disorder virus* leading to synergism in cucumber. *Plant Pathology* 61: 468-478.
- Kato, K., K. Handa and M. Kameya-Iwaki. 2000. *Melon yellow spot virus*: a distinct species of the genus *Tospovirus* isolated from melon. *Phytopathology* 90(4): 422-426.
- Kumar, S., A. Sankarlingam and R. Rabindran. 2014. Characterization and confirmation of *Papaya ringspot virus-W* strain infecting *Trichosanthes cucumerina* at Tamil Nadu, India. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 5: 225, doi: 10.4172/2157-7471.1000225.
- Lecoq, H., C. Desbiez, C. Wipf-Scheibel and M. Girard. 2003. Potential involvement of melon fruit in the long distance dissemination of cucurbit Potyviruses. *Plant Disease* 87(8): 955-959.
- Mansilla, P.J., A.G. Moreira, A.P.O.A. Mello, J.A. M. Rezende, J. A. Ventura, V. A. Yuki and F. J. Levatti. 2013. Importance of cucurbits in the epidemiology of *Papaya ringspot virus* type P. *Plant Pathology* 62(3): 571-577.
- Mowat, W.P. and S. Dawson. 1987. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *Journal of Virological Methods* 15(3): 233-247.
- Peng, J.C., S.D. Yeh, L.H. Huang, J.T. Li, Y.F. Cheng and T.C. Chen. 2011. Emerging threat of thrips-borne *Melon yellow spot virus* on melon and watermelon in Taiwan. *European Journal of Plant Pathology* 130: 205-214.
- Romay, G., H. Lecoq, F. Geraud-Pouey, D.T. Chirinos and C. Desbiez. 2014. Current status of cucurbit viruses in Venezuela and characterization of Venezuelan isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. *Plant Pathology* 63(1): 78-87.
- Syller, J. 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Molecular Plant Pathology* 13(2): 204-216.
- Trkulja, V., D. Kovacic, B. Curkovic, A. Vucurovic, I. Stankovic, A. Bulajic and B. Krstic. 2013. First report of *Cucumber mosaic virus* on melon in Bosnia and Herzegovina. *Plant Disease* 97(8): 1124.

- Whitfield, A.E., B.W. Falk and D. Rotenberg. 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479-480: 278-289.
- Zechmann, B. and G. Zellnig. 2009. Rapid diagnosis of plant virus diseases by transmission electron microscopy. *Journal of Virological Methods* 162(1-2): 163-169.
- Zerbini, F.M., R.W. Briddon, A. Idris, D.P. Martin, E. Moriones, J. Navas-Castillo, R. Rivera-Bustamante, P. Roumagnac and A. Varsani. 2017. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *The Journal of General Virology* 98(2): 131-133.
-