

ลักษณะอาการและการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ *Cumnea latent viroid*
และ *Pepper chat fruit viroid* ในเมล่อน
Symptomatology and Seed Transmission of *Cumnea latent viroid*
and *Pepper chat fruit viroid* in Melon

นพรัตน์ เลิศวิลาศานนท์^{1/} ชมาภร สิงห์พันธุ์^{1/} คณิงนิตย์ เจริญวรารากร^{1/*}
Nopparat Leartvirasanon^{1/} Samabhorn Sinhabandhu^{1/} Kanungnit Reanwarakorn^{1/*}

Received 25 Oct. 2023/Revised 2 Dec. 2023/Accepted 4 Dec. 2023

ABSTRACT

Cumnea latent viroid (CLVd) and *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) are important quarantine pests, causing damage to agricultural products, especially tomato, potato, pepper, and some cucurbits. This work was to study the symptoms and seed transmission of CLVd and PCFVd in melon to provide information for observing abnormal symptoms that might occur in melon growing fields. Melon cultivars were mechanically inoculated at the seedling stage, self-pollinated and seeds harvested for seed transmission investigation. It was found that CLVd and PCFVd could cause disease in melons with 25 – 86 and 0 – 100% infection rates, respectively. All four cultivars of CLVd-infected melon displayed symptoms at 8 weeks post inoculation (wpi) with stunting, shorten internodes, small and stacked leaves, small male flowers with abnormal petals, and abundance of non-developed male and female flowers. While two of three tested cultivars of PCFVd-inoculated melon expressed symptoms at 6 wpi with apical shoot stunting, and fully clustering flowers without of fruit setting. For grow out test in a greenhouse, seed transmission rate of CLVd-infected melon was 0.5% in Melon-2 cultivar only. However, PCFVd seed transmission was not found in all the PCFVd-infected melon cultivars in this study. The current findings of viroid melon diseases could be useful for routine disease observation and immediate eradication of CLVd and PCFVd infected plants to reduce disease dissemination and viroid seed contamination especially in CLVd.

Keywords: *Cumnea latent viroid*; *Pepper chat fruit viroid*; seed transmission; cucurbit; melon

^{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

* Corresponding author: agrknr@ku.ac.th

บทคัดย่อ

เชื้อ *Columnea latent viroid* (CLVd) และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) จัดเป็นเชื้อศัตรูพืชที่ร้ายกาจที่สำคัญ ที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับผลผลิตทางการเกษตรโดยเฉพาะในมะเขือเทศ มันฝรั่ง พริก และพืชวงศ์แตงบางชนิด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะอาการและการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ CLVd และ PCFVd ในเมล่อน สำหรับเป็นข้อมูลในการสังเกตอาการผิดปกติที่เกิดจากเชื้อดังกล่าวในแปลง โดยการปลูกเชื้อ CLVd และ PCFVd ลงบนต้นกล้าเมล่อนด้วยวิธีกล และผสมเกสรภายในต้นเดียวกันเพื่อนำเมล็ดมาทดสอบการถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ด จากการศึกษาพบว่า เมล่อนติดเชื้อ CLVd และ PCFVd ที่อัตรา 25 – 86 และ 0 – 100% ตามลำดับ โดยเชื้อ CLVd สามารถก่อโรคให้กับเมล่อนได้ทั้ง 4 พันธุ์ หลังการปลูกเชื้อที่ 8 สัปดาห์ แสดงอาการต้นแคระแกร็น ข้อสั้น ใบมีขนาดเล็กเรียงซ้อนกัน ดอกตัวผู้มีขนาดเล็กกล และกลีบดอกบิดเบี้ยว มีดอกตัวผู้ และดอกตัวเมียจำนวนมาก แต่ไม่สามารถเจริญเติบโตเป็นผลที่สมบูรณ์ ในขณะที่เชื้อ PCFVd สามารถก่อโรคให้กับเมล่อนได้ 2 พันธุ์จากเมล่อน 3 พันธุ์ที่ทดสอบ แสดงอาการของโรคหลังการปลูกเชื้อที่ 6 สัปดาห์ โดยมีอาการยอดหดสั้น ออกดอกเป็นกระจุกจำนวนมากแต่ไม่ติดผล สำหรับการถ่ายทอดเชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิดผ่านทางเมล็ดด้วยการปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือน พบการถ่ายทอดของเชื้อ CLVd ผ่านทางเมล็ดเพียงพันธุ์เดียว คือ Melon-2 ในอัตรา 0.5% อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ยังไม่พบการถ่ายทอดเชื้อ PCFVd ผ่านทางเมล็ดในต้นเมล่อนที่ติดเชื้อ ผลจากการทดลองนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการสำรวจเมล่อนอย่างสม่ำเสมอ และสามารถทำลายต้นเมล่อนที่เป็นโรคจากเชื้อ CLVd

และ PCFVd ได้ทันที เพื่อลดการแพร่ระบาดของโรคและลดการปนเปื้อนของเชื้อที่ติดไปกับเมล็ดพันธุ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ CLVd

คำสำคัญ: *Columnea latent viroid*; *Pepper chat fruit viroid*; การถ่ายทอดทางเมล็ด; พืชวงศ์แตง; เมล่อน

บทนำ

เมล่อน (melon) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Cucumis melo* L. จัดอยู่ในวงศ์ *Cucurbitaceae* เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีราคาต่อผลสูง ให้ผลผลิตสูงต่อพื้นที่ การปลูกใช้น้ำน้อยมีระยะเวลาปลูกและเก็บเกี่ยวสั้น โดยในปี พ.ศ. 2562 ประเทศไทยมีพื้นที่เพาะปลูกประมาณ 2,332 ไร่ ผลผลิตรวม 44,587 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2562) ในปี พ.ศ. 2565 มีการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์เมล่อนควบคุมเพื่อการค้า มีการนำเข้าเมล็ดพันธุ์เมล่อนมูลค่ารวม 15.5 ล้านบาท ในขณะที่การส่งออกเมล็ดพันธุ์เมล่อนมูลค่ารวม 261 ล้านบาท (สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, 2565) เมล่อนเป็นพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อโรคพืชหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายได้ตลอดระยะเวลาการปลูก ดังนั้นการเฝ้าระวังโรคพืชที่เกิดขึ้นระหว่างการผลิตจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมาก เนื่องจากเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต อีกทั้งสภาพภูมิอากาศของโลกมีความแปรปรวนทำให้เกิดความเครียดต่อพืชและพบเชื้อสาเหตุโรคพืชหลายชนิดมีความรุนแรงในการก่อโรคและสร้างความเสียหายให้กับพืชได้มากขึ้น โดยผลกระทบที่เป็นปัจจัยหลักต่อการผลิตเมล่อนหรือในพืชวงศ์แตง ได้แก่ แมลงศัตรูพืชและเชื้อสาเหตุโรคพืช ตัวอย่างเชื้อไวรอยด์ที่มีรายงานการเข้าทำลายในพืชวงศ์แตง ได้แก่ *Cucumber pale fruit viroid* (CPFVd) (Van Dorst and

Peters, 1974) *Hop stunt viroid* (HSVd) (Lemmetty et al., 2011) และ *Columnea latent viroid* (CLVd) (กนกมณี และคณิงนิตย์, 2561) เป็นต้น

ไวรอยด์จัดเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่มีขนาดเล็กที่สุด (Flores et al., 2022) สามารถเข้าทำลายพืชอาศัยได้กว้างทั้งพืชผัก ไม้ผล ไม้ดอก และไม้ประดับ โดยเชื้อ CLVd และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) เป็นเชื้อไวรอยด์ที่เป็นสมาชิกในวงศ์ (family) *Pospiviroidae* สกุล (genus) *Pospiviroid* เชื้อทั้งสองชนิดนี้มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย (ปริเชษฐ์, 2548; Reanwarakorn et al., 2011) และจัดเป็นเชื้อศัตรูพืชกักกันที่สำคัญในการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ระหว่างประเทศ และสามารถถ่ายทอดด้วยวิธีกล และทางเมล็ดพันธุ์ได้ (Constable et al., 2019) ในประเทศไทย มีรายงานการพบเชื้อ CLVd ในมะเขือเทศ (ปริเชษฐ์, 2548) และมะเขือ (*Solanum stramonifolium*) (ปริเชษฐ์ และคณะ, 2556ก.) มีรายงานการก่อโรคและการถ่ายทอดทางเมล็ดในแตงกวา และแตงร้าน (กนกมณี และคณิงนิตย์, 2561) พริก (ขมากร และคณะ, 2562) และมะเขือ (Bhuvitarkorn and Reanwarakorn, 2019) สำหรับเชื้อ PCFVd ในประเทศไทยมีรายงานตรวจพบครั้งแรกในแปลงปลูกมะเขือเทศที่ จ. ลำปาง (Reanwarakorn et al., 2011) ปัจจุบันยังไม่พบการระบาดในพืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ถึงแม้จะมีรายงานในต่างประเทศว่าเชื้อ PCFVd ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด (Zhang and Groth-Helms, 2024)

เนื่องจาก เชื้อไวรอยด์สามารถถ่ายทอดโรคโดยวิธีกลและทางเมล็ดได้ (Verhoeven et al., 2009) จึงทำให้เกิดการแพร่ระบาดได้ง่าย ส่งผลกระทบต่อปริมาณและคุณภาพของผลผลิต มีการตรวจพบเชื้อ PCFVd ในเมล็ดมะเขือเทศที่ส่งจาก

ประเทศไทยไปยังออสเตรเลีย (Chambers et al., 2013) รายงานของ Dall et al. (2019) พบการติดเชื้อไปกับเมล็ดมะเขือเทศ 8% และเมล็ดพริกมากถึง 36% ตามลำดับ ดังนั้น เชื้อ CLVd และ PCFVd จึงถูกกำหนดให้เป็นศัตรูพืชกักกันทั้งการนำเข้าและส่งออกของหลายประเทศ (EPPO, 2023) และเชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิดนี้มีรายงานการเข้าทำลายในพืชวงศ์แตงดังที่ได้กล่าวมาข้างต้น แต่ยังไม่พบรายงานในเมล็ดอื่น ดังนั้น การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลักษณะอาการโรคและการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ CLVd และ PCFVd ในเมล็ดอื่น เพื่อให้หน่วยงานภาครัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเมล็ดอื่น ใช้เป็นแนวทางในการเปรียบเทียบลักษณะอาการผิดปกติที่พบในเมล็ดอื่น และมีวิธีตรวจวินิจฉัยไวรอยด์ในระดับห้องปฏิบัติการที่มีความแม่นยำ และเชื่อถือได้ นำไปสู่การหามาตรการป้องกันการระบาดของโรคในแปลงปลูกและวิธีลดการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อไวรอยด์ที่มีประสิทธิภาพ เพื่อสนับสนุนให้มีการผลิตเมล็ดพันธุ์เมล็ดอื่นที่มีคุณภาพสูงและปลอดเชื้อไวรอยด์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อ CLVd และ PCFVd สำหรับใช้ในงานทดลอง

เชื้อ CLVd ไอโซเลท NK-KUKPS1 (accession no. KY235369) และเชื้อ PCFVd ไอโซเลท TS05 (accession no. MF770200) ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. คณิงนิตย์ เจริญวรการ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นำมาเพิ่มปริมาณบนต้นมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers (*Solanum lycopersicum* cv. Rutgers) โดยนำใบมะเขือเทศที่ติดเชื้อมาบดให้ละเอียดใน 0.1 โมลาร์ (M) phosphate buffer pH 9.0 (เติม 2%

w/v Na₂SO₃ ก่อนใช้) ในอัตราส่วนใบพืช 1 ก. ต่อ phosphate buffer 20 มล. และผสมด้วยผงคาร์โบรันทัม ปริมาณ 0.1% น้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ปลุกเชื้อด้วยวิธีกลโดยการป้ายน้ำคั้นพืชติดเชื้อลงบนใบของต้นกล้ามะเขือเทศ Rutgers ที่อยู่ในระยะมีใบจริง 4 - 5 ใบ จากนั้นนำตัวอย่างใบมะเขือเทศจากต้นที่ได้รับการปลุกเชื้อนาน 4 สัปดาห์ มาสกัดอาร์เอ็นเอด้วยวิธี CTAB (ปรีเชษฐ์, 2548) และตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) เพื่อยืนยันการติดเชื้อและใช้ใบมะเขือเทศ Rutgers ติดเชื้อในขั้นตอนต่อไป

2. การปลุกเชื้อ CLVd และ PCFVd บนพืชทดสอบและการศึกษาลักษณะอาการของโรค

ปลุกเชื้อ CLVd และ PCFVd บนเมล็ดอ่อนที่ใช้ในการทดสอบจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ Melon-1 Melon-2 Melon-3 และ Melon-4 ตามลำดับ (Table 1) โดยใช้เชื้อไวรัสที่ได้จากการเพิ่มปริมาณในข้อ 1 ปลุกเชื้อด้วยวิธีกลให้กับต้นกล้าเมล็ดอ่อนที่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ ที่มีใบจริง 2 - 3 ใบ พันธุ์ละ 3 - 10 ต้น และปลุกเชื้อครั้งที่สองห่างกันนาน 1 สัปดาห์หลังจากปลุกเชื้อครั้งแรก จากนั้นทำการผสมเกสรเมล็ดอ่อนทุกต้นที่ใช้ในการทดสอบซึ่งมีดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่ในระยะดอกบานเต็มที่พร้อมได้รับการผสม หรือพืชทดสอบมีอายุประมาณ 35 - 40 วันหลังออก ทำการช่วยผสมเกสรโดยใช้ดอกตัวผู้ผสมกับดอกตัวเมียในต้นเดียวกัน (hand-pollination) เพื่อเก็บผลผลิตสำหรับนำมาใช้ในการทดสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดในขั้นตอนต่อไปสังเกตอาการผิดปกติที่เกิดขึ้นบนเมล็ดอ่อนที่ทำการปลุกเชื้อโดยเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับการปลุกเชื้อ และตรวจสอบการติดเชื้อ CLVd และ

PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR ในสัปดาห์ที่ 4 - 12 หลังจากการปลุกเชื้อ

3. การทดสอบการถ่ายทอดเชื้อ CLVd และ PCFVd ผ่านทางเมล็ด

สุ่มเมล็ดที่ได้จากต้นเมล็ดอ่อนติดเชื้อไวรัสแยกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ทำการเพาะด้วยวิธี top of paper (TP) (Chen et al., 2001) ในกล่องพลาสติกเป็นเวลา 14 วัน เก็บตัวอย่างโดยแยกเปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) กับต้นกล้า (seedling) โดยรวม 5 ตัวอย่าง ของเปลือกหุ้มเมล็ดหรือต้นกล้า เป็น 1 ตัวอย่าง เพื่อนำทั้ง 2 ส่วนไปแยกสกัดอาร์เอ็นเอ และตรวจสอบหาเชื้อ CLVd หรือ PCFVd ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อศึกษาตำแหน่งและอัตราการพบเชื้อในระยะต้นกล้า และเมล็ด ส่วนที่ 2 ทำการปลุกทดสอบในสภาพโรงเรือน (grow-out test, GOT) (กนกมณี และคณินิตย์, 2561) และตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR ภายหลังจากกล้าในสัปดาห์ที่ 4 - 12 เพื่อศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดไปสู่ต้นกล้ารุ่นต่อไป

4. การตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ CLVd และ PCFVd และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบเชื้อไวรัสจากอาร์เอ็นเอที่สกัดได้จากใบและเมล็ดโดยใช้เทคนิค RT-PCR สังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของเชื้อไวรัสด้วย Thermo Scientific RevertAid Reverse Transcriptase (RT) (Thermo Scientific™) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วย GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation) ตามวิธีการที่แนะนำโดยผู้ผลิต ตรวจสอบเชื้อ CLVd ด้วยคู่ไพรเมอร์ cCL-P2 (5' CTGCAGCCATG CAAAGA 3') และ hCL-P2 (5' GGTCAGGTGTGAACCAC 3') (ศศิประภา, 2551) และตรวจสอบเชื้อ PCFVd ด้วยคู่

ไพรเมอร์ PCF-seq-R (5' ACCCGC ACGGCGCTTCTC 3') และ PCF-seq-F (5' CCGTCTTCTG ACAGGAGT AATCCC 3') (Yanagisawa and Matsushita, 2017) ตามลำดับ

ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel จากนั้นตัดแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 340 - 370 นิวคลีโอไทด์ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด FavorPrep™ GEL/PCR purification kit ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต แล้วส่งตัวอย่างดีเอ็นเอวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch) เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อไวรัส

5. การตรวจสอบเชื้อ CLVd และ PCFVd บนพืชทดสอบ (bioassay)

ตรวจสอบยืนยันความสามารถในการก่อโรค

ของเชื้อบนมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ที่เป็นพันธุ์อ่อนแอต่อเชื้อไวรัสทั้งสองชนิด (Legrand, 2015) โดยใช้อาร์เอ็นเอของเมล่อนที่ได้รับการปลูกเชื้อทุกสายพันธุ์ ในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับ phosphate buffer (pH 9.0) 40 ไมโครลิตร นำไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบดินในมะเขือเทศที่มีใบจริง 1 - 2 ใบ และตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสจากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากใบที่ได้รับการปลูกเชื้อในขั้นตอนนี้ด้วยเทคนิค RT-PCR ในสัปดาห์ที่ 4 8 และ 12 หลังการปลูกเชื้อ ตามวิธีการที่กล่าวไว้แล้วในข้างต้น

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ลักษณะอาการของเมล่อนที่ได้รับการปลูกเชื้อ CLVd และ PCFVd

อาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ CLVd บนเมล่อนแสดงออกชัดเจนที่ 8 สัปดาห์หลังได้รับการปลูกเชื้อ ได้แก่ ต้นแคระแกร็น ข้อสั้น ใบพับงอลง ยอดที่เกิดใหม่มีข้อสั้น ใบมีขนาดเล็ก ทรูปลูก รียงซ้อนกัน ดอกตัวผู้มีขนาดเล็ก กลีบดอกบิดเบี้ยว มีดอกตัวผู้



Figure 1 Symptoms of CLVd-infected melon (*C. melo* L.) at 8 weeks post inoculation; plant showing stunted growth, short internodes, bent leaves and new shoots with short internodes, small and stacked leaves (D-E), clustering of non-developed female flowers (F), small male flowers with abnormal petals (G); compared to healthy plant and flowers (A-C)

และดอกตัวเมียจำนวนมาก แต่ไม่เจริญเป็นผลที่สมบูรณ์ (Figure 1) และไม่ติดเมล็ดในบางพันธุ์ เนื่องจากอาการของโรครุนแรงมาก เมล่อนหยุดการเจริญเติบโตและตายเมื่ออายุครบ 12 สัปดาห์หลังได้รับการปลูกเชื้อ เมื่อตรวจยืนยันผลการติดเชื้อด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า เชื้อ CLVd สามารถเข้าทำลายเมล่อนทั้ง 4 พันธุ์ และมีอัตราการติดเชื้อ 25 - 86% (Table 1 และ 2)

2. การวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันชนิดของไวรัส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างดีเอ็นเอของเชื้อ CLVd จากต้นเมล่อน 4 พันธุ์ และ

ต้นกล้าในการทดสอบ GOT พันธุ์ Melon-2 ที่พบการติดเชื้อ CLVd พบว่า มีความเหมือนกับเชื้อ CLVd ไอโซเลต NK-KUKPS1, partial genome (accession No. KY235369) ซึ่งเป็นไอโซเลตที่ใช้ในการปลูกเชื้อให้กับเมล่อนในงานวิจัยนี้ ที่ 99% ซึ่งค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไวรอยด์มากกว่า 90% จะถือว่าเป็นไวรอยด์ชนิดเดียวกัน (Flores et al., 1998) และดีเอ็นเอของเชื้อ PCFVd ที่ได้จากต้นเมล่อนพันธุ์ Melon-1 และ Melon-4 ที่ติดเชื้อ PCFVd มีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับไอโซเลต TS05, partial genome (accession No. MF770200) ที่ 98% จึงจัดเป็นไวรอยด์ชนิดเดียวกัน ตามลำดับ (Table 2)

Table 1 Infection percentage of CLVd and PCFVd inoculated melon plants as detected by RT-PCR technique

Cultivars	Fruit characteristics (fresh color/shape/skin)	Viroid infection (%) ^{1/}	
		CLVd	PCFVd
Melon-1	green/round/netted green	67 (4/6)	100 (3/3)
Melon-2	orange/round/netted green	60 (6/10)	NT
Melon-3	orange/round/netted green	86 (6/7)	0 (0/3)
Melon-4	green/round/netted green	25 (2/8)	100 (3/3)

^{1/} = percentage of viroid infection (no. of infected plant/total no. of test plant x 100),
NT = no test

Table 2 Results of RT-PCR, bioassay and sequence similarity of CLVd and PCFVd in the inoculated melon plants

Cultivars	CLVd			PCFVd		
	RT-PCR	Bioassay	Sequence	RT-PCR	Bioassay	Sequence
Melon-1	+	+	+	+	+	+
Melon-2	+	+	+	NT	NT	NT
Melon-3	+	+	+	-	-	-
Melon-4	+	+	+	+	+	+

+ = positive result, - = no test because of no infection, NT = no test

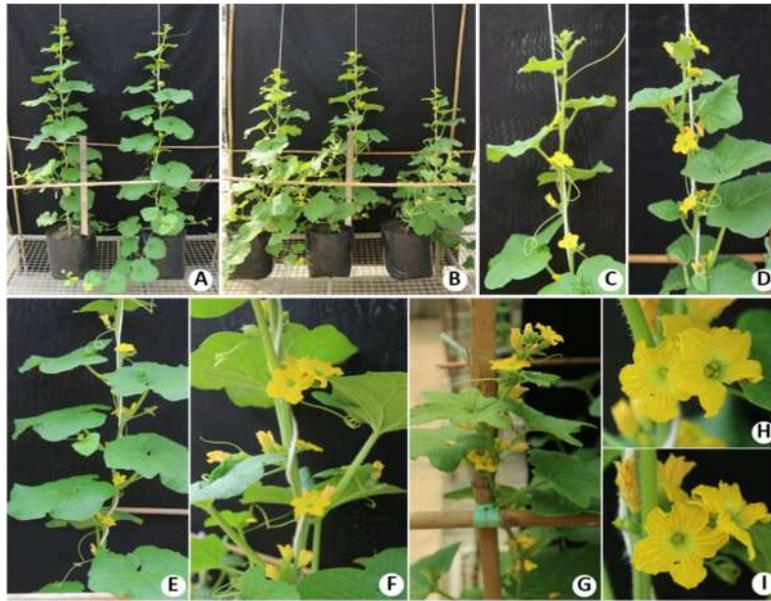


Figure 2 Symptoms of PCFVd-infected melon at 6 weeks post inoculation; plant displaying short internode and numerous lateral branches (B), abnormal apical shoots with short internode (D), many flowerings but not setting fruit (F) and abnormal clustering flowers (G-I) compared to stem, shoots and flowering of healthy plant (A, C and E)

สำหรับเชื้อ PCFVd พบว่า สามารถเข้าทำลาย เมล่อน 2 พันธุ์ ได้แก่ Melon-1 และ Melon-4 จากการทดสอบ 3 พันธุ์ (Melon-1 Melon-3 และ Melon-4) อัตราการติดเชื้ออยู่ที่ 0 – 100% (Table 1 และ 2) โดยอาการของโรคบนเมล่อนที่เกิดจากเชื้อ PCFVd เริ่มแสดงอาการเด่นชัดหลังจากปลูกเชื้อ นาน 6 สัปดาห์ โดยมีอาการยอดหดสั้น ดอกเป็น กระจุกตามบริเวณกิ่งแขนงและลำต้น เมื่อเทียบกับ ต้นปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ (Figure 2)

จากการสังเกตอาการในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า เมล่อนที่ติดเชื้อ PCFVd แสดงอาการให้เห็น ได้เร็วกว่าเชื้อ CLVd ทั้งนี้การติดเชื้อไวรอยด์ต่าง ชนิดในพืชอาศัยชนิดเดียวกัน อาจแสดงอาการ เหมือนหรือแตกต่างกันได้ (Navarro et al., 2021) อาการและความรุนแรงของโรคขึ้นกับชนิดและ ปริมาณของเชื้อที่พืชได้รับที่ทำให้มีผลต่อการเพิ่ม ปริมาณในพืชอาศัย (Škorić, 2017) ซึ่งลักษณะ อาการผิดปกติที่เกิดขึ้นในเมล่อนจากการเข้าทำลาย

ของไวรอยด์ทั้ง 2 ชนิด มีลักษณะอาการที่ดอก เช่นเดียวกับรายงานของ Lemmetty et al. (2011) ที่พบว่า แดงกวาดัดเชื้อ HSVd มีอาการดอกมีขนาดเล็ก กลีบดอกผิดปกติและมีรอยย่น และผลผลิตลดลง ประมาณ 2 – 3% และจากรายงานของ Yaguchi and Takahashi (1984) ได้ยืนยันว่า ความสามารถในการก่อโรคของ HSVd ขึ้นอยู่กับชนิดและพันธุ์พืช และความรุนแรงของโรคขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ ไวรอยด์ ทั้งนี้เชื้อ HSVd จัดอยู่ในวงศ์ *Pospiviroidae* เช่นเดียวกับเชื้อ CLVd และ PCFVd แต่อยู่ต่าง สกุลกัน แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรอยด์ทั้งสามชนิด ก่อให้เกิดอาการผิดปกติที่ดอกเช่นเดียวกัน

3. การทดสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อ CLVd และ PCFVd ในเมล่อน

การทดสอบไม่พบตัวอย่างเมล่อนติดเชื้อ CLVd และ PCFVd จากทั้งเปลือกหุ้มเมล็ด และ ต้นกล้าในทุกพันธุ์ (Table 3) เมื่อทดสอบด้วยการ

เพาะเมล็ดด้วยวิธี TP ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ กนกมณี และคณินิตย์ (2561) ที่ตรวจพบเชื้อ CLVd ในต้นกล้าของแตงกวาจากการเพาะเมล็ดด้วยวิธี เดียวกันนี้ ทั้งนี้เนื่องจากชนิดของพืชทดสอบ ที่แตกต่างกัน ดังเช่น การศึกษาของ Matsushita and Tsuda (2016) ทดสอบการถ่ายทอดของเชื้อ CLVd ในพืชหลายชนิด แต่พบการถ่ายทอดเฉพาะใน มะเขือเทศเพียงบางสายพันธุ์จากมะเขือเทศหลาย สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ

การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรอยด์ด้วย วิธีการปลูกทดสอบในสภาพโรงเรือน พบการติดเชื้อ CLVd ในต้นกล้าเมลอนพันธุ์ Melon-2 ที่ได้เมล็ด จากต้นแม่ติดเชื้อ จำนวน 1 ต้น จากทั้งหมด 200 ต้น คิดเป็น 0.5% อย่างไรก็ตาม ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อ ผ่านทางเมล็ดของเชื้อ PCFVd ในเมลอนพันธุ์ Melon-1 และ Melon-4 (Table 3) จากผลการ ทดลองข้างต้นอาจอธิบายได้ว่าการถ่ายทอดเชื้อทาง เมล็ดของเชื้อ CLVd ในเมลอนอาจแบ่งได้สองแบบ

คือ 1) การถ่ายทอดของเชื้อไวรอยด์จากการทดลอง นี้เป็นการติดเชื้อ CLVd ของต้นกล้าที่มาจากละออง เกสรที่มีการติดเชื้อ (ตรวจยืนยันการติดเชื้อของ ละอองเกสรแต่ไม่ได้แสดงผล) เช่นเดียวกับรายงาน การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ CLVd ผ่านทางเมล็ด มะเขือเนื่องจากละอองเกสรมีการติดเชื้อไวรอยด์ ของ Bhuvitarkorn and Reanwarakorn (2019) และ 2) การถ่ายทอดเชื้อ CLVd ผ่านเนื้อเยื่อรังไข่ ของต้นแม่ที่ติดเชื้อแบบ cell-to-cell ไปสู่เอ็มบริโอ หลังเกิดการปฏิสนธิ โดยตรวจพบไวรอยด์ที่รังไข่ ของดอกตัวเมียที่ยังไม่ได้รับการผสมเกสร ที่ได้จาก ต้นเมลอนที่ติดเชื้อ CLVd ในงานทดสอบนี้ด้วย (ไม่ได้แสดงผล) อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ของ การถ่ายทอดเชื้อ CLVd ผ่านทางเมล็ดอาจเป็นใน แบบที่หนึ่งได้ เนื่องจากตรวจไม่พบเชื้อที่ส่วนของ เปลือกหุ้มเมล็ดซึ่งจะถูกพัฒนาขึ้นก่อนเอ็มบริโอ (Matsushita et al., 2018)

Table 3 Evaluation of seed transmission of CLVd and PCFVd infected melon plants through top of paper and grow-out tests followed by viroid detection by using RT-PCR technique

Variety	No. of test seed	CLVd			No. of test seed	PCFVd		
		Top of paper test ^{1/}		Grow-out test		Top of paper test ^{1/}		Grow-out test
		Seed coat	Seedling			Seed coat	Seedling	
Melon-1	NS	NT	NT	NT	1480	0% (0/148 ^{2/})	0% (0/148)	0% (0/740 ^{3/})
Melon-2	391	0% (0/20 ^{2/})	0% (0/20)	0.5% (1/200 ^{3/})	NS	NT	NT	NT
Melon-3	NS	NT	NT	NT	NS	NT	NT	NT
Melon-4	NS	NT	NT	NT	1700	0% (0/81)	0% (0/81)	0% (0/820)

^{1/} 5 bulked /sample,

^{2/} number of test samples infected with CLVd or PCFVd/total tested samples

^{3/} number of test plants infected with CLVd or PCFVd/total tested plants

NT = no test

NS = no seed

4. การตรวจสอบเชื้อ CLVd และ PCFVd บนพืชทดสอบ (Bioassay)

ผลการปลูกเชื้อ CLVd และ PCFVd บนต้นมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers พบว่า อาร์เอ็นเอจากเมล็ดที่ติดเชื้อ สามารถก่อโรคบนต้นมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ได้ (Table 2) และแสดงอาการหลังการปลูกเชื้อ 4 สัปดาห์ และมีอาการโรคที่เด่นชัดที่

8 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ คือ ก้านใบและยอดหดสั้น ใบหย่นและบิดม้วน และอาการเนื้อเยื่อตายที่บริเวณเส้นใบ กิ่ง และลำต้น (Figure 3) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ปรีเชษฐ์ และคณะ (2556ข.) ซึ่งปัจจัยทางสภาพแวดล้อม สายพันธุ์ไวรอยด์ และชนิดของพืชอาศัย ส่งผลต่อการทดสอบทางชีวภาพ (Nie and Singh, 2017)

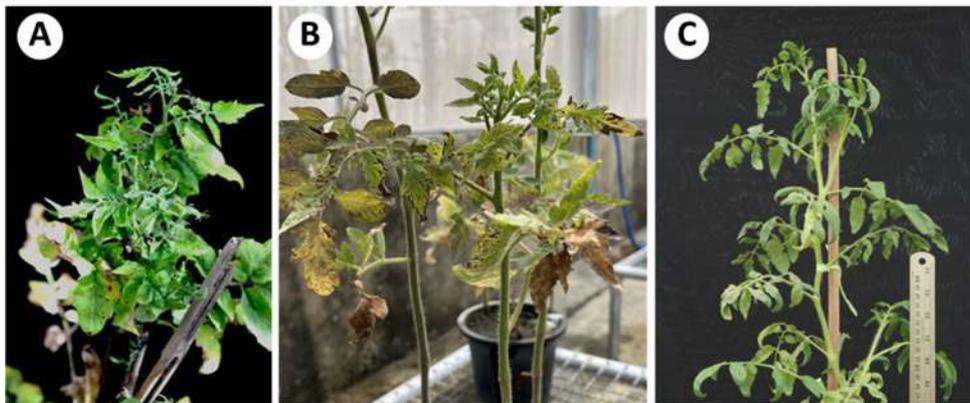


Figure 3 Symptoms of viroid on Rutgers tomato at 8 weeks post inoculation of *Columnea latent viroid* (A) and *Pepper chat fruit viroid* (B) compared to healthy tomato plant (C)

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาลักษณะอาการและการถ่ายทอดทางเมล็ดของเชื้อไวรอยด์ CLVd และ PCFVd ในเมล็ด พบว่าเชื้อไวรอยด์ CLVd สามารถก่อโรคในเมล็ดทั้ง 4 พันธุ์ที่ทดสอบ ได้ 25 – 86% และแสดงอาการของโรคหลังการปลูกเชื้อ 8 สัปดาห์ โดยมีอาการต้นแคระแกร็น ข้อสั้น ใบพับงอลง ยอดที่เกิดใหม่มีข้อสั้น ใบมีขนาดเล็ก ลดรูป เรียงซ้อนกัน ดอกตัวผู้มีขนาดเล็ก กลีบดอกบิดเบี้ยว มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียจำนวนมากแต่ไม่เจริญเป็นผลที่สมบูรณ์ และพบว่า เชื้อไวรอยด์ CLVd สามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดเมล่อนในพันธุ์ Melon-2 ได้ในอัตรา 0.5% ส่วนเชื้อ PCFVd พบว่า สามารถก่อโรค 100% ในเมล็ด 2 พันธุ์ และแสดงอาการของโรคหลังการปลูกเชื้อ 6 สัปดาห์ โดยมีอาการยอดหดสั้น ออกดอกจำนวนมากมีลักษณะเป็น

กระจุกตามบริเวณกิ่งแขนงและลำต้น จึงสรุปได้ว่า เชื้อ CLVd และ PCFVd สามารถก่อโรคบนเมล่อน และเชื้อ CLVd สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ ผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการสำรวจอาการโรคที่เกิดจากเชื้อไวรอยด์ทั้งสองชนิด เพื่อลดการแพร่ระบาดของโรคและลดการปนเปื้อนของเชื้อที่จะติดไปกับเมล็ดพันธุ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อ CLVd

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม ที่ให้ความอนุเคราะห์ สนับสนุนสถานที่และเครื่องมือเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- กนกมณี ต้นสุวรรณ และคณินนิตย์ เจริญวรารกร. 2561 การถ่ายทอดเชื้อ *Cummea latent viroid* ผ่านทางเมล็ดของแตงกวา. วารสารวิชาการเกษตร. 36(2): 130-140.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2562. เมล่อนญี่ปุ่น สารสนเทศส่งเสริมการเกษตร. แหล่งที่มา: <https://www.http://www.agriinfo.doae.go.th/year63/plant/rtor/veget/.pdf/> สืบค้น: 10 กรกฎาคม 2566.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 85 หน้า.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คณินนิตย์ เจริญวรารกร และวิภา เกิดพิพัฒน์. 2556ก. เชื้อ *Cummea latent viroid* (CLVd) สายพันธุ์ใหม่ที่ก่อให้เกิดอาการรุนแรงในมะอึ๊ก (*Solanum stramonifolium* Jacq.). วารสารวิชาการเกษตร. 31(1): 53-68.
- ปรีเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์ คณินนิตย์ เจริญวรารกร และวิภา เกิดพิพัฒน์. 2556ข. การตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Cummea latent viroid* (CLVd) และ *Pepper chat fruit viroid* (PCFVd) ในพืชตระกูล *Solanaceae*. วารสารวิชาการเกษตร. 31(2): 108-122.
- ศศิประภา มาราช. 2551. โคลนก่อโรคของเชื้อ *Cummea latent viroid* และผลกระทบต่อมะเขือเทศพันธุ์การค้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 86 หน้า.
- ชมภาร ภูวิธกรณ์ จิราพร ปอสูงเนิน สุภาพร กลิ่นคง และคณินนิตย์ เจริญวรารกร. 2562. การเข้าทำลายและการถ่ายทอดทางเมล็ดของ *Cummea latent viroid* ในพริก. วารสารเกษตร. 35(1): 101-111.
- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. 2565. ข้อมูลการนำเข้าและส่งออกเมล็ดพันธุ์ควบคุมเพื่อการค้าปี 2565. แหล่งที่มา: https://www.doa.go.th/ard/?page_id=1443. สืบค้น: 23 มีนาคม 2566.
- Bhuvitarkorn, S and K. Reanwarakorn. 2019. Pollen and seed transmission of *Cummea latent viroid* in eggplants. European Journal of Plant Pathology. 154(4): 1067-1075.
- Chambers, G.A., A.M. Seyb, J. Mackie, F.E. Constable, B.C. Rodoni, D. Letham, K. Davis and M.J. Gibbs. 2013. First report of *Pepper chat fruit viroid* in traded tomato seed, an interception by Australian Biosecurity. Plant Disease. 97(10): 1386.
- Chen, F., P. Dahal and K. J. Bradford. 2001. Two tomato expansion genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. Plant Physiology. 127(3): 928-936.
- Constable, F., G. Chambers, L. Penrose, A. Daly, J. Mackie, K. Davis, B. Rodoni and M. Gibbs. 2019. Viroid-infected tomato and capsicum seed shipments to Australia. Viruses. 11(2): 98.
- Dall, D., L. Penrose, A. Daly, F. Constable and M. Gibbs. 2019. Prevalences of *pospiviroid* contamination in large seed lots of tomato and capsicum, and related seed testing considerations. Viruses. 11: 1034.
- EPPO. 2023. EPPO Global Database. Available at: <https://gd.eppo.int>. Accessed: July 10, 2023.
- Flores, R., B. Navarro, P. Serra and F. Di Serio. 2022. A scenario for the emergence of protoviroids in the RNA world and for their further evolution into viroids and viroid-like RNAs by modular recombinations and mutations. Virus Evolution. 8(1): veab107.
- Flores, R., J.W. Randles, M. Bar-Joseph and T.O. Diener. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. Archives of Virology. 143: 623-629.

- Legrand, P. 2015. Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: A review. EPPO Bulletin. 45: 240-251.
- Lemmetty, A., A. W. Werkman and M. Soukainen. 2011. First report of *Hop stunt viroid* in greenhouse cucumber in Finland. Plant Disease. 95(5): 615.
- Matsushita, Y., H. Yanagisawa and T. Sano. 2018. Vertical and horizontal transmission of pospiviroids. Viruses. 10(12): 706.
- 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 horticultural plants. European Journal of Plant Pathology. 145: 1007-1011.
- Navarro, B., R. Flores and F. Di Serio. 2021. Advances in viroid-host interactions. Annual Review of Virology. 8(1): 305-325.
- Nie, X and R.P. Singh. 2017. Viroid detection and identification by bioassay. pp. 347-356. In: Viroids and Satellites. Academic Press.
- Reanwarakorn, K., S. Klinkong and J. Porsoongnum. 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. New Disease Reports. 24(6): 2044-0588.
- Škorić, D. 2017. Viroid biology. pp. 53-61. In: Viroids and Satellites. Academic Press.
- Van Dorst, H.J.M and D. Peters. 1974. Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. Netherlands Journal of Plant Pathology. 80: 85-96.
- Verhoeven, J. T., C.C. Jansen, J. W. Roenhorst, R. Flores and M. de la Peña. 2009. *Pepper chat fruit viroid*: biological and molecular properties of a proposed new species of the genus *Pospiviroid*. Virus Research. 144(1-2): 209-214.
- Yaguchi, S and T. Takahashi. 1984. Response of cucumber cultivars and other cucurbitaceous species to Infection by *Hop Stunt Viroid*. Journal of Phytopathology. 109(1): 21-31.
- Yanagisawa, H. and Y. Matsushita. 2017. Host ranges and seed transmission of *Tomato planta macho viroid* and *Pepper chat fruit viroid*. European Journal of Plant Pathology. 149: 211-217.
- Zhang, S and D. Groth-Helms. 2024. Viroid diseases of tomato. pp. 379-385. In: Viral Diseases of Field and Horticultural Crops. Academic Press.