

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางชีวภาพและการควบคุมเชื้อไวรัสต่างแหล่งของซุกคินี (ZYMV) ในพืชตระกูลแตง
ผู้เขียน	นางสาวเอมลิน พิพัฒน์ภักดี
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.ประสาทพร สมิตะมาน

### บทคัดย่อ

พืชตระกูลแตง (Cucurbitaceae) เป็นพืชผักสวนครัวที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากชนิดหนึ่ง ซึ่งพบว่าเกษตรกรมักประสบปัญหาในการผลิตเนื่องจากการระบาดของโรคและแมลงทำให้ผลผลิตได้รับความเสียหายทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อ *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) ที่พบว่ามีการระบาดในทุกแหล่งที่ปลูกพืชตระกูลแตงเป็นการค้า รวมทั้งก่อให้เกิดความเสียหายได้มากเมื่อเทียบกับโรคชนิดอื่น เนื่องจากพืชตระกูลแตงจะแสดงอาการต่างแหล่ง และผลมีลักษณะบิดเบี้ยวจนไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค งานวิจัยนี้ จึงต้องการที่จะศึกษาลักษณะอาการของแตงกวาที่เกิดจากเชื้อ ZYMV ในแหล่งปลูกของภาคเหนือ รวมทั้งความแตกต่างของสายพันธุ์ไวรัสที่พบในแต่ละพื้นที่ ตลอดจนหาแนวทางในการป้องกันเพื่อลดความเสียหายที่เหมาะสม ผลการศึกษาจากการสุ่มตรวจพืชตระกูลแตงในเขตภาคเหนือทั้งหมด 182 ตัวอย่างจากจังหวัด เชียงใหม่ ลำปาง ลำพูน และพะเยา ตรวจตัวอย่างพืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย โดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay สามารถแยกเชื้อ ZYMV ที่พบว่ามีเพียง 13 ตัวอย่างที่มีเชื้อ ZYMV เข้าทำลายเพียงอย่างเดียว ส่วนที่เหลือจะมีไวรัสหลายชนิดร่วมกันทำลาย หลังจากนั้นนำทั้ง 13 ตัวอย่าง มาปลูกเชื่อมบนพืชอาศัย 24 ชนิด เพื่อสังเกตลักษณะอาการ พบว่าพืชตระกูลแตงที่ถูกเชื้อ ZYMV เข้าทำลาย มีอาการแตกต่างกันหลายรูปแบบ โดยอาจมีอาการใบด่าง ใบเหลือง หักงอ เนื้อใบหดหายจนกลายเป็นเสี้ยนแคระแกร็น ส่วนในพืชวงศ์ *Chenopodiaceae* และ *Rubiaceae* พบอาการแผลเฉพาะแห่ง สำหรับการทดสอบลักษณะคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อ ZYMV พบว่าอุณหภูมิระดับที่สามารถทำให้เชื้อไวรัสหมดประสิทธิภาพในการก่อโรคของเชื้อ

ZYMV คือ 70 - 80°C ความเข้มข้นต่ำสุดของเชื้อที่สามารถก่อให้เกิดโรคกับพืชคือ 10<sup>2</sup> - 10<sup>3</sup> และ ความยาวนานในการดำรงชีวิตอยู่ได้ในน้ำคั้นนานที่สุด 1 - 3 วัน สำหรับการศึกษาวิธีการป้องกันการทำลายของเชื้อได้ทดลองโดยใช้เชื้อ *Serratia plymuthica* เพื่อควบคุมเชื้อ ZYMV ในชุกคินีและ แดงกวาง พบว่าเชื้อ *S. plymuthica* สามารถยืดเวลาการแสดงอาการจากเชื้อ ZYMV ให้ช้าลงได้ ประมาณ 10 วัน ส่วนใน *Chenopodium amaranticolor* ที่ปลูกเชื้อ *S. plymuthica* ก่อนการปลูกเชื้อ ZYMV 2 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดการเข้าทำลายของเชื้อ ZYMV ให้ต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด โดยมี จำนวนแผลเพียง 6.75 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับต้นปกติ จากการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค (PR-protein) โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE พบว่าต้นชุกคินีที่มีการปลูกเชื้อ *S. plymuthica* ก่อนที่จะปลูกเชื้อไวรัส 5 วัน มีการสร้างแถบโปรตีนใหม่ขนาดโมเลกุล 30 kDa ซึ่งตรงกับขนาดของ PR-protein ที่ถูกชักนำให้เกิดขึ้นเพื่อเพิ่มความต้านทานในพืช นอกจากนี้พืชที่ถูกไวรัสเข้าทำลายพบว่าความเข้มของแถบโปรตีนบางลงเมื่อเปรียบเทียบกับต้นพืชปกติ สำหรับการสร้างสารเร่งการเจริญเติบโตของต้นชุกคินี ซึ่งวิเคราะห์จากฮอร์โมน indole-3-acetic acid (IAA) โดยใช้ Salkowski's reagent พบว่าเมื่อนำน้ำคั้นจากต้นชุกคินีที่ได้รับเชื้อ *S. plymuthica* ก่อนปลูกเชื้อ ZYMV 5 วันและต้นชุกคินีที่ปลูกเชื้อ *S. plymuthica* เพียงอย่างเดียวจำนวน 30 ไมโครลิตร มาหยดบน Hi-bond membrane แล้วตรวจด้วยน้ำยาตรวจสอบ พบสีชมพูตรงตำแหน่งที่หยดน้ำคั้น ซึ่งเมื่อเทียบกับชุด IAA มาตรฐาน พบว่ามีความเข้มข้นระดับ 5 ppm สำหรับการตรวจหาฮอร์โมนจากเชื้อ *S. plymuthica* ที่เลี้ยงในอาหาร PDB 48 ชั่วโมง เมื่อนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเดียวกัน มีปริมาณ IAA 5 ppm เท่ากัน นอกจากนี้เชื้อ *S. plymuthica* ที่เลี้ยงบนอาหาร NA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบการเปลี่ยนสีของโคโลนี *S. plymuthica* จากสีชมพูอ่อนเปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้มเนื่องจากมี IAA ที่สร้างขึ้นมาก ผลจากการทดลองสามารถสรุปได้ว่าเชื้อ *S. plymuthica* สามารถยืดเวลาการเกิดโรค และทำให้อาการของโรคลดลง จะเป็นผลเนื่องจากเชื้อสามารถสร้าง IAA ซึ่งพืชสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้พบว่ารากมีจำนวนมากขึ้นอีกด้วย ทำให้พืชสามารถดูดธาตุอาหารต่าง ๆ ได้ ดีอันส่งผลให้การสังเคราะห์แสงเป็นไปได้มากขึ้น ซึ่งพบได้จากสีของใบพืชยังคงมีสีเขียวแทนที่จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองดังที่พบในชุดเปรียบเทียบ รวมทั้งมีความสูงของต้นที่ใกล้เคียงกับพืชที่ไม่ได้ปลูกเชื้อไวรัส

<b>Thesis Title</b>	Biodiversity and Controlling of Zucchini Yellow Mosaic Viruses (ZYMV) in Cucumber and Zucchini
<b>Author</b>	Miss Aimalin Pipattanapuckdee
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)
<b>Thesis Advisor</b>	Assoc. Prof. Dr. Prasartporn Smitamana

### Abstract

Cucurbitaceae is one of the most important economic groups of Thailand, anyhow they could be infested with many diseases and insects that caused the serious loss in both quality and quantity. *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) is the one of the major viruses affected cucurbit production in every production areas. The infected cucurbit will show yellow mosaic on leaves and malformation of fruits which will be unmarketable. This research, therefore, aim to study the cucurbit infected by ZYMV symptoms in the north of Thailand, biodiversity of virus as well as possible preventive measure. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay t is applied for the virus diagnosis and only 13 out of 182 samples collected from Chiang Mai, Lamphoon, Lampang and Payoa provinces were singly infected with ZYMV, the rest were either mixed with other viruses or caused by another viruses. For the host range, 13 isolates of ZYMV were inoculated on 24 plant species and various symptoms; severe mosaic, malformation, shoestring, size reduction, stunting and chlorotic lesion were found, furthermore only *Chenopodiaceae* and Rubiaceae were identified as the local lesion hosts. Physical properties of isolated ZYMV were as following: TIP 70 - 80°C, DEP 10-2 - 10-3 and LIV 1-3 days at room temperature. Preventive measure of ZYMV infection in zucchini and cucumber was conducted by using *Serratia plymuthica* reveals that could delay symptom development for 10 days. Besides, in case of *Chenopodium amaranticolor*, prior challenge inoculation with *S. plymuthica* for 2 hours could minimize chlorotic local lesion

up to only 6.75 percent comparing to the control plants. From the pathogen-related protein (PR-protein) study using SDS-PAGE, the presence of new protein band molecular weight about 30 kDa which was the expected size for the PR-protein is found in zucchini challenge inoculated with *S. plymuthica* for 5 days before ZYMV inoculation. Moreover, infected plant protein bands found in the gel show less intensity than the bands from the healthy plants. Plant Sap from the *S. plymuthica* inoculated and the 5 days challenge inoculated zucchini were collected and 30 microlite were spotted on the Hi-bond membrane then soaked in the Salkowski's reagent, the pink color spots were developed which could quantify the concentration of 5 ppm compared to the standard IAA. The same results and concentration were obtained when using either 48 hrs of culture filtrate of *S. plymuthica* in PDB or bacterial colonies on NA from which the colony colors changed from pink to dark purple. The results lead to the hypothesis that *S. plymuthica* could produce IAA, an auxin group of plant growth promoter that could stimulate both shoot and root growth which was recognized the better and longer root system in the *S. plymuthica* inoculated plants. This also leads to the high efficacy in mineral absorption and photosynthesis. Therefore, the leaves of the treated group were still remain green instead of turning yellow like the other infected ones as well as having almost the same height as the non-inoculated plants.