

การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีววิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)* ที่แยกได้จากเมลอน และน้ำเต้า

Comparison on biological properties and coat protein nucleotide sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)* isolated from melon and bottle gourd

พัศราภรณ์ ยีสารพัฒน์¹ วรนนต์ นาคบรรพต² อภิเดช แสงดี^{3*}

Putsaraporn Yeasaraput¹, Woranan Nakbanpote², Aphidech Sangdee^{3*}

Received : 19 February 2013; Accepted : 2 May 2013

บทคัดย่อ

Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) เป็นเชื้อสาเหตุโรคใบด่างเขียวที่มีความสำคัญในพืชวงศ์แตง (Cucurbitaceae) การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบพืชอาศัย ลักษณะของอนุภาค และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CGMMV จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ CGMMV ME-9 ที่แยกได้จากเมลอน CGMMV BG-15 และ CGMMV BG-17 ที่แยกได้จากน้ำเต้า พบว่า เชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีความสามารถในการเกิดโรคและอาการบนพืชอาศัยวงศ์แตงได้แตกต่างกัน ขณะที่คุณสมบัติอื่นๆ ร่วมกัน คือ อนุภาคไวรัสเป็นแบบท่อนตรงหัวท้ายตัด ขนาดประมาณ 15×300 นาโนเมตร และมีโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีขนาด 17-18 kDa จากการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต ด้วยเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต มีจำนวน 486 นิวคลีโอไทด์ โดยมีความเหมือนกันอยู่ที่ประมาณ 98.4 - 99.8% และพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 มีความเหมือนยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ CGMMV สายพันธุ์ LN มากที่สุด 99% และ 100% ตามลำดับ และเชื้อ CGMMV BG-17 มีความเหมือนกับเชื้อ CGMMV สายพันธุ์ Watermelon มากที่สุด 98%

คำสำคัญ: *Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)*, โรคใบด่างเขียวในพืชวงศ์แตง, ยีนโปรตีนห่อหุ้ม

Abstract

Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) is the causal agent of cucumber green mottle mosaic disease of Cucurbitaceae. The objective of this study was to compare host plants, particle morphology and coat protein nucleotide sequences of three isolates of CGMMV including CGMMV ME-9 isolated from melon, CGMMV BG-15 and CGMMV BG-17 isolated from bottle gourd. These CGMMV isolates showed various disease symptoms in cucurbit plants. However, they shared other biological properties including rigid rod particle, approximately 15 x 300 nm and coat protein size approximately 17-18 kDa. The coat protein gene (CP gene) of CGMMV isolates were amplified using Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The 486 nucleotides of CP gene of CGMMV isolates were determined and showed 98.4-99.8% homology. The CP gene of CGMMV ME-9 and CGMMV BG-15 showed 99% and 100% homology with CP gene of CGMMV-LN and CGMMVBG-17 showed 98% homology with CP gene of CGMMV watermelon strain.

Keywords: *Cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV)*, Cucumber green mottle mosaic disease, Coat protein gene

¹ นิสิตปริญญาโท, ^{2,3}ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม มหาสารคาม 44150

¹ Master degree student, ^{2,3} Assist. Prof., Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150

* Corresponding author: Aphidech Sangdee, Faculty of Science, Mahasarakham University, Khamriang, Kantarawichai district, Mahasarakham 44150, Thailand. aphidech_sangdee@yahoo.com

บทนำ

พืชวงศ์แตง (Cucurbitaceae) เป็นพืชที่มีความสำคัญทั่วโลก จัดเป็นสินค้าส่งออกของหลายประเทศอย่างต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบันโดยมีมูลค่าหลายพันล้านดอลลาร์¹ เนื่องจากพืชวงศ์แตงเป็นพืชที่นิยมนำมาประกอบอาหาร รับประทานผลสด ใช้เป็นยา และเครื่องสำอาง² พืชวงศ์นี้จึงมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายทั่วโลกและมีแนวโน้มมากขึ้นทุกปี แต่ในกระบวนการเพาะปลูกพืชวงศ์แตงมักประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคพืชโดยเฉพาะโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสโดยเชื้อไวรัส *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) เป็นไวรัสโรคพืชที่มีความสำคัญที่เข้าทำลายพืชวงศ์แตง จัดอยู่ในสกุล *Tobamovirus* ที่มีอนุภาคเป็นท่อนตรงหัวท้ายตัด (rigid rod) ไม่มี envelope มีขนาด 18x300 นาโนเมตร มีกรดนิวคลีอิกเป็นสายเดี่ยวชนิด RNA (ssRNA) ขนาดประมาณ 6.4 kb^{3,4}

เชื้อ CGMMV สามารถเข้าทำลายพืชวงศ์แตงได้หลายชนิด เช่น แตงกวาแตงโม แตงเทศ น้ำเต้า และเมลอนโดยมักทำให้พืชแสดงอาการในกลุ่มอาการใบด่างเขียว ไม่ชัดเจน (green mottle) ใบด่างเขียวสีส้มเหลืองไม่ชัดเจน (yellow mottle) ใบย่น (wrinkle) ใบมีสีซีดจาง (chlorosis) ใบบิดเบี้ยว (distortion) ใบยอดมีอาการม้วนเป็นคลื่น (curve rolling) จนกระทั่งทำให้ต้นแคระแกร็น (stunting) และในกรณีเชื้อสายพันธุ์ที่รุนแรงจะทำให้เกิดอาการผลเป็นจุดสีซีดเป็นจ้ำๆ (chlorotic spots)⁵⁻⁸ นอกจากนี้เชื้อ CGMMV ยังสามารถทำให้เกิดความผิดปกติภายในเซลล์พืชด้วยการกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนแปลกปลอม (inclusion bodies) ที่มีลักษณะเป็นผลึกหกเหลี่ยมใสขาวภายในเซลล์ชั้น ลักษณะคล้ายเข็มอยู่บริเวณเซลล์ปากใบ และลักษณะรูปร่างภายในเซลล์ที่อ่อนแอ⁹

ในด้านการระบาดของเชื้อพบมีการระบาดในหลายพื้นที่ เช่น การเข้าทำลายแตงกวาและแตงโมในมณฑลเหลียวหนิงของประเทศจีน¹⁰ และเข้าทำลายแตงกวาในจังหวัดโคราช ประเทศอิหร่าน¹¹ เป็นต้น ในประเทศไทยมีการรายงานการระบาดเมื่อ พ.ศ. 2547 ในเมลอน ที่จังหวัดมหาสารคาม¹² ต่อมาในช่วงปี 2549-2550 ได้มีการสำรวจพบเชื้อในพืชวงศ์แตงอีกหลายชนิด เช่น เมลอน แตงกวา น้ำเต้า และสควีช จากต่างแหล่งปลูกหลายพื้นที่ในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ให้ผลบวกเมื่อตรวจสอบด้วยแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ CGMMV¹³ นอกจากนี้ยังพบการแพร่ระบาดใน แตงกวา แตงโม เมลอน และน้ำเต้า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัด ได้แก่ ขอนแก่น มหาสารคาม เลย สกลนคร และอุดรธานี⁵

เชื้อ CGMMV เป็นเชื้อไวรัสที่มีความคงทนของอนุภาคสูง สามารถคงอยู่เป็นเวลานานบนเครื่องมือที่ใช้ทางการ

เกษตรและเศษซากพืช ปนเปื้อนในดิน นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโรคโดยการสัมผัสและสามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ จึงมีแนวโน้มที่จะก่อให้เกิดความเสียหายเป็นอย่างมากต่อการผลิตแตงทั้งผลสด และการผลิตเมล็ดพันธุ์ นอกจากนี้ยังมีเกษตรกรบางรายที่ใช้เมล็ดพันธุ์ที่ไม่ได้รับรองมาตรฐานการปลอดเชื้อ จึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการติดเชื้อและการแพร่กระจายเชื้ออย่างรวดเร็ว¹⁴

ปัจจุบันมีการนำเทคนิคทางชีวโมเลกุลได้แก่ เทคนิค RT-PCR, RT-PCR-SSCP และ RT-PCR-RFLP^{5, 15} มาใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ CGMMV ได้ โดยอาจใช้ข้อมูลจากทั้งจีโนม เช่น Yoon¹⁵ พบว่าเทคนิค RT-PCR-RFLP ที่ทำโดยการเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อ CGMMV จำนวน 36 ไอโซเลต ที่แยกได้จากพืชวงศ์แตงชนิดต่างๆ แล้วจึงนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ สามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ CGMMV ได้ หรืออาจใช้ข้อมูลจากบางส่วนของจีโนม เช่น จีโนมที่รหัส (coat protein gene) ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค RT-PCR สามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อ CGMMV#23 WM, CGMMV#26 WM, CGMMV#27 WM, CGMMV#13 CU, CGMMV#17 CU, CGMMV#15 CU, CGMMV#1ML, CGMMV#13 ML, CGMMV#17 ML ได้ และ Yoon¹⁵ ได้ใช้เทคนิค RT-PCR-SSCP ในการวิเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มและบางส่วนของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ในพืช (movement protein gene) เพื่อจัดจำแนกเชื้อ CGMMV จำนวน 36 ไอโซเลต พบว่าสามารถแบ่งเชื้อ CGMMV ทั้ง 36 ไอโซเลต ออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ type I, II และ III จากข้อมูลการจัดจำแนกเชื้อ CGMMV ที่กล่าวมาทำให้ทราบว่าเชื้อ CGMMV มีความหลากหลายของสายพันธุ์ และสามารถเข้าทำลายพืชวงศ์แตงได้หลายชนิด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติทางชีววิทยา และลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ CGMMV สาเหตุโรคใบด่างเขียวที่แยกได้เมลอน และน้ำเต้า เพื่อให้ได้ข้อมูลลักษณะประจำตัวของเชื้อแต่ละไอโซเลต และได้ข้อมูลเบื้องต้นในการหาแนวทางการควบคุม และกำจัดเชื้อ CGMMV ต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การปลูกเชื้อไวรัสบนพืชทดสอบ และการยืนยันการติดเชื้อด้วย Indirect ELISA

ปลูกพืชจำนวน 37 ชนิด สำหรับใช้ทดสอบเชื้อ CGMMV จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ CGMMV ME-9 (แยกได้จากเมลอน), CGMMV BG-15 และ CGMMV BG-17 (แยกได้จากน้ำเต้า) (ได้รับการอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์

ดร.เพชรรัตน์ ธรรมเบญจผล สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น) ด้วยการเพาะต้นกล้าพืชชนิดต่างๆ แล้วร่อนกระทั้งใบเลี้ยงเจริญเต็มที่จึงนำมาปลูกเชื้อด้วยวิธีกล (mechanical inoculation) โดยนำใบแดงกวาที่ติดเชื้อมาบดให้ละเอียดใน 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) (1:10 w/v) ที่ผสม celite แล้วจึงนำน้ำคั้นไปพืชเป็นโรคมะทาหลงบนใบเลี้ยงต้นกล้า ล้างด้วยน้ำสะอาดให้ทั่วใบ สังเกตอาการที่ปรากฏบนใบพืช 7-30 วัน ทำการตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อด้วยเทคนิค indirect-ELISA กับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ CGMMV โดยพืชที่ให้ผลบวกต้องมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร เป็นสองเท่าของพืชปกติ หลังจากนั้นนำพืชที่ให้ผลบวกมาตรวจสอบการสร้างโปรตีนแปลกปลอม (inclusion body) ที่บริเวณท้องใบ เส้นกลางใบ หรือเซลล์ขน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง

การศึกษาอนุภาคของเชื้อไวรัส CGMMV

นำใบแดงกวาที่ผ่านการตรวจสอบยืนยันการติดเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต มาเพิ่มปริมาณและ แยกสกัดไวรัสบริสุทธิ์ โดยปรับปรุงวิธีการแยก ไวรัสบริสุทธิ์ของยุง⁹ เมื่อได้ไวรัสบริสุทธิ์แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีการ ของ Sambrook¹⁶ และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอนุภาคไวรัสด้วยเครื่อง Micro-Volume UV-Vis spectrophotometer (Nano-Drop) โดยใช้อัตราส่วนค่าการดูดซับแสงที่ความยาวคลื่น 260/280 นาโนเมตร (เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน คือ 1.38) คำนวณหาความเข้มข้นของอนุภาคไวรัสโดยใช้ค่า extinction coefficient ที่ $E_{260}^{1\%} = 3.18^{17}$ และนำตัวอย่างจากไวรัสบริสุทธิ์ที่แยกสกัดได้มาตรวจสอบลักษณะอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) ด้วยวิธี Dip preparation¹⁸

การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มด้วยเทคนิค RT-PCR

นำเชื้อไวรัส CGMMV บริสุทธิ์ทั้ง 3 ไอโซเลตที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี Phenol: Chloroform Extraction และตรวจสอบขนาดจีโนมไวรัสบน agarose gel ความเข้มข้น 1% จากนั้นนำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มาใช้เป็นต้นแบบในการสังเคราะห์ first stand cDNA (Reverse transcription; RT) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มด้วยไพรเมอร์ prCG6 (-) (5'-CTC GAA ACT AAG CTT TCG-3')¹⁹ ซึ่งประกอบไปด้วยส่วนผสมและขั้นตอนดังนี้ คือ RNA template ปริมาตร 2 ไมโครลิตร reverse primer ความเข้มข้น 10 μ M ปริมาตร 1 ไมโครลิตร

น้ำกลั่นปราศจากอาร์เอ็นเอส (water, RNase-Free) ปริมาตร 7 ไมโครลิตร น้ำส่วนผสมไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันที นาน 10 นาที แล้วเติม complete RT reaction ประกอบด้วย น้ำกลั่นปราศจากอาร์เอ็นเอส ปริมาตร 6.75 ไมโครลิตร 10x RT buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร dNTP mixed (10 mM dNTP) ปริมาตร 1.25 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 mM) ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร และ M-MLV RT (25x) ปริมาตร 1.0 ไมโครลิตร แล้วแช่ในน้ำแข็ง นาน 10 นาที แล้วจึงนำเข้าเครื่อง Thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมควบคุมอุณหภูมิดังนี้ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที 4 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เมื่อครบเวลาจึงนำมาเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ด้วยไพรเมอร์ prCG6 (-) (5'-CTC GAA ACT AAG CTT TCG-3') และ prCG6(+) (5'-TTT CTG GTG TAT GGA ACG TA-3')¹⁹ ที่ประกอบด้วยส่วนผสมดังนี้ cDNA reaction ปริมาตร 3.0 ไมโครลิตร 10x PCR buffer ปริมาตร 5.0 ไมโครลิตร dNTP mixed (25 mM) ปริมาตร 4.0 ไมโครลิตร reverse primer ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร forward primer ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (25 mM) ปริมาตร 2.0 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออนหนึ่งมาเชื้อ ปริมาตร 31.5 ไมโครลิตร โดยใช้โปรแกรมควบคุมอุณหภูมิ ดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จำนวน 1 รอบ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที 55 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จำนวน 39 รอบ และ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จำนวน 1 รอบ จากนั้นตรวจวิเคราะห์ RT-PCR product โดยนำไปแยกขนาดบน 1% agarose gel electrophoresis ภายใต้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์

การโคลนยีนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลิตภัณฑ์ RT-PCR ที่เพิ่มปริมาณได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสกัด (Geneaid, USA) มาเชื่อมกับพลาสมิด pGEM[®]-T easy (Promega, USA) แล้วส่งถ่ายเข้าสู่เซลล์ผู้รับคือ *E. coli* สายพันธุ์ JM109 ที่เตรียมด้วยวิธี TSS Method²⁰ ด้วยวิธีการ heat shock จากนั้นตรวจวิเคราะห์พลาสมิดลูกผสม (recombinant plasmid) ด้วยวิธี alkaline lysis¹⁶ และ Restriction enzyme analysis แล้วจึงคัดเลือกโคลนที่มีชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการเพื่อนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยบริษัท Macrogen ประเทศสาธารณรัฐเกาหลี และหน่วยบริการ Biomolecular Analysis คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit version 7.0²¹ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์

ของยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต มาสร้างสายวิวัฒนาการร่วมกับเชื้อ CGMMV ที่มีรายงานมาก่อน 10 สายพันธุ์ และเชื้อในกลุ่ม *Tobamovirus* จำนวน 5 สายพันธุ์ ด้วยโปรแกรม MEGA 4²² โดยใช้วิธี Neighbor - Joining ใช้โมเดล Kimura 2-parameter (1,000 bootstrap replications) ในการวิเคราะห์

ผลการศึกษา

การปลูกเชื้อไวรัสบนพืชทดสอบ และการยืนยันการติดเชื้อด้วยเทคนิค Indirect-ELISA

หลังจากปลูกเชื้อ CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 และ CGMMV BG-17 บนพืชทดสอบจำนวน 37 ชนิดได้ 7-9 วัน พบว่าพืชทดสอบส่วนใหญ่แสดงอาการใบด่างสีเขียวมีขอบชัดเจน อาการใบด่างสีเขียวมีขอบเลือน อาการใบด่างสีเขียวร่วมกับอาการใบย่นและหนา และในพืชทดสอบวงศ์พริก-มะเขือ (*Solanaceae*) คือยาสูบใบเล็ก (*Nicotiana benthamiana*) แสดงอาการใบด่างร่วมกับอาการใบหงิกงอเสียรูป (Figure 1) เมื่อนำพืชทดสอบทั้งหมดมาตรวจยืนยันการติดเชื้อด้วยเทคนิค indirect-ELISA ด้วยแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ CGMMV ที่ผ่านการ cross absorption ด้วยน้ำคั้นพืชปกติ พบว่าพืชทดสอบที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ CGMMV ME-9 ในพืชวงศ์แตงมีจำนวน 19 ชนิด ได้แก่ แตงกวา 9 ชนิด แตงโม 3 ชนิด แตงไทย 4 ชนิด บวบ 1 ชนิด แผลง 2 ชนิด พืชอาศัยของเชื้อ CGMMV BG-15 ในพืชวงศ์แตงมีจำนวน 18 ชนิด ได้แก่ แตงกวา 9 ชนิด แตงโม 1 ชนิด แตงไทย 4 ชนิด บวบ 1 ชนิด แผลง 3 ชนิด และพืชอาศัยของเชื้อ CGMMV BG-17 ในพืชวงศ์แตงมีจำนวน 13 ชนิด ได้แก่ แตงกวา 7 ชนิด แตงโม 2 ชนิด แตงไทย 1 ชนิด บวบ 2 ชนิด ชูภินี 1 ชนิด และเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีพืชอาศัยในวงศ์พริก-มะเขือ 1 ชนิด คือ ยาสูบใบเล็ก โดยพืชทั้งหมดเกิดปฏิกิริยาบวกกับแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ CGMMV และมีค่าการดูดซับแสงมากกว่าสองเท่าของพืชปกติ (Table 1) และเมื่อนำพืชอาศัยที่ให้ผลบวกไปตรวจหาความผิดปกติในเซลล์พืชภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถตรวจพบการสร้างโปรตีนแปลกล้อมที่มีลักษณะผลึกในรูปหกเหลี่ยม และรูปข้าวหลามตัดภายในเซลล์ชั้นของแตงกวา ลักษณะเป็นท่อนภายในเซลล์ท่อลำเลียง และลักษณะเป็นท่อนภายในเซลล์ผิวใบใกล้ๆ กับเซลล์ปากใบ จากพืชอาศัยของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต (Figure 2)

การศึกษาอนุภาคของเชื้อไวรัส CGMMV

จากการแยกสกัดไวรัสบริสุทธิ์จากใบแตงกวาที่ได้รับการปลูกเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต พบว่าสามารถสกัดไวรัสบริสุทธิ์ได้จำนวน 3.490, 2.635, 9.645 มิลลิกรัมต่อใบ

พืช 100 กรัม สำหรับเชื้อ CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 และ CGMMV BG-17 ตามลำดับ โดยมีค่าอัตราส่วนการดูดซับแสงที่ความยาวคลื่นระหว่าง 260/280 นาโนเมตร มีค่าอยู่ระหว่าง 1.3-1.48 และเมื่อนำไปตรวจสอบลักษณะของอนุภาคไวรัสภายใต้กล้อง TEM พบลักษณะอนุภาคไวรัสเป็นแบบท่อนตรงหัวท้ายตัด (rigid rod) มีความยาวเท่ากับ 300 นาโนเมตร และความกว้าง 15 นาโนเมตร (Figure 3) และสามารถตรวจพบแถบโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต ขนาดประมาณ 17-18 kDa ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Figure 4)

การโคลนยีนเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์

จากการนำตัวอย่างไวรัสบริสุทธิ์ที่สกัดได้ มาสกัดอาร์เอ็นเอพบว่าสามารถตรวจพบอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัสขนาดเท่ากับ 6.4 kb และเมื่อนำอาร์เอ็นเอของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลตมาเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 และ CGMMV BG-17 ได้โดยมีขนาดของ RT-PCR product ที่เพิ่มปริมาณได้อยู่ในช่วงประมาณ 1100-1200 คู่เบส และเมื่อนำ RT-PCR product ของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลตไปหาลำดับ นิวคลีโอไทด์ พบว่า RT-PCR product มีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ CGMMV โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มเท่ากับ 486 นิวคลีโอไทด์ทุก ไอโซเลต โดยยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อของเชื้อ CGMMV ME-9 กับ CGMMV BG-15, CGMMV ME-9 กับ CGMMV BG-17 และ CGMMV BG-15 กับ CGMMV BG-17 มีความเหมือนกัน 99.8%, 98.4% และ 98.6% ตามลำดับและเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ไปเปรียบเทียบกับเชื้อ CGMMV ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank (Table 2) และสร้างสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 และ CGMMV BG-17 ที่ได้มีความเหมือนกับเชื้อ CGMMV สายพันธุ์ LN (EU352259) 99%, CGMMV สายพันธุ์ LN (EU352259) 100% และ CGMMV สายพันธุ์ Watermelon 98 % (AB369274) ตามลำดับ (Figure 5)

สรุปและวิจารณ์

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต โดยการปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัยชนิดต่างๆ แล้วยืนยันผลการเป็นพืชอาศัยด้วยเทคนิค indirect-ELISA แสดงให้เห็นว่าเชื้อ CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 และ CGMMV BG-17 มีความสามารถในการทำให้เกิดอาการบนพืชอาศัย

ได้แตกต่างกัน เช่นในแตงร้าน (OP) จัดเป็นพืชอาศัยของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต โดยเชื้อสามารถทำให้พืชแสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนทั้งที่มีขอบเขตชัดเจนและไม่ชัดเจนได้เหมือนกัน แต่เชื้อ CGMMV ME-9 ทำให้พืชแสดงอาการสีเขียวเข้มบริเวณเส้นใบที่แตกต่างจากเชื้อไอโซเลตอื่นขณะที่หากปลูกเชื้อ CGMMV BG-15 พืชแสดงอาการใบหงิกงอเสียรูปที่ไม่พบเมื่อปลูกเชื้อไอโซเลตอื่นและยังสามารถพบความแตกต่างของอาการบนพืชอาศัยเมื่อปลูกเชื้อ CGMMV ต่างไอโซเลตกันในพืชอื่นๆ อีกหลายชนิดได้แก่ แตงท่อนลูกผสม มัมมี

331 แตงกวามาลย์แตงร้านลูกผสมอมตะแตงไทย แตงไทยยาว แตงไทยกลม แตงไทยผสม แตงโม แฝงและบวบเหลี่ยม เป็นต้น นอกจากอาการบนพืชอาศัยที่แตกต่างกันแล้วยังพบว่าเชื้อ CGMMV ที่ต่างไอโซเลตกันมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคในพืชได้แตกต่างกัน เช่นเชื้อ CGMMV BG-17 สามารถเข้าทำลายชูกินีได้ ในขณะที่ CGMMV ME-9 และ CGMMV BG-15 ไม่สามารถเข้าทำลายได้ เช่นเดียวกับบวบหอมที่มีเฉพาะเชื้อ CGMMV BG-17 เพียงไอโซเลตเดียวที่เข้าทำลายได้ หรือในแฟงเขียวที่เชื้อ CGMMV

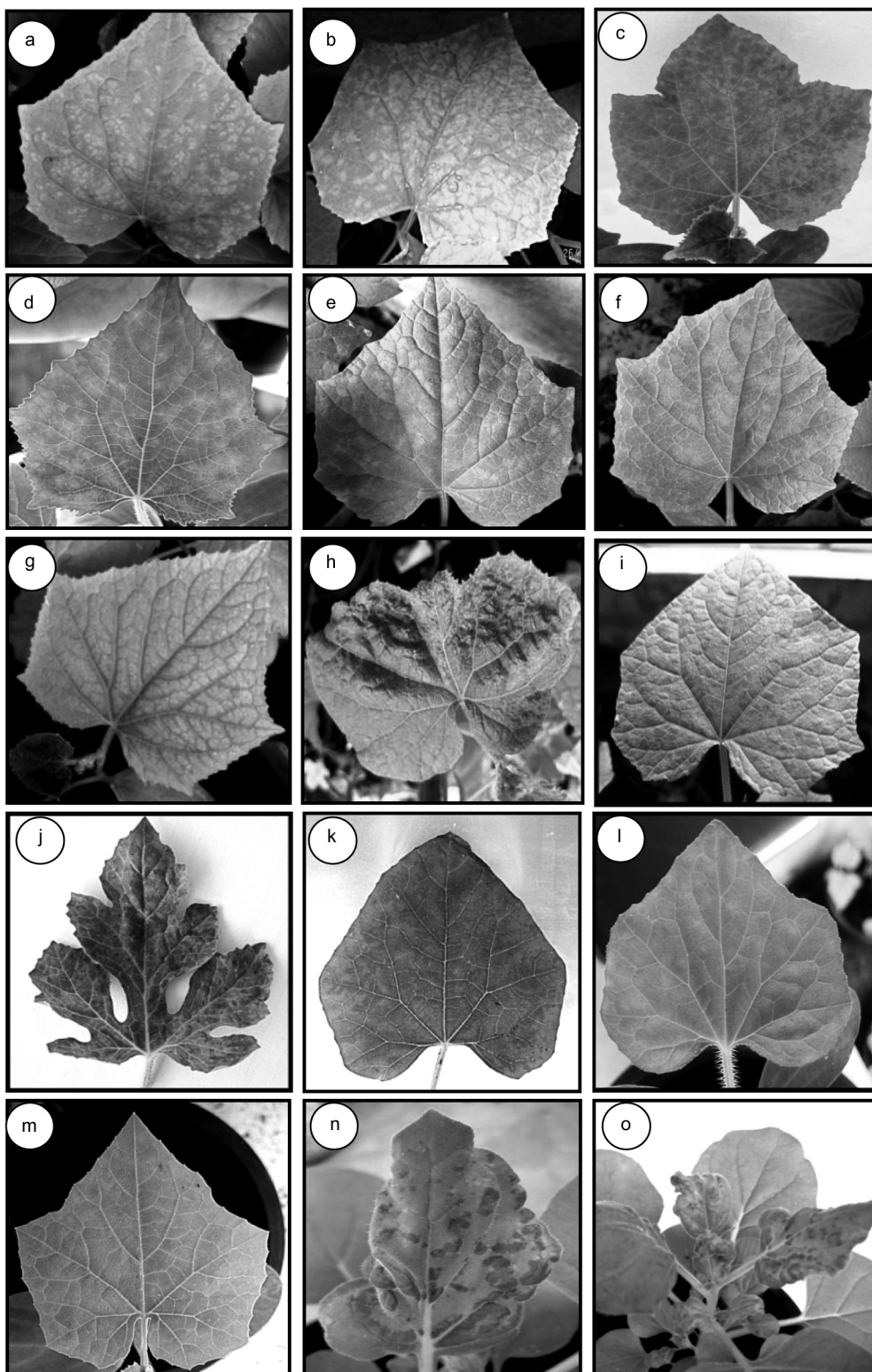


Figure 1 Symptoms on tested plants at 9 to 30 days after inoculation with CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 and CGMMV BG-17; green mosaic symptom by ME-9(a), BG-15(b), BG-17(c), green mottle symptom by ME-9(d), BG-15(e), BG-17(f), green mottle and Vein banding symptom by ME-9(g), green mottle and thick leaves symptoms by BG-15(h), green mottle and lugose by BG-17(i) on *Cucumis sativus* L., green mosaic symptoms on *Citrullus lanatus* L. by ME-9 (j), green mottle and Vein banding symptomon *Cucumis melo* L. by ME-9 (k), green mosaic symptoms on *Benincasahispida* by BG-17(l), green mosaic symptoms on *Luffa acutangula* L. by BG-17 (m), green mosaic symptoms and distortion on leaves (n) and upper leaves(o) of *Nicotiana benthamiana* by ME-9

Table 1 Symptoms of 37 tested plants inoculated with CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 and CGMMV BG-17 and detected using indirect-ELISA with CGMMV-specific antiserum

Tested Plants	CGMMV ME-9		CGMMV BG-15		CGMMV BG-17	
	Inoculated leaf	Indirect-ELISA	Inoculated leaf	Indirect-ELISA	Inoculated leaf	Indirect-ELISA
Cucurbitaceae						
<i>Cucumis sativus</i> L.						
แตงท่อนลูกผสม มี่มี 331	M, M+CuL	+	M, M+CuL	+	M, M+CuL	+
	M, M+CuL	+	Mo, Mo+CuL	+	M, M+CuL	+
แตงกวาลูกผสมนินจา 179	M+CuL+CrK+PK+LR	+	Mo+CrK	+	M, Mo	+
	M+CuL,Mo+CuL	+	M, Mo, CuL	+	M, Mo	+
แตงกวาหยกขาว	M, Mo+CuL+ LR	+	Mo+CuL	+	Mo, Mo+CuL	+
	Mo	+	Mo, Mo+CuL	+	Mo	+
แตงร้าน (OP)	Mo	+	Mo, Mo+CuL	+	Mo, Mo+CuL	+
	M, Mo	+	Mo, Mo+CuL+CrK+PK	+	Mo, Mo+CuL	+/-
แตงท่อน (เจียไต๋)	Mo, Mo+CuL	+	Mo, Mo+CuL	+	Mo, Mo+CuL	+/-
แตงกวาโปรคิว	Mo+CuL+CrK+PK	+	MT+CuL+CrK+PK	+	Mo+CuL+CrK+PK	+
	Mo+CuL+CrK+PK	+	MT+CuL+CrK+PK	+	Mo+CuL+CrK+PK	+
แตงกวาสूरिया	Mo+CuL+CrK+PK	+	MT+CuL+CrK+PK	+/-	Mo+CuL+CrK+PK	+/-
แตงกวามาลี่						
แตงร้านลูกผสมอมตะ						
<i>Citrullus lanatus</i> L.						
แตงโมดำ	M, M+CuL	+	M, M+CuL+N	+	M	+
	Mo, Mo+CuL+PK	+	Mo, Mo+CuL+PK	+	M, M+CuL+PK	+/-
แตงโมดำ	Mo, Mo+CuL	+	Mo, Mo+CuL+PK +N	+	Mo, Mo+CuL+PK	+/-
แตงโมโพธิ์สยาม	Mo	+	Mo+CuL	+	Mo+CuL	+/-
แตงโมเปลือกลาย	Mo	+	Mo, Mo+CuL+YS	+	Mo	+
<i>Cucumis melo</i> L.	PK+N	+/-	CuL+PK	+/-	Mo	+
	CuL+PK	+/-	CuL+PK+N	+/-	C	+/-
แตงไทย	CuL+PK	+/-	CuL+PK+N	+/-	CuL+PK	+/-
	C+PK	-	M+C	+/-	Mo+ C	+/-
แตงไทยยาว						
แตงไทยกลม						
แตงไทยผสม						
<i>Luffa acutangula</i> L.						
บวบเหลี่ยม						
บวบหอม						
บวบหอมยาวพิเศษ						
บวบลีลา						
บวบเลกา						
บวบเลกา						

* Viral signal was recorded by ELISA reader at 405 nm; += ELISA value higher than 2 fold of control. +/-=ELISA value is between positive and negative. -= ELISA value equal or lower than control. M = Green Mosaic, Mo = Green Mottle, CrK = Crinkling, CuL = Curling, LR= Leaf rolling, PK = Puckering, C= Chlorosis, CvL = Curve leaf, N = Necrosis

Table 1 Symptoms of 37 tested plants inoculated with CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 and CGMMV BG-17 and detected using indirect-ELISA with CGMMV-specific antiserum (Cont).

Tested Plants	CGMMV ME-9			CGMMV BG-15			CGMMV BG-17		
	Inoculated leaf			Inoculated leaf			Inoculated leaf		
<i>Benincasa hispida</i> Cogn.									
แฟง	Mo+PK	+		Mo+PK	+		Mo+CuL		+/-
แฟงเขียว	M+PK	+/-		M+PK	+		M+PK		+/-
ฟักแฟง	Mo+PK	+		Mo+PK/Mo+PK+LR	+		Mo+PK		+/-
<i>Cucurbita moschata</i> Decne.									
ฟักทองแดงดอก	Mo+PK+C	-		Mo+PK+C+N	-		Mo+PK+C+N		-
ฟักทองศรีเมือง	Mo+PK+C	-		Mo+PK+C	-		Mo+PK		-
ฟักทองบึงกาฬ	Mo+PK	-		Mo+PK+C	-		Mo+PK+C		-
ฟักทองลุงทอง	Mo+PK+C	-		Mo+PK+C	-		Mo+PK+C		-
	Mo+PK	-		Mo+PK	-		Mo+PK		-
	Mo+CuL	-		Mo+CuL	-		Mo+CuL		-
	Mo+CuL	-		Mo+CuL	-		Mo+CuL		+
<i>Momordica charantia</i> Linn.									
มะระขี้นก	CrK +CuL + PK	-		CrK +CuL + PK	-		CrK +CuL + PK		-
มะระจีน	Mo+ PK + CuL	-		CuL	-		PK + CuL		-
	Mo+ PK + CuL	-		CuL	-		CuL		-
<i>Cucurbita pepo</i> L. var. <i>cylindrica</i> Pans.									
ซูกิณี	Mo+ PK + CuL	-		Mo+ PK + CuL	-		Mo+ PK + CuL		-
Solanaceae									
<i>Capsicum frutescens</i> Linn.	Mo+ PK + CuL	+		Mo+ PK + CuL+ CrK	+		Mo+ PK + CuL+ CrK		+
พริกมันดำ	Mo+ PK+ CuL	-		Mo	-		Mo+PK+CuL		-
พริกกระเทียม									
พริกขี้หนูขาว									
<i>Physalis minima</i> Linn.									
โหงเทง									
<i>Nicotiana benthamiana</i>									
ยาสูบใบเล็ก									
<i>N.tabacum</i>									
ยาสูบใบใหญ่									

* Viral signal was recorded by ELISA reader at 405 nm; += ELISA value higher than 2 fold of control. +/-=ELISA value is between positive and negative. -= ELISA value equal or lower than control. M = Green Mosaic, Mo = Green Mottle, CrK = Crinkling, CuL = Leaf rolling, PK = Puckering, C= Chlorosis, CvL = Curve leaf, N = Necrosis

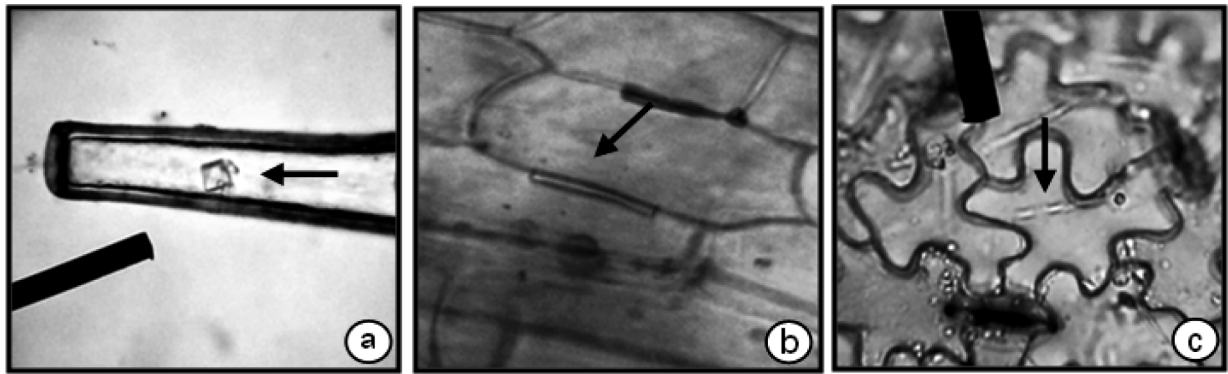


Figure 2 Inclusion bodies on cucurbit plant after 14 days inoculation with CGMMV BG-17; crystal clear hexagon diamonds inclusions body on hair cell (a), needle crystalline inclusions body on vascular cells and epidermal cells (b and c)

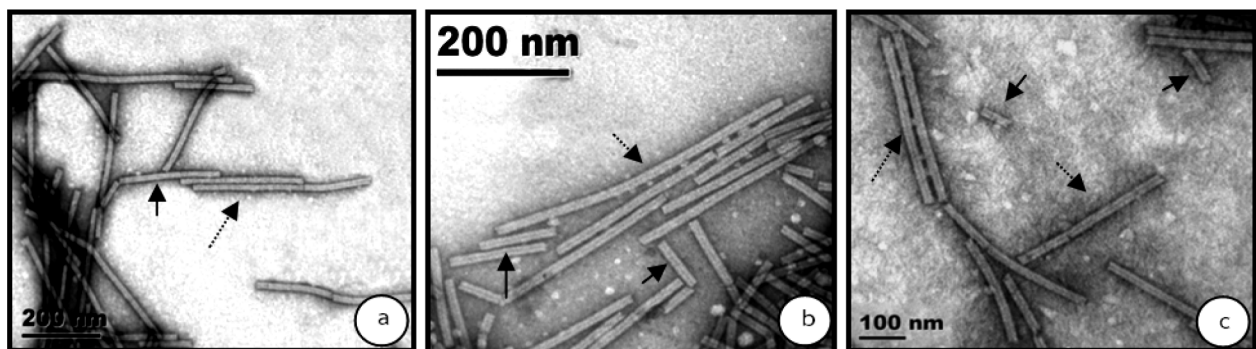


Figure 3 Rigid rod-shaped particles of CGMMV ME-9(a), CGMMV BG-15(b) and CGMMV BG-17(c) approximately sized at 15x 300 nm were examined under TEM

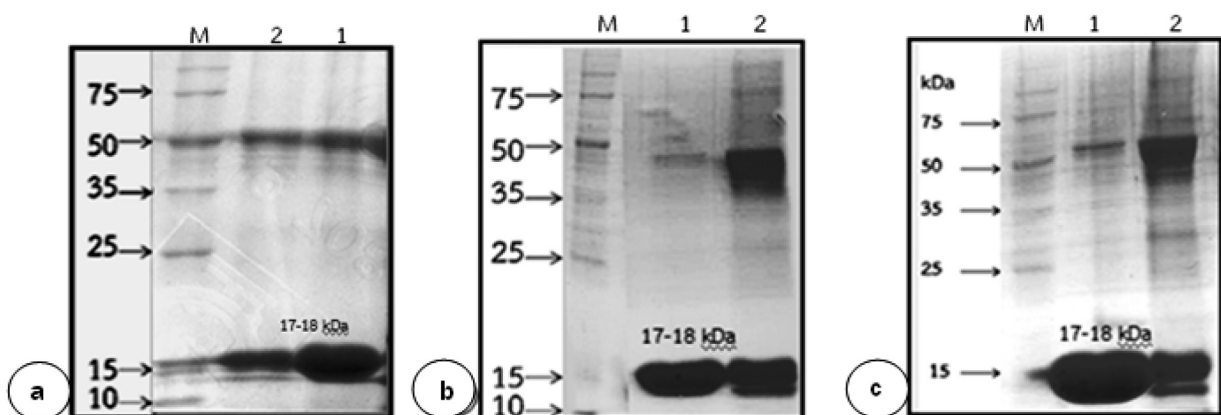
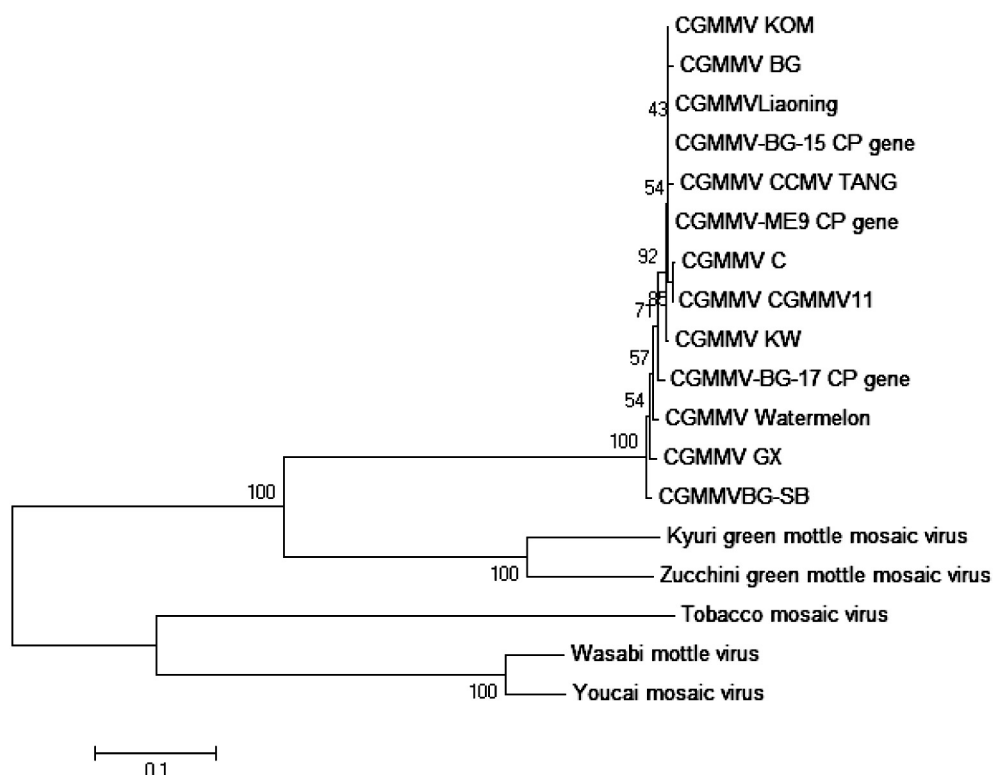


Figure 4 Coat protein of CGMMV ME-9 (a), CGMMV BG-15 (b), CGMMV BG-17(c) approximately sized at 17-18 kDa were determined using 12% SDS-PAGE

Table 2 Accession number and referenced CGMMV strain were used to compare with CGMMV ME-9, BG-15 and BG-17 in this study

Virus Name	Accession number	Isolate/Strain
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	AB369274	Watermelon
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	EF611826	Liaoning
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	FJ654657	BG-SB
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	GQ277655	GX
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	FJ654659	BG
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	HQ692886	CGMMV11
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	HM008919	CCMV_TANG
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	AF417243	KOM
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	FJ654658	C
Cucumber Green Mottle Mosaic Virus	AF417242	KW
Tobacco Mosaic Virus	HE818437	Mangshi-2
Wasabi Mottle Virus	AB017504	Tochigi
Yocai Mosaic Virus	DQ223770	Impatien
Kyuri Green Mottle Mosaic Virus	AJ295948	-
Zucchini Green Mottle Mosaic Virus	AJ295949	-

**Figure 5** Phylogenetic analyses of CGMMV ME-9, BG-15 and BG-17 compared with reference CGMMV strains and other *Tobamoviruses* based on complete coat protein nucleotides sequences

BG-15 สามารถเข้าทำลายได้ แต่เชื้อ CGMMV ME-9 และ CGMMV BG-17 ไม่สามารถเข้าทำลายได้เมื่อพิจารณาจากค่า ELISA ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yoon¹⁵ ที่พบว่าเชื้อ CGMMV ซึ่งแยกได้จากแตงโมและแตงกวา มีชนิดของพืชอาศัยและอาการบนพืชอาศัยบางชนิดที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต จะมีความผันแปรของอาการบนพืชอาศัย แต่สิ่งที่เชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีคุณสมบัติร่วมกันคือ สามารถสร้างโปรตีนแปลกลมลักษณะเป็นผลึกหกเหลี่ยมภายในเซลล์ ลักษณะเป็นท่อนภายในเซลล์ท่อนลำเลียง และลักษณะคล้ายเข็มใสใน epidermal cell ของใบภายในพืชอาศัยได้เหมือนกันนอกจากนี้เชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต ยังมีโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคมีขนาดประมาณ 17-18 kDa และมีลักษณะอนุภาคไวรัสเป็นแบบท่อนตรงหัว-ท้ายตัดยาว 300 นาโนเมตร และกว้างประมาณ 15 นาโนเมตร เหมือนกันและสอดคล้องกับงานวิจัยของยูทว⁹ และ Shim²³ ที่ได้ศึกษามาก่อน ดังนั้นจากการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อ CGMMV ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลตมีคุณสมบัติทางชีววิทยาบางประการที่แตกต่างกัน

เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 และ CGMMV BG-17 ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ CGMMV และเป็นส่วนของยีนโปรตีนห่อหุ้มที่มีจำนวน 486 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับการศึกษาการศึกษาของ Ugaki³ ที่พบว่ายีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ CGMMV-SH มีขนาด 485 นิวคลีโอไทด์ และใกล้เคียงกับการศึกษาของฉัตรนัท⁵ ที่พบว่ายีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ CGMMV จำนวน 9 ไอโซเลต ที่แยกได้จาก แตงกวา แตงโม เมลอน และน้ำเต้า ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีขนาด 485 นิวคลีโอไทด์ และจากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลตมาเปรียบเทียบกัน ทำให้ทราบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีความเหมือนกันอยู่ที่ประมาณ 98.4-99.8 % ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต มีความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค และอาจเป็นอีกข้อมูลหนึ่งที่สนับสนุนว่าเชื้อ CGMMV ที่ศึกษาในครั้งนี้มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yoon¹⁵ ที่พบว่าเชื้อ CGMMV ซึ่งแยกได้จากแตงโมและแตงกวา มีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนที่ยีนโปรตีนห่อหุ้มบ้างเล็กน้อย โดยมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 98.3-99.4% และลำดับกรดอะมิโนเท่ากับ 99.4-100%

นอกจากนี้เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ยีนโปรตีนห่อหุ้มของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต ไปเปรียบเทียบกับเชื้อ CGMMV ที่มีรายงานมาก่อนในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ CGMMV ME-9, CGMMV BG-15 มีความเหมือนกับเชื้อ CGMMV สายพันธุ์ LN มากที่สุด 99% และ 100% ตามลำดับและเชื้อ CGMMV BG-17 มีความเหมือนกับเชื้อ CGMMV สายพันธุ์ Watermelon มากที่สุด 98% เช่นเดียวกับการศึกษาของฉัตรนัท⁵ ที่พบว่าเชื้อ CGMMV-13ML, CGMMV-1ML มีความเหมือนกับเชื้อ CGMMV สายพันธุ์ LM (จีน) มากที่สุด 99.95% และ 99.38% ตามลำดับ และเชื้อ CGMMV#23 WM, CGMMV#26 WM, CGMMV#27WM, CGMMV#13 CU, CGMMV#17 CU, CGMMV#15 CU, มีความเหมือนกับเชื้อ CGMMV-Watermelon (เกาหลี) มากที่สุด 99.18%, 99.18%, 99.18%, 99.18%, 99.18%, 98.76% และ 98.56% ตามลำดับ

ดังนั้นจากข้อมูลความแตกต่างของชนิดและอาการบนพืชทดสอบบางชนิด ความผันแปรของลำดับ นิวคลีโอไทด์ในส่วนยีนโปรตีนห่อหุ้ม และการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของเชื้อ CGMMV ทั้ง 3 ไอโซเลต กับเชื้อ CGMMV อื่นๆ ที่มีรายงานมาก่อน แสดงให้เห็นว่าเชื้อ CGMMV ที่แยกได้จากเมลอน และน้ำเต้า มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม

คำขอขอบคุณ

ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนฝ่ายบริหารจัดการ คลัสเตอร์ และโปรแกรมวิจัยสำนักบริหารจัดการคลัสเตอร์ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ และโครงการทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนานิสิตระดับบัณฑิตศึกษา (ปริญญาโท) เลขที่สัญญา 5504026/2555 งบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่มีส่วนร่วมในการสนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล สาขาโรคพืชวิทยา ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อ CGMMV ในการศึกษาวิจัย ตลอดจนให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Kirkbride JH Jr, Dallwitz MJ. *Cucumis* and *Cucumella* (Cucurbitaceae): cucumbers and melons:1. <http://nt.ars-grin.gov/seedsfruits/keys/cucumis/index.cfm>.2010
- Joy PP, Thomas J, Mathew S, Skaria BP. Medicinal plants. Aromatic and medicinal plants research station, Kerala Agricultural University, India; 1998. p. 132.
- Ugaki M, Tomiyama M, Kakutani T, Hidaka S, Kiguchi T, Nagata R, et al. The complete nucleotide sequence of *Cucumber green mottle mosaic virus* (SH strain) genomic RNA. J Gen Virol 1991; 72: 1487-1495.
- Tan SH, Nishiguchi M, Murata M, Motoyoshi F. The genome structure of *kyuri green mottle mosaic tobamovirus* and its comparison with that of cucumber green mottle mosaic tobamovirus. Arch Virol 2000; 145:1067–1079.
- ฉัตรนัททรี กันทะลา. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* ในแตงกวาแตงโมและเมลอนและปฏิสัมพันธ์กับสายพันธุ์แตงกวา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น; 2554.
- Ainsworth GC. Mosaic disease of cucumber. Ann Appl Biol 1935; 22:55-67.
- Komuro Y, Tochiwara H, Fukatsu R, Nagai Y, Yoneyama S. *Cucumber green mottle mosaic virus* on watermelon in Chiba and Ibaraki Prefectures (in Japanese). Ann Phytopathol Soc Jpn 1968; 34:377.
- Wang SM, Chen MJ. A new strain of *Cucumber mottle mosaic virus* causing mosaic symptoms on bottle gourd in Taiwan. Plant Protect Bull 1985; 27:105-110.
- ยุทธ ทนโม๊ะ. การพัฒนาชุดตรวจเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* ในพืชวงศ์แตง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น; 2550.
- Chen HY, Zhao WJ, Cheng Y, Li MF, Zhu SF. Molecular identification of the virus causing watermelon mosaic disease in Mid-Liaoning. Acta Phytopath Sin 2006; 4: 306–309.
- Moradi Z, Jafarpour B. First report of coat protein sequence of *Cucumber green mottle virus* in cucumber isolated from Khorasan in Iran. Int J Virol 2011; 7(1): 1-12.
- ยุทธ ทนโม๊ะ เพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล และพิศาล ศิริธร. การอุบัติของเชื้อไวรัสที่มีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยากับเชื้อ *Cucumber green mottle mosaic virus* ในแหล่งผลิตเมล็ดพันธุ์แตงและวิธีการผลิตแอนติซีรัมที่จำเพาะต่อเชื้อ. หน้า 227-236 ใน: การประชุมทางวิชาการประจำปี พ.ศ. 2547 ของสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 16 “นวัตกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ: หนึ่งทางเลือกเพื่อยกระดับสู่ครัวของโลก”: โรงแรมท็อปแลนด์ พิษณุโลก; 2547.
- ยุทธ ทนโม๊ะ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. โรคไวรัสในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์พืชวงศ์แตงภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ใน: การประชุมทางวิชาการ KKU Agricultural Sciences Seminar 2008. มหาวิทยาลัยขอนแก่น; 2551.
- รัชณี ศิริยาน กมล เลิศรัตน์ และเพชรรัตน์ ธรรมเบญจพล. การคัดเลือกพันธุ์แตงกวาด้านทนต่อไวรัสใบด่างเขียวแตงกวา (*Cucumber green mottle mosaic virus*). ใน: การประชุมวิชาการอารักขาพืชแห่งชาติครั้งที่ 8. โรงแรมอมรินทร์ลากูน, พิษณุโลก; 2550.
- Yoon JY, Choi GS, Choi SK, Hong JS, Choi JK, Kim W, Lee GP, Ryu KH. Molecular and biological diversities of *Cucumber green mottle mosaic virus* from *Cucurbitaceous* crop in Korea. J Phytopathol 2008; 156: 408-412.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York; 1989. p. 18.47-18.59.
- Antignus Y, Wang Y, Pearlsman M, Lachman O, Lavi N, Gal-On A. Biological and molecular characterization of a new cucurbit-infecting Tobamovirus. Phytopathol 2001; 91: 565-571.
- Dijkstra J, de Jager CP. Practical Plant Virology: Protocols and Exercises. (Springer Lab Manuals) Springer: Berlin; 1998. p. 459.
- Kim SM, Lee JM, Yim KO, Oh MH, Park JW, Kim KH. Nucleotide sequences of two Korean isolates of *Cucumber green mottle mosaic virus*. Mol Cells 2003; 16(3): 407-12.

20. Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86(7): 2172-2175.
21. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 1999; 41: 95-98.
22. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol 2007; 24(8): 1596-1599.
23. Shim CK, Han KS, Lee JH, Bae DW, Kim DK, Kim HK. Isolation and characterization of watermelon isolate of cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV-HY1) from watermelon plant with severe mottle mosaic symptoms. Plant Pathol J 2005; 21(2): 167-171.