

การประเมินความต้านทานของพืชวงศ์แตงบางชนิดต่อเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* Assessment of Resistance to *Squash leaf curl Yunnan virus* in Some Cucurbitaceous Plants

ณัฐพร บุตรนุช^{1/, 2/}, วิชัย โฆสิตรัตน์^{1/, 2/} และ สุจินต์ ภัทรภูวดล^{1/, 2/, 3*}
Nattaporn Butnut^{1/, 2/}, Wichai Kositratana^{1/, 2/} and Sujin Patarapuwadol^{1/, 2/, 3*}

Received 29 Sep 2018/Revised 04 Dec 2018/Accepted 15 Feb 2019

ABSTRACT

The distinct species of begomovirus named *Squash leaf curl Yunnan virus* (SLCuYV) was detected in Thailand. It caused yellow leaf curl diseases of commercial varieties of various cucurbitaceous plants and led to severe losses in both fruit quality and yield. The virus spreads widely across the country due to the effective transmission by whiteflies (*Bemisia tabaci*). Breeding for resistance of plant is the most effective approach to reduce disease loss. The aim of this study was to assess the resistance of pumpkin, wax gourd and ridge gourd cultivars to infection by SLCuYV isolate TH-PK-2018 (SLCuYV-TH-PK-2018) under greenhouse conditions. A total of 152 accessions including 106 of pumpkin (*Cucurbita moschata*), 39 of wax gourd (*Benincasa hispida*), and 7 of ridge gourd (*Luffa acutangula*) were evaluated for SLCuYV infection by whitefly transmission. Ten to fifteen adult whiteflies were provided a 48 hour acquisition access period (AAP) initially on the symptomatic pumpkin plants, and then transferred to each healthy seedling at the first true leaf stage for a 72 hour inoculation access period (IAP). The presence of SLCuYV in inoculated plants was determined by using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the symptoms were scored at 4 weeks post inoculation. Virus infection index based on percentage of disease index and vulnerability index classified 20 resistant accessions including 3 of pumpkin, 10 of wax gourd and 7 of ridge gourd.

Key words: Pumpkin, Wax gourd, Ridge gourd, *Squash leaf curl Yunnan virus*, Disease resistant

^{1/} ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

^{1/} Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

^{2/} ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

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

^{3/} ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

^{3/} Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

* Corresponding author: agrsujp@ku.ac.th

บทคัดย่อ

Squash leaf curl Yunnan virus (SLCuYV) เป็นสาเหตุโรคของพืชวงศ์แตง (Family Cucurbitaceae) หลายชนิด และสร้างความเสียหายทั้งในด้านปริมาณ และคุณภาพของผลผลิต เชื้อไวรัสแพร่กระจายในแปลงปลูกได้อย่างรวดเร็ว โดยมีแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อ การใช้พืชที่มีพันธุกรรมต้านทานต่อไวรัสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการช่วยลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นจากโรคดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความต้านทานของพืชวงศ์แตงบางชนิดต่อเชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ไอโซเลท TH-PK-2018 (SLCuYV-TH-PK-2018) ในสภาพโรงเรือน โดยทำการทดสอบพืชวงศ์แตง จำนวน 152 สายพันธุ์ ได้แก่ ฟักทอง (*Cucurbita moschata*) 106 สายพันธุ์ ฟักแฟง (*Benincasa hispida*) 39 สายพันธุ์ และบวบเหลี่ยม (*Luffa acutangula*) 7 สายพันธุ์ ถ่ายทอดเชื้อไวรัสสู่พืชทดสอบโดยให้แมลงหวี่ขาวดูดกินบนต้นฟักทองที่มีเชื้อ SLCuYV เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นให้แมลงดูดกินต้นพืชปกติที่นำมาทดสอบเป็นเวลา 72 ชม. หลังการถ่ายทอดโรค 4 สัปดาห์ ตรวจสอบเชื้อไวรัสในต้นพืชที่ทดสอบด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) บันทึกลักษณะอาการและจัดระดับความต้านทานจากค่าดัชนีการเกิดโรคที่คำนวณจากเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และดัชนีความรุนแรงของอาการโรค ผลการทดลองพบว่า มีสายพันธุ์พืชที่จัดอยู่ในระดับต้านทาน (Resistant) จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ ฟักทอง ฟักแฟง และบวบเหลี่ยม จำนวน 3 10 และ 7 สายพันธุ์ ตามลำดับ

คำสำคัญ: ฟักทอง, ฟักแฟง, บวบเหลี่ยม, *Squash leaf curl Yunnan virus*, พืชต้านทานโรค

บทนำ

โรคใบหงิกเหลืองของพืชวงศ์แตง เป็นโรคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างมากให้กับการปลูกพืชวงศ์แตงทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ พบการระบาดของโรคทั่วไปในเขตร้อนและกึ่งร้อน (Fortes *et al.*, 2016) รวมทั้งประเทศไทยด้วย (รุ่งทิพย์และคณะ, 2560) สาเหตุของโรคใบหงิกเหลืองเกิดจากเชื้อไวรัสจัดอยู่ในจีนัสเบโกโมไวรัส (begomovirus) ซึ่งมีอนุภาคเป็นรูปทรงกลม (icosahedral) อยู่ติดกันเป็นคู่ (geminated particles) ขนาด 22 x 38 นาโนเมตร สารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว เชื่อมต่อเป็นวง มีสองวง (component A, component B) (Czosnek *et al.*, 2017) โดยเชื้อไวรัสในจีนัสเบโกโมไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคของพืชวงศ์แตง เช่น *Squash leaf curl Yunnan virus* (SLCuYV), *Squash leaf curl virus* (SLCV), *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV), *Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV), *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) (Ito *et al.*, 2008; รุ่งทิพย์ และคณะ, 2560) โรคไวรัสดังกล่าวมีแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เป็นแมลงพาหะ เมื่อพืชได้รับเชื้อเบโกโมไวรัสจะแสดงอาการใบหงิกเหลือง ใบม้วนรูปถ้วย ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ต้นเตี้ยแคระ ผลมีอาการต่าง เขียวสลับเหลือง และขนาดเล็กลง นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบเชื้อเบโกโมไวรัสเข้าทำลายพืชวงศ์แตงหลายชนิดในประเทศต่าง ๆ ได้แก่ ฟักเขียว ในประเทศอินเดีย ฟักทองในสาธารณรัฐประชาชนจีน และบวบในประเทศปากีสถาน นอกจากนี้ เชื้อไวรัสยังมีพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ พืชตระกูลถั่ว มะเขือเทศ มันฝรั่ง มะเขือพริก และมันสำปะหลัง เป็นต้น (Abudy *et al.*, 2010)

เชื้อ SLCuYV พบครั้งแรกในสควอชที่แสดงอาการใบม้วนและใบด่างในมณฑลยูนนาน สาธารณรัฐประชาชนจีน (Xie and Zhou, 2003) สำหรับประเทศไทยพบโรค Squash leaf curl ที่เกิดจากเชื้อ SLCCNV (GenBankAcc.no. AB330078) ในฟักทองที่แสดงอาการใบหงิกเหลืองใน จ.นครปฐม โดย Ito et al. (2008) ต่อมา Sawangjit (2009) พบเชื้อ SLCCNV-[TH: Wax: 08] (GenBankAcc.no. EU543562) ในฟักเขียวที่แสดงอาการใบหงิกเหลือง ใน จ.นครปฐม และ รุ่งทิพย์และคณะ (2560) พบฟักทองแสดงอาการใบหงิกเหลือง ใบม้วน ใบลดรูป ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง และต้นเตี้ยแคระใน จ.นครปฐม ที่เกิดจากเชื้อ SLCuYV ไอโซเลท TH-PK-2016 (GenBankAcc.no. KX388157)

เนื่องจากประเทศไทยมีสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแมลงหริ่งขาว จึงทำให้เชื้อ SLCuYV มีการแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว จึงจำเป็นต้องมีวิธีการป้องกันกำจัดเพื่อลดความสูญเสียที่จะเกิดขึ้น เช่น การใช้สารเคมีกำจัดแมลงพาหะ การคลุมต้นกล้าด้วยผ้าสับบอนด์ และการใช้พันธุ์พืชต้านทาน ซึ่งวิธีนี้จะช่วยให้ลดต้นทุนของเกษตรกร ในการลดใช้สารเคมีกำจัดแมลง และปลอดภัยต่อสุขภาพเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม ดังเช่น การศึกษาประเมินแหล่งพันธุกรรมของพืชวงศ์แตงหลายชนิด ได้แก่ *Cucurbita maxima* Duch. ex Lam., *C. mixta* Pang, *C. pepo* L. และ *C. texana* Gray ต่อเชื้อ SLCV พบว่า *C. moschata* (Duch.) Duch. exPoir. มีอาการรุนแรงต่อเชื้อนี้ ในขณะที่ *C. ecuadorensis* Cutler and Whitaker, *C. lundelliana* Bailey และ *C. martinezii* Bailey ซึ่งเป็นแตงป่า มีความต้านทานระดับ Immune เช่นเดียวกับฟักแฟง *Benincasa hispida* (Thunb.) และบวบเหลี่ยม *Luffa acutangula*

ซึ่งจะเห็นได้ว่าฟักทองส่วนใหญ่อ่อนแอต่อเชื้อนี้ ขณะที่ฟักแฟงและบวบเหลี่ยมมีความต้านทานต่อเชื้อ SLCV (Mc Creight and Kishaba, 1991) นอกจากนี้ Martinez et al. (2017) ศึกษาความต้านทานของเชื้อ ToLCNDV ในพืชวงศ์แตง พบว่า มีฟักทอง 2 สายพันธุ์ ที่ต้านทานต่อเชื้อ ToLCDNV ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาพันธุ์ต้านทานเชื้อเบโกโมไวรัสในพืชวงศ์แตง ซึ่งจำเป็นต้องมีการประเมินความต้านทานพันธุ์พืชวงศ์แตงจากแหล่งพันธุกรรมต่าง ๆ เพื่อนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์พืชให้ต้านทานเชื้อ SLCuYV ต่อไป งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความต้านทานต่อเชื้อ SLCuYV ไอโซเลท TH-PK-2018 ในพืชวงศ์แตง 3 สกุล ได้แก่ ฟักทอง (*C. moschata*) ฟักแฟง (*B. hispida*) และบวบเหลี่ยม (*L. acutangula*) ในสภาพโรงเรือน เพื่อคัดเลือกแหล่งพันธุกรรมที่ต้านทานเชื้อนี้ และนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยก จำแนก และเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส SLCuYV

นำต้นฟักทอง จำนวน 24 ตัวอย่างจากแปลงปลูกของเกษตรกรใน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ที่มีลักษณะอาการใบหงิกเหลือง ใบม้วนรูปถ้วย ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง และต้นแคระแกร็น คล้ายกับอาการเข้าทำลายโดยเชื้อ SLCuYV ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ (รุ่งทิพย์ และคณะ, 2560) จากนั้น นำมาตรวจเชื้อ SLCuYV ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ replicase-associated protein gene (AC1) ของเชื้อ SLCuYV คือ AC1-F (5' TCAACTCTCCGTCG TCTGAT -3') and AC1-R (5'-ATGCCACGCACAAACCAC 3') ตามวิธีการของ รุ่งทิพย์และคณะ (2560) และ

คัดเลือกตัวอย่างที่พบเชื้อ SLCuYV นำไปถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหิวขาว เพื่อเก็บรักษาเชื้อไวรัสไว้ในฟักทองพันธุ์อ่อนแอสายพันธุ์ LL9 จากนั้นคัดเลือกต้นที่แสดงอาการมาเพื่อจำแนกยืนยันชนิดของเชื้อ

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A เพื่อจำแนกเชื้อ SLCuYV ได้นำดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่คัดเลือกมาทำการเพิ่มปริมาณจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัส ด้วยวิธี rolling circle amplification โดยใช้ IllustraTempliPhi DNA Amplification kit (GE Healthcare Life Science, MA, USA) ตามวิธีการของผู้ผลิต นำ Total genomic begomovirus DNA มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะเพียง 1 ชนิดต่อ 1 ปฏิกริยา คือ XhoI (Fermemtas, USA) แยกชิ้นจีโนมของเชื้อเบโกโมไวรัสซึ่งมีขนาดประมาณ 2,700 คู่เบส ด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis สกัดชิ้นจีโนมออกจากเจลด้วย QIAquick® Gel Extraction Kit #28704 (QIAGEN, Germany) นำไปเชื่อมต่อกับ pQE-80L vector (QIAGEN, USA) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิดเดียวกันกับที่ตัดชิ้นจีโนมของเบโกโมไวรัส และถ่ายฝากให้กับเชื้อ *E. coli* สายพันธุ์ DH5 α ด้วยวิธีการ Heat Shock คัดเลือกโคโลนีนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A ที่ได้มาวิเคราะห์ Open reading frame (ORF) ด้วยโปรแกรม ORF nder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orfnder/>) และเปรียบเทียบกับข้อมูลของเชื้อเบโกโมไวรัสที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) จัดทำ Phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor joining (NJ) ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 จากนั้นคัดเลือกต้นฟักทองที่พบเชื้อ SLCuYV เข้าทำลาย

และศึกษาจีโนมของเชื้อแล้ว เก็บรักษาเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อไวรัส

2. การเตรียมแมลงหิวขาวที่ปราศจากไวรัสสำหรับการถ่ายทอดโรค และการเก็บรักษาเชื้อไวรัส

เก็บแมลงหิวขาวในระยะตัวอ่อน จากแปลงปลูกฟักทองใน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม นำมาเลี้ยงบนต้น มะเขือเปราะ มันเทศ ยาสูบ ในกรงเลี้ยงแมลงเพื่อเพิ่มปริมาณแมลงหิวขาวที่ปราศจากไวรัส โดยเลี้ยงแมลงถึงชั่วอายุที่ 3 หรือประมาณ 8 สัปดาห์ ใช้แมลงหิวขาวที่เลี้ยงได้นี้ถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากต้นฟักทองที่มีเชื้อ SLCuYV (จากข้อ 1) เข้าสู่ฟักทองพันธุ์ LL9 ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อ SLCuYV เพื่อเก็บรักษาเชื้อที่แยกได้และเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อไวรัสในการใช้ประเมินความต้านทานต่อไป

3. การเตรียมต้นพืชเพื่อทดสอบประเมินความต้านทานต่อเชื้อไวรัส SLCuYV

แหล่งพันธุ์กรรมของพืชวงศ์แตง 3 ชนิด ที่นำมาประเมินได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท โคลเวอร์ ซีด (ประเทศไทย) จำกัด จำนวนรวม 152 สายพันธุ์ (accessions) ได้แก่ ฟักทอง (*C. moschata*) จำนวน 106 สายพันธุ์ ฟักแฟง (*B. hispida*) จำนวน 39 สายพันธุ์ และบวบเหลี่ยม (*L. acutangula*) จำนวน 7 สายพันธุ์ เตรียมต้นกล้าทดสอบโดยเฉพาะเมล็ดในกระถาง 2.5 นิ้ว 1 เมล็ด/กระถาง จำนวน 10-20 ต้นต่อสายพันธุ์ ใช้ฟักทองพันธุ์ LL9 ซึ่งเป็นสายพันธุ์อ่อนแอจำนวน 10 ต้น เป็นกรรมวิธีควบคุม เมื่อต้นกล้าอายุ 1 สัปดาห์ หรือมีใบจริง 1 ใบ จึงนำมาถ่ายทอดเชื้อไวรัส ดูแลและเก็บรักษาต้นพืชตลอดระยะการทดลองภายในโรงเรือนกันแมลง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม โดยมีอุณหภูมิต่ำสุด 20-23°ซ. อุณหภูมิสูงสุด 31-35°ซ. ความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ย 88%

4. ทดสอบวิธีการประเมินความต้านทานของเชื้อไวรัส SLCuYV ในสภาพโรงเรือน

ศึกษาระยะเวลาที่เชื้อไวรัสมีการเพิ่มปริมาณสูงสุดหลังการถ่ายทอดโรค โดยใช้ต้นฟักทองพันธุ์อ่อนแอ LL9 จำนวน 10 ต้น เมื่อต้นกล้าอายุ 1 สัปดาห์ หรือมีใบจริง 1 คู่ใบ นำแก้วพลาสติกที่ซึ่งตาดำด้านบนมาครอบต้นพืชไว้ ใช้ aspirator ดูดแมลงหวี่ขาวจากต้นฟักทองที่ได้รับเชื้อ SLCuYV-TH-PK-2018 เป็นเวลา 48 ชม. มาปล่อยบนต้นพืชทดสอบ โดยใช้แมลงหวี่ขาวจำนวน 15-20 ตัว/พืชทดสอบหนึ่งต้น และปล่อยให้แมลงหวี่ขาวทำการถ่ายทอดโรคในสภาพโรงเรือนเป็นเวลา 72 ชม. จากนั้น ฉีดพ่นสารเคมีเพื่อกำจัดแมลง ย้ายต้นกล้าเข้าสู่โรงเรือนกันแมลง (Polston and Capobianco, 2013) ทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในพืชทดสอบด้วยเทคนิค ELISA โดยใช้แอนติซีรัม M1 (Monoclonal Antibody Production Laboratory National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, PathumThani, Thailand) หลังการถ่ายทอดโรคในสัปดาห์ที่ 1-6 เก็บตัวอย่างใบพืชจำนวน 3 ใบ/ต้น ในตำแหน่งบน กลาง และล่างของลำต้น และตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในตัวอย่างโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร (A_{405}) นำผลมาใช้ในการกำหนดระยะเวลาที่จะตรวจเชื้อไวรัสในตัวอย่างที่นำมาประเมินความต้านทาน

5. การประเมินความต้านทานของพืชต่อเชื้อไวรัส SLCuYV

ถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากต้นฟักทองที่เป็นโรคไปยังพืชทดสอบ จำนวน 152 สายพันธุ์ โดยมีฟักทองพันธุ์ LL 9 เป็นกรรมวิธีควบคุม หลังการถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหวี่ขาวตามวิธีการในข้อ 4 เมื่อครบ 4 สัปดาห์ ตรวจอาการของโรคโดยให้คะแนนตามระดับความรุนแรงของอาการโรคเป็น 5 ระดับ ดังนี้ ไม่พบอาการ (คะแนน =0), พบอาการเพียงเล็กน้อยบนใบไม่เกิน 10% ของจำนวนใบ (คะแนน =1), พบอาการรุนแรงปานกลางบนใบไม่เกิน 25% (คะแนน =2), พบอาการรุนแรงบนใบไม่เกิน 50% (คะแนน =3), พบอาการใบหงิกเหืองบนใบ 75% (คะแนน =4) พบอาการข้อปล้องหดสั้น ใบหงิกเหืองรุนแรงมากกว่า 75% (คะแนน =5) (Islam et al., 2010) แล้วนำจำนวนต้นในแต่ละระดับคะแนนมาคำนวณเป็นดัชนีความรุนแรงของอาการโรค (Vulnerability Index, V) และจัดระดับความต้านทาน (Disease reaction) ตามวิธีของ Havey, 1996 (Table 1) โดยมีสูตรคำนวณค่า V ดังนี้

$$\text{ดัชนีความรุนแรงของอาการโรค (V)} = \frac{\text{ผลรวมของ (จำนวนต้นพืช x ระดับความรุนแรงของอาการ)}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมด x ระดับความรุนแรงอาการสูงสุด}} \times 100$$

จากนั้นตรวจสอบปริมาณไวรัสของต้นพืชทดสอบด้วยเทคนิค ELISA นำจำนวนต้นที่ตรวจพบเชื้อไวรัสมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (Percentage of disease incidence, PDI) ในการจัดระดับความต้านทาน (Disease reaction) ตามวิธีของ Havey, 1996 (Table 1) โดยใช้สูตรการคำนวณเปอร์เซ็นต์ในการเกิดโรคดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (PDI)} = \frac{\text{จำนวนต้นพืชที่ตรวจพบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA}}{\text{จำนวนต้นพืชทั้งหมดที่นำมาทดสอบด้วยเทคนิค ELISA}} \times 100$$

Table 1 Category of disease reaction based on percentage of disease incidence (PDI) and vulnerability Index (V)

PDI and V index	Disease Reaction	Reaction group
0	Immune	I
1-25	Resistant	R
26-50	Moderately resistant	MR
51-75	Moderately susceptible	MS
76-100	Susceptible	S

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยก จำแนก และเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส SLCuYV

ผลการตรวจตัวอย่างต้นผักทองจำนวน 24 ตัวอย่าง ที่แสดงอาการโรค) ด้วยเทคนิค PCR โดยไพรเมอร์ AC1-F/AC1-R ที่จำเพาะต่อยีน replicase-associated protein gene (AC1) ของเชื้อ SLCuYV พบดีเอ็นเอเป้าหมายขนาด 1,080 bp ซึ่งเป็นขนาดของยีน AC1 ของเชื้อ SLCuYV ในผักทอง 5 ตัวอย่าง ได้แก่ P7, P10, P11, P12 และ P18 จากนั้น คัดเลือกตัวอย่างผักทอง P7 มาเป็นตัวแทนเพิ่มปริมาณในผักทองพันธุ์ LL9 โดยถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหริ่งขาว

การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ DNA-A พบจีโนมของเชื้อไวรัสมีขนาด 2,740 bp ในต้นผักทอง P7 มีการจัดเรียงตัวของยีนจำนวน 6 ORFs ได้แก่ ยีน AV2 AV1 AC2 AC4 AC1 และ AC3 เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST (Figure 1) พบว่า มีความใกล้เคียงกับเชื้อ SLCuYV-TH-PK-2016 (GenBank Acc.no. KX388157) มากที่สุด ที่ระดับ 97% จากเกณฑ์ที่กำหนดให้เชื้อไวรัสในระดับสายพันธุ์เดียวกันจะมีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์มากกว่า 91% (Brown *et al.*, 2015) ดังนั้น เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างผักทอง P7 จำแนกได้เป็นเชื้อ

Squash leaf curl Yunnan virus และตั้งชื่อไอโซเลตเป็น SLCuYV-TH-PK-2018 จากการที่ได้ส่งข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เก็บใน GenBank ได้รับ accession number คือ MK040597

จากนั้นนำต้นผักทองที่ตรวจพบเชื้อ SLCuYV-TH-PK-2018 มาเก็บรักษาเชื้อและเพิ่มปริมาณเชื้อในผักทองพันธุ์ LL9 เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อในการประเมินความต้านทานโรค โดยถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหริ่งขาว เก็บรักษาต้นพืชภายในโรงเรือนป้องกันแมลง ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต กำแพงแสน จ.นครปฐม

2. ทดสอบวิธีการประเมินความต้านทานของพืชต่อเชื้อไวรัส SLCuYV ในสภาพโรงเรือน

หลังจากถ่ายทอดเชื้อไวรัสให้กับผักทองสายพันธุ์ LL9 เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า เมื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA มีค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตร เท่ากับ 1.655 และพบว่า ผักทองที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัสมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค 100%

เมื่อนำแหล่งเชื้อ SLCuYV-TH-PK-2018 มาใช้ถ่ายทอดโรคให้ผักทองพันธุ์ LL9 พบว่า ระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังการถ่ายทอดเชื้อไวรัส ผักทองที่นำมาทดสอบยังไม่แสดงอาการของโรค โดยพืชเริ่มแสดงอาการใบหงิกเหลืองและเนื้อ

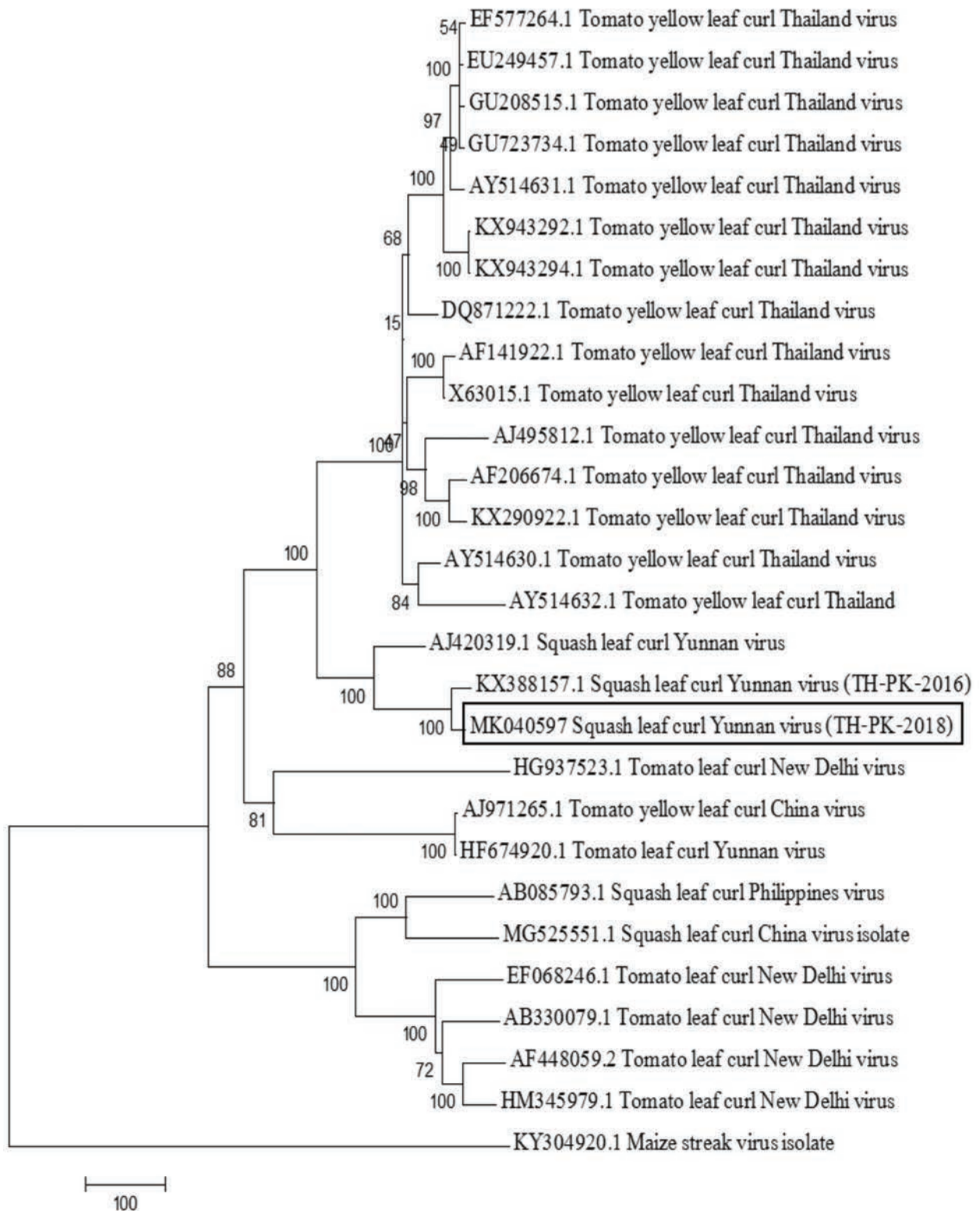


Figure 1 The phylogenetic tree showing the genetic relationship of *Squash leaf curl Yunnan virus* isolate TH-PK-2018DNA-A sequences compared with the other Begomoviruses reported in GenBank using MEGA 6.0 program. Bootstrap values are indicated on the branches (1,000 replication)

ใบย่นเล็กน้อยในสัปดาห์ที่ 2 และในสัปดาห์ที่ 3 พืชแสดงอาการใบหงิกเหี่ยว ใบมีนูนรูปถ้วย และใบลดรูป สัปดาห์ที่ 4 พืชแสดงอาการของโรคเพิ่มมากขึ้น และในสัปดาห์ที่ 5-6 พืชแสดงอาการของโรคที่ไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 3-4 (Figure 2A)

จากการนำตัวอย่างพืชมาตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA พบว่า ในสัปดาห์ที่ 1-6 มีปริมาณเชื้อไวรัสที่ค่าเฉลี่ยของการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 405 นาโนเมตรเท่ากับ 0.145, 0.702, 1.160, 2.32, 2.321 และ 1.070 ตามลำดับ (Figure 2B) โดยเชื้อไวรัสมีการเพิ่มปริมาณสูงสุดในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากนั้นจะไม่เพิ่มขึ้น ดังนั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บใบพืชมา

ตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสเพื่อใช้ในการประเมินความต้านทานคือ 4 สัปดาห์ หลังการถ่ายทอดเชื้อเนื่องจากพืชแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนและมีปริมาณเชื้อไวรัสเพิ่มขึ้นสูงสุด ผลการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ Martinez *et al.* (2017) ที่ทำการประเมินความต้านทานพืชวงศ์แตงในสกุล *Cucurbita* และ *Lagenaria* ต่อเชื้อ ToLCNDV ซึ่งเป็นเชื้อในสกุล *begomovirus* พบว่า หลังการถ่ายทอดโรคด้วยแมลงหริ่งแล้ว 35 วัน พืชแสดงอาการรุนแรงและมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคสูงสุด และพบว่า ปริมาณเชื้อไวรัสกับความรุนแรงของอาการโรค มีความสัมพันธ์แปรผันตรงต่อกัน

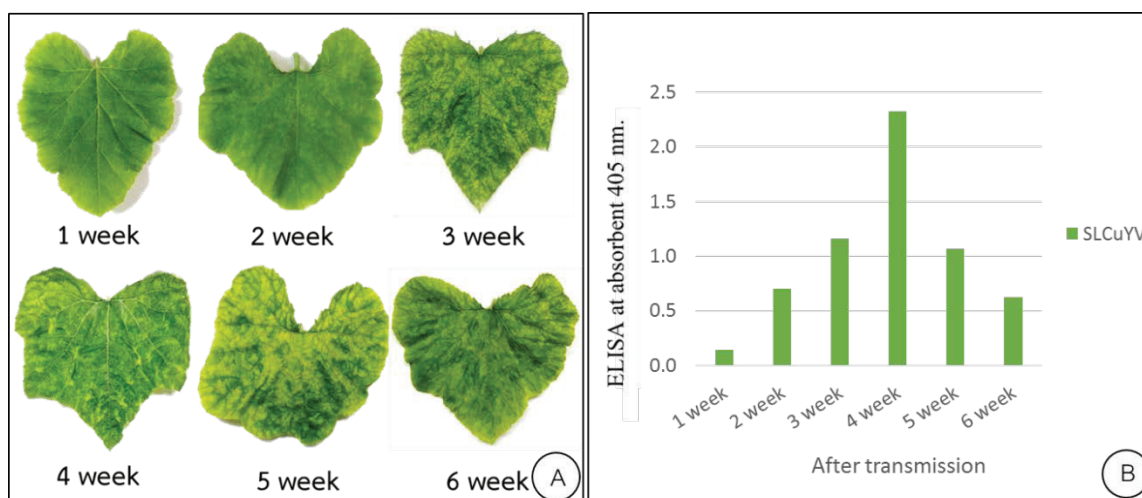


Figure 2 Accumulation of *Squash leaf curl Yunnan virus* isolate TH-PK-2018 in the pumpkin leaves at 1-6 weeks post inoculation (wpi) with whitefly (*Bemisia tabaci*). (A) Symptoms on leaves of pumpkin and (B) ELISA absorbance values of MAb M1 with SLCuYV-TH-PK-2018 at 405 nm

3. การประเมินความต้านทานของพืชต่อเชื้อไวรัส SLCuYV

จากจำนวนพืชวงศ์แตงที่ทดสอบทั้งหมด 152 สายพันธุ์ เมื่อสังเกตอาการหลังจากถ่ายทอดโรค 4 สัปดาห์ (Figure 3) และนำจำนวนต้นในแต่ละระดับคะแนนมาคำนวณเป็นดัชนีความ

รุนแรงของอาการโรค แล้วจัดระดับความต้านทานพบว่า มีพืชทน พักแ่ง และบวบเหลี่ยม จำนวน 3, 10, และ 7 สายพันธุ์ ตามลำดับ (Table 2) ที่ไม่แสดงอาการของโรค (V=0%) (Figure 3) จัดว่ามีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส SLCuYV-TH-PK-2018 ในระดับ I ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 13.16

ของสายพันธุ์พืชที่นำมาทดสอบทั้งหมด มีฟักทอง 20 สายพันธุ์ และฟักแฟง 12 สายพันธุ์ที่ต้านทานต่อเชื้อไวรัสในระดับ R โดยพืชแสดงอาการของด่างเหลืองบนใบเล็กน้อย ($V=2-24\%$) ในขณะที่ฟักทอง และฟักแฟง จำนวน 19 และ 7 สายพันธุ์ตามลำดับ แสดงอาการใบหงิกเหลืองและเนื้อใบยุบ

เพียงเล็กน้อย จัดเป็นความต้านทานระดับ MR ($V=26-50\%$) นอกจากนี้ พบว่า ฟักทอง จำนวน 64 สายพันธุ์ และฟักแฟง 10 สายพันธุ์ ซึ่งจัดอยู่ในความต้านทานระดับ MS ถึง S แสดงอาการของโรคระดับปานกลาง ($V=51-75\%$) ถึงรุนแรง ($V=76-98\%$) (Figure 4)

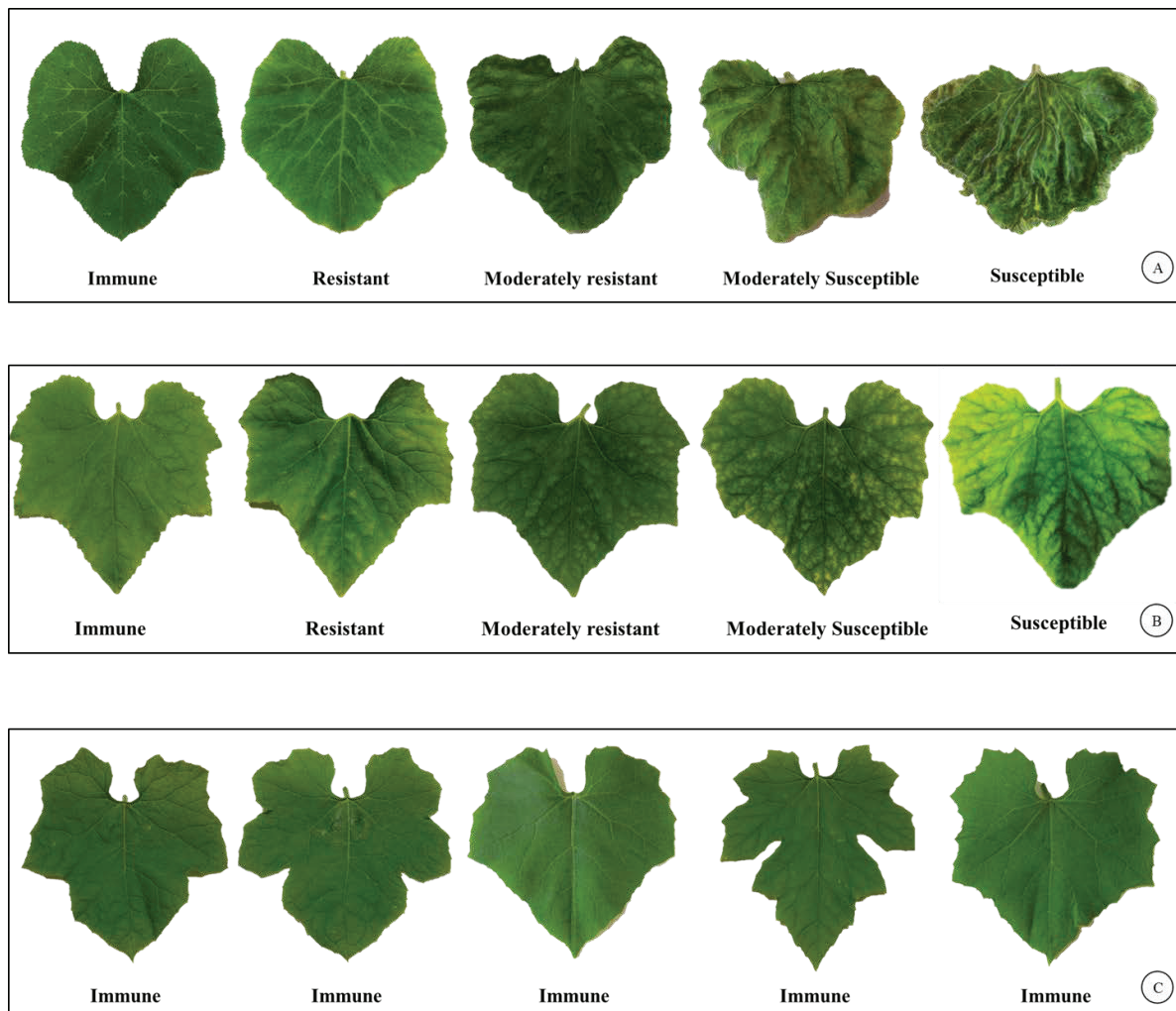


Figure 3 Symptoms on tested cucurbits leave transmitted with *Squash leaf curl Yunnan virus* isolate TH-PK-2018 at four weeks after transmission with whitefly (*Bemisia tabaci*). (A) Pumpkin: PK30, PK71, PK68, PK29 and PK95, (B) Wax gourd: WG118, WG122, WG109, WG126 and WG108 and (C) Ridge gourd: RG146, RG147, RG148, RG151 and RG152

Table 2 Summary of disease reaction of pumpkin, wax gourd and ridge gourd against *Squash leaf curl Yunnan virus* based on percentage of disease index (PDI) and vulnerability index (V)

Type of plant	Disease reaction(Plant number)									
	Immune		Resistant		Moderately resistant		Moderately susceptible		Susceptible	
	V	PDI	V	PDI	V	PDI	V	PDI	V	PDI
Pumpkin	3	3	20	5	19	14	21	19	43	65
Wax gourd	10	10	12	4	7	7	2	7	8	11
Ridge gourd	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0

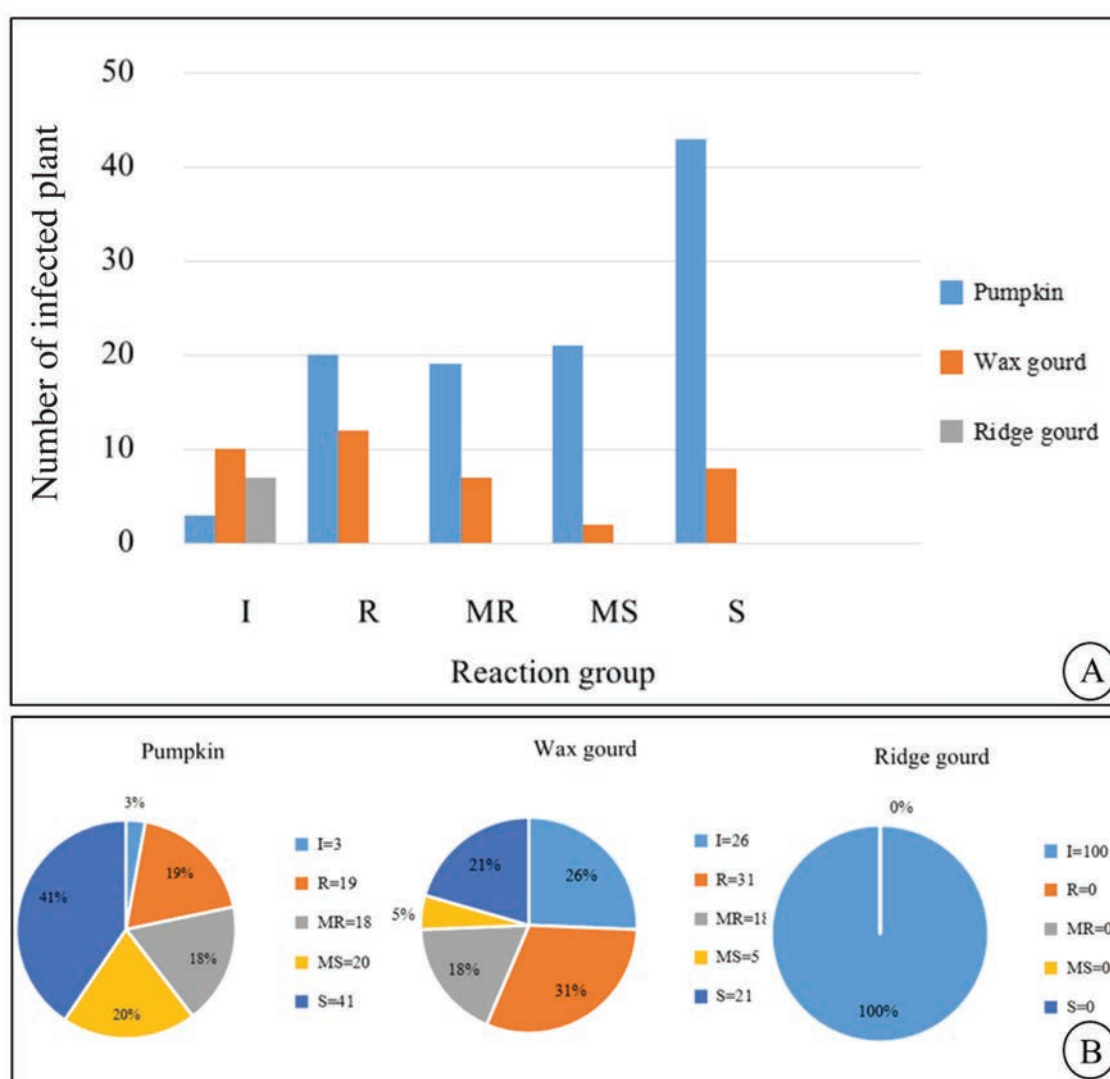


Figure 4 Summary of disease reaction of pumpkin (*C. moschata*) wax gourd (*B. hispida*) and ridge gourd (*L. acutangula*) against SLCuYV-TH-PK-2018 based on vulnerability index (A) Number of tested plant and (B) Percentage of tested plant

เมื่อตรวจวัดปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA และจัดระดับความต้านทาน พบว่า พืชทดสอบ จำนวน 20 สายพันธุ์ ได้แก่ ฟักทอง ฟักแฟง และบวบเหลี่ยม จำนวน 3, 10, และ 7 สายพันธุ์ ตามลำดับ (Table 2) มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัส SLCuYV-TH-PK-2018 ในระดับ I โดยตรวจไม่พบเชื้อไวรัสคิดเป็นร้อยละ 13.16 ของจำนวนพืชทดสอบทั้งหมด โดยมีฟักทอง จำนวน 5 สายพันธุ์ และฟักแฟง 4 สายพันธุ์ มีความต้านทานในต่อเชื้อไวรัสระดับ R มีฟักทอง จำนวน

14 สายพันธุ์ และฟักแฟง 7 สายพันธุ์ มีความต้านทาน MR และฟักทอง จำนวน 84 สายพันธุ์ ฟักแฟง 18 สายพันธุ์ มีความต้านทานต่อเชื้อไวรัสในระดับ MS ถึง S (Figure 5) ซึ่งผลการทดสอบไปในทิศทางเดียวกับ McCreight and Kishaba (1991) ที่พบว่า ฟักแฟง และบวบเหลี่ยม มีความต้านทานระดับ I ต่อเชื้อ SLCV ในขณะที่ฟักทอง ส่วนใหญ่อ่อนแอต่อเชื้อ SLCV ซึ่งเป็นเชื้อเบโกโมไวรัส เช่นเดียวกับ SLCuYV

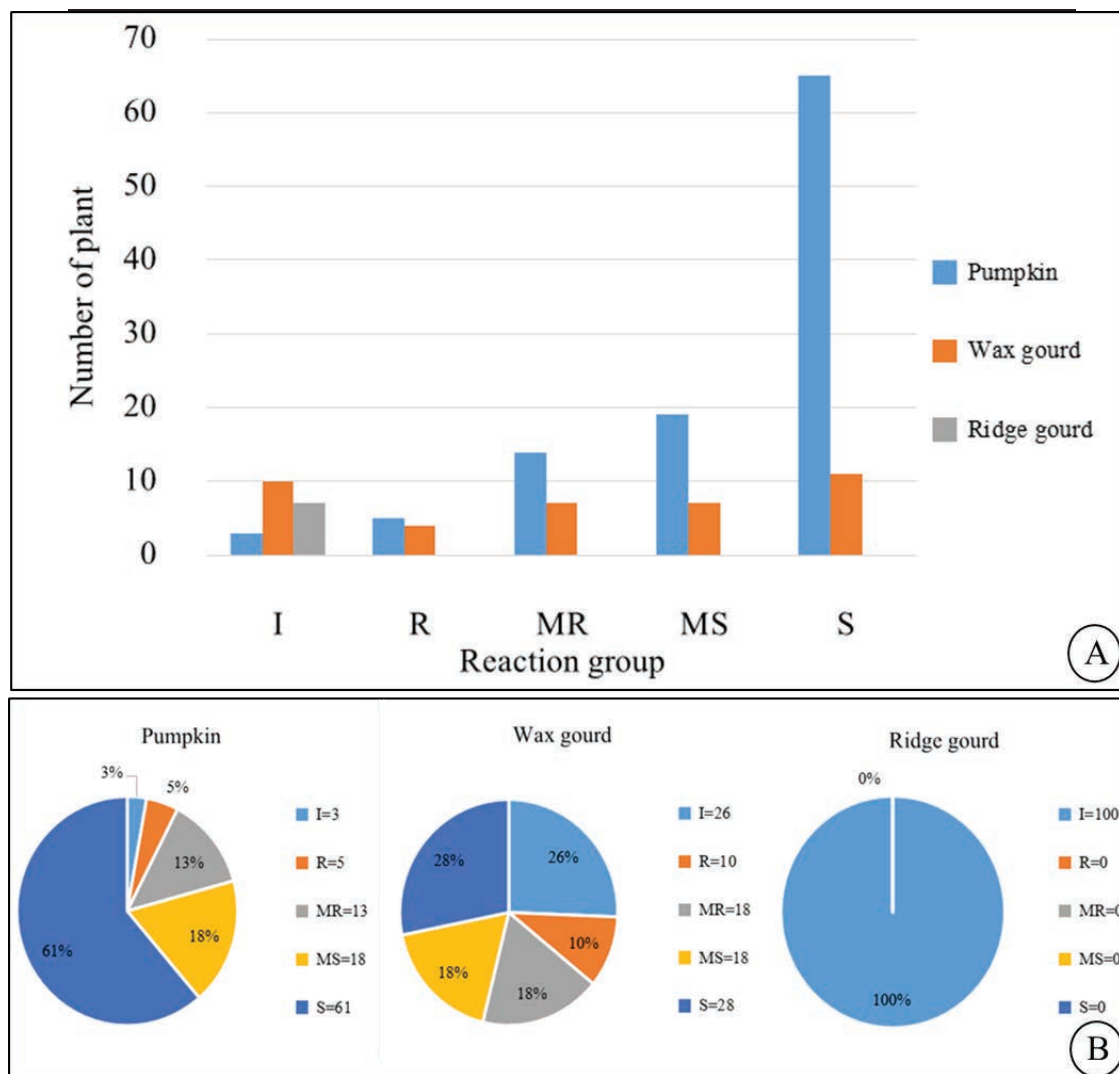


Figure 5 Summary of disease reaction of pumpkin (*C. moschata*) wax gourd (*B. hispida*) and ridge gourd (*L. acutangula*) against SLCuYV-TH-PK-2018 based on Percentage of disease index (A) Number of tested plant and (B) Percentage of tested plant

การจัดระดับความต้านทานจากค่าดัชนี การเกิดโรคที่คำนวณจากเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค และดัชนีความรุนแรงของอาการโรค พบว่า มีความแตกต่างกันในพืชทดสอบหลายพันธุ์ ทั้งนี้ เนื่องมาจากพืชในแต่ละสายพันธุ์อาจมีระดับความ รุนแรงของอาการ และการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส ที่ไม่มีความสัมพันธ์กันโดยตรง ดังนั้น ในการ คัดเลือกพืชสายพันธุ์ต้านทานจึงควรพิจารณาใช้ ข้อมูลจากทั้ง 2 วิธี ร่วมกัน โดยการตรวจวัด ปริมาณเชื้อจากเทคนิค ELISA จะช่วยสนับสนุน ข้อมูลที่ได้จากการให้คะแนนอาการโรคมีความ แม่นยำยิ่งขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้เห็นได้ว่าแหล่ง พันธุกรรมของฟักทองส่วนใหญ่มีความอ่อนแอต่อ เชื้อ SLCuYV-TH-PK-2018 มากที่สุดในขณะที่ แหล่งพันธุกรรมของบวบเหลี่ยมสัดส่วนความ ต้านทานต่อเชื้อไวรัสมากที่สุด คือ 100% ซึ่งอาจ เนื่องมาจากบวบเหลี่ยมมียีนเด่นหรือ Single dominant gene ที่ควบคุมความต้านทานของเชื้อ ในกลุ่มเบโกโมไวรัส (Islam *et al.*, 2010) ผลการ ประเมินความต้านทานพืชวงศ์แตงทั้ง 3 ชนิด พบว่า สายพันธุ์ฟักทอง ฟักแฟง และบวบเหลี่ยม 20 สายพันธุ์ มีความต้านทานระดับ I ซึ่งสามารถ นำไปใช้เป็นแหล่งพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ พืชดังกล่าวให้ต้านทานต่อเชื้อ SLCuYV ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ฟักแฟง และบวบเหลี่ยมเป็นแหล่งพันธุกรรม ของพืชวงศ์แตง ที่มีความต้านทานต่อเชื้อ SLCuYV ในขณะที่แหล่งพันธุกรรมของฟักทองส่วนใหญ่ อ่อนแอต่อเชื้อ SLCuYV ซึ่งหากต้องการคัดเลือก พันธุ์ต้านทาน จำเป็นต้องเริ่มต้นจากแหล่ง พันธุกรรมที่มีความหลากหลาย และมีจำนวนมาก เพียงพอ ซึ่งจะเห็นได้จากการทดลองนี้ที่พบเพียง ร้อยละ 2.8 ของฟักทองที่ต้านทานต่อเชื้อ SLCuYV

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์ เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ศูนย์ความเป็น เลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนา บัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ และบริษัท โคลเวอร์ชีด ประเทศไทย จำกัด

เอกสารอ้างอิง

- รุ่งทิพย์ จันเพ็ชร, วิชัย โมลีตรัตน, Scott Adkins และ สุจินต์ ภัทรภูวดล. 2560. การตรวจ เชื้อ *Squash leaf curl Yunnan virus* ในพืชวงศ์แตงด้วยเทคนิค Loop-Mediated Isothermal Amplification. *ว. วิทย์. กษ.* 48(2): 221–230.
- Abudy, A., T. Sufrin-Ringwald, C. Dayan-Glick, D. Guenoune-Gelbart, O. Livneh, M. Zaccari and M. Lapidot. 2010. Watermelon chlorotic stunt and squash leaf curl begomoviruses- new threats to cucurbit crops in the Middle East. *Israel J. of Plant Sci.* 58(1): 33-42.
- Brown, J. K., F.M. Zerbini; J. Navas-Castillo; E. Moriones; R. Ramos-Sobrinho, J.C. Silva, E.Fiallo-Olive, R.W. Briddon; C. Hernandez-Zepeda; A. Idris and V.G Malathi. 2015. Revision of begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch. Virol.* 160(6): 1593-1619.

- Czosnek, H., A. Hariton-Shalev, I. Sobol, R. Gorovits and M. Ghanim. 2017. The incredible journey of begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses*. 9(10): 1-19.
- Fortes, I. M., S. Sanchez-Campos, E. Fiallo-Olive, J. A. Diaz-Pendon, J. Navas-Castillo and E. Moriones. 2016. A novel strain of *Tomato Leaf Curl New Delhi Virus* has spread to the Mediterranean Basin. *Viruses*. 8(11): 1-19
- Havey M.J. 1996. CMV resistance in three sources of cucumber. *Cucurbit Genet coop*. 19:32-33
- Ito, T., T. Ogawa, K. Samretwanich, P. Sharma and M. Ikegami. 2008. Yellow leaf curl disease of pumpkin in Thailand is associated with *Squash leaf curl China virus*. *Plant Pathol. J*. 57: 766.
- Islam, S., A. D. Munshi, B. Mandal, R. Kumar and T. K. Behera. 2010. Genetics of resistance in *Luffa cylindrical* Roem. Against *Tomato leaf curl New Delhi virus*. *Euphytica*. 174(1): 83-89.
- Martinez, C., S. Manzano, Z. Megias, A. Garcia, R. Garrido, H. S. Paris, and M. Jamilena. 2017. Screening of cucurbitagermplasm for ToLCNDV resistance under natural greenhouse conditions. *ActaHortic*. 1151: 57-62
- McCreight, J. D. and A. N. Kishaba. 1991. Reaction of cucurbit species to *Squash leaf curl virus* and sweet potato whitefly. *J Am Soc Hortic Sci*. 116 (1): 137-141.
- Polston, J.E. and H. Capobianco. 2013. Transmitting plant viruses using whiteflies. *J. Vis. Exp*. 81: 1-10.
- Sawangjit, S. 2009. The complete nucleotide sequence of *Squash leaf curl China virus*-[Wax gourd] and its phylogenetic relationship to other geminiviruses. *Sci Asia*. 35: 131-136.
- Xie, X. and X.P. Zhou. 2003. Molecular characterization of *Squash leaf curl Yunnan virus*, a new begomovirus and evidence for recombination. *Arch. Virol*. 148: 2047-2054.