

การตรวจสอบเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV)
 ที่เป็นสาเหตุโรคของพืชตระกูลแตงด้วยเทคนิคอณูชีววิทยา
 Detection of *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) Cause
 Cucurbit Disease by Molecular biology Technique

กาญจนา วาระวิชนี^{1/} ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์^{1/} วันเพ็ญ ศรีชาติ^{2/}
^{1/} กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
^{2/} กลุ่มวิจัยกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

สำรวจ และเก็บตัวอย่างแตงโมที่มี เชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตงในพื้นที่ปลูกภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยรวม 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ และ มหาสารคาม โดยเก็บตัวอย่างแตงโมที่แสดงอาการคล้ายกับที่เกิดจากทอสปอไวรัสเข้าทำลาย ได้แก่ แสดงอาการต่างจุดวงแหวน แผลเนื้อเยื่อตาย ผลมีสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม ใบต่าง มาทดสอบรวม 20 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัส WSMoV ด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA test) พบผลเป็น positive ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติ (>0.207) ตรวจพบจำนวน 3 ตัวอย่าง นำไปตัวอย่างแตงโมไปสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคทางด้านโมเลกุลต่อไป

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-02-08-56

คำนำ

ทอสโปไวรัส (Tospovirus) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจหลายชนิดทั่วโลก และมีพืชอาศัยที่กว้างมากกว่า 600 ชนิด ทั้งไม้ผล ไม้ประดับ และพืชผัก (Peters and Goldbach, 1995) ซึ่งพืชในตระกูลแตงเองก็พบกับปัญหาโรคไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) เช่นกัน สำหรับประเทศไทยมีข้อมูลรายงานว่าตรวจพบเชื้อไวรัส WSMoV ระบาดและทำความเสียหายกับแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์เมลอน และแตงโมลูกผสมเพื่อการส่งออกในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม กาฬสินธุ์ และราชบุรี ลักษณะอาการที่พบแผลไหม้บนผิวผล และแห้งเป็นสะเก็ดแผลสีดำงาทั่วทั้งผล ใบไหม้ดำช้ำน้ำจากขอบใบ ยอดไหม้ผิวผลจะทำให้ผลมีขนาดเล็กลงทำให้เมล็ดพันธุ์ที่ได้ไม่มีคุณภาพเท่าที่ควร ซึ่งสร้างปัญหาให้กับเกษตรกรและบริษัทผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออกเป็นอย่างมาก และทอสโปไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญในด้านการตรวจรับรองเพื่อการส่งออกไปยังต่างประเทศ เช่น le (1970) เคยมีรายงานไว้ว่า *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) สามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ด *cineraria* ได้สูงถึง 96 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น เพื่อป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นกับผลผลิตแตงของเกษตรกรและผู้ผลิตเมล็ดพันธุ์เพื่อการส่งออก และเป็นการจัดแหล่งสะสมโรคออกจากแปลงปลูกรวมทั้งป้องกันการแพร่ระบาดของโรคไปยังแปลงปลูกอื่นๆ เพราะโรคนี้นี้มีเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะช่วยถ่ายทอดโรค จึงต้องเร่งพยายามพัฒนาวิธีทางอนุชีววิทยาเข้ามาช่วยตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อไวรัส WSMoV ในพืชตระกูลแตง ซึ่งในปัจจุบันเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ถือว่าเป็นเทคนิคที่มีความแม่นยำ รวดเร็ว และสามารถประยุกต์กระบวนการตรวจสอบได้หลากหลายวิธี เช่น multiplex PCR, RT-PCR, PCR-ELISA, Real time PCR เป็นต้น เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคอื่น ๆ รวมทั้ง การใช้เทคนิคทางด้านเซอร์มิทียายังไม่สามารถแยกเชื้อไวรัสในกลุ่มทอสโปไวรัสได้อย่างชัดเจน

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค
2. อุปกรณ์ทางการเกษตร ได้แก่ โรงเรือน กระถาง ทราย กรวด ดิน ถังปลูก ปุ๋ย และป้ายชื่อ
3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่ ตู้แช่แข็ง -20°C อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker) เครื่องชั่งละเอียด เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) เครื่อง Thermal cycler และเครื่อง Gel electrophoresis
4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ เช่น ไนโตรเจนเหลว สารประกอบ CTAB buffer เอ็มไซด์ (Roch) Chloroform และ Ethanol

วิธีการ

1. สืบค้นข้อมูลเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV)
สืบค้นข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตง จากเอกสารที่เคยรายงานแล้วทั้งในและต่างประเทศเพื่อใช้ประกอบการวิจัยทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยการจดบันทึกข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อไวรัส WSMoV

2. สํารวจ และเก็บตัวอย่างแตงโมที่มีเชื้อไวรัส WSMoV สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตงในพื้นที่ปลูกสําคัญของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น สกลนคร มหาสารคาม กาฬสินธุ์ ราชบุรี เป็นต้น โดยเก็บตัวอย่างพืชตระกูลแตงโมที่แสดงอาการคล้ายกับที่เกิดจากทอสปอไวรัสเข้าทำลาย ได้แก่ แสดงอาการต่างจุดวงแหวน ผลเนื่อเยื่อตาย ผลมีสะเก็ดสีน้ำตาลเข้ม ใบต่าง เป็นต้น ใส่ตัวอย่างพืชในถุงพลาสติก และทำการบันทึกผลข้อมูลด้วยการจดบันทึกระหว่างการสํารวจ ได้แก่ สถานที่ วันที่ ชื่อพืช ระยะการเจริญเติบโตของพืช อาการและส่วนของพืชที่แสดงอาการ ความรุนแรงของโรค และถ่ายภาพลักษณะอาการโรค

3. ตรวจหาเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ด้วยเทคนิค ELISA

4. สกัดอาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV)

5. สืบค้นไพรเมอร์จากที่เคยมีรายงาน หรือ ออกแบบไพรเมอร์ใหม่ ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) โดยอาศัยข้อมูลจาก (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>)

6. สังเคราะห์อาร์เอ็นเอของเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* (WSMoV) ด้วยเทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

7. ตรวจสอบผล PCR ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis

8. รวบรวม วิเคราะห์ และรายงานผลการทดสอบ

9. สรุปผลและเขียนรายงานผลการวิจัย

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2556-กันยายน 2558

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยาและโรงเรียนทดลอง ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ออกสํารวจหาเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* สาเหตุโรคในพืชตระกูลแตงในพื้นที่ปลูกแตงโมภาคตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ จังหวัด ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และ มหาสารคาม ได้ตัวอย่างแตงโมมาทดสอบรวมแตงโม 20 ตัวอย่าง

นำมาตรวจด้วยเทคนิค ELISA พบผลเป็น positive ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติ (>0.207) ตรวจพบจำนวน 3 ตัวอย่าง

เลือกวิธีสกัดอาร์เอ็นเอที่เหมาะสม เพื่อทดสอบแตงโม 20 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคทางด้านโมเลกุลต่อไป

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ได้ตัวอย่างแตงโมจังหวัด ขอนแก่น กาฬสินธุ์ และ มหาสารคาม มาทดสอบรวม 20 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อไวรัส *Watermelon silver mottle virus* ด้วยเทคนิค ELISA พบผลเป็น positive ที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 มากกว่า 2 เท่าของพืชปกติ (>0.207) ตรวจพบจำนวน 3 ตัวอย่าง นำไปสกัดอาร์เอ็นเอเพื่อตรวจสอบด้วยด้วยเทคนิคทางด้านโมเลกุลต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- GenBank, National Center for Biotechnology. _____ . : Nucleotide.
แหล่งที่มา : (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>, 5 มิถุนายน 2556)
- le, T.S. 1970. *Tomato Spotted wilt Virus*. C.M.I./A.A.B. Plant Virus Description No. 39. 4 p.
- Peter, D. and R. Goldbach. 1995. The biology of tospoviruses, pp. 199-210. In R. P. Singh and K. Kohmoto (eds.) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases Volume III : Viruses&Viroide. Elsevier Science Ltd., Kidlington, Oxford.