แผนงานวิจัย : วิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โคดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย(โครงการวิจัยเดี่ยว)

โครงการวิจัย : วิจัยอนุกรมวิธาน ชีววิทยา และการจำแนกชนิดโดยดีเอ็นเอบาร์โคดของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ เพื่อการวิจัยด้านอารักขาพืชในประเทศไทย

กิจกรรม : สำรวจชนิดและอนุกรมวิธานของศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ

กิจกรรมย่อย : สำรวจชนิดและอนุกรมวิธานของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืชและจุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช

ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การสำรวจ จำแนกและศึกษาอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Survey, Identification and characterization of chlorotic ringspot on Phalaenopsis orchid

คณะผู้ดำเนินงาน
หัวหน้าการทดลอง : สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1]

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis ที่พบอาการด่างเหลืองใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) ขยายใหญ่บนใบกล้วยไม้และมีอาการใบจุด (local lesion) ตรงกลางแผลเมื่อตรวจสอบด้วย primer CaCV.NPF 5'TTA CAC TTC TAT AGA AGT ACT A 3' และ CaCV.NPR 5'ATG TCT AAC GTT AGG CAA CTT A 3' ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR) พบแถบดีเอ็นเอและได้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่าเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) percent identity เท่ากับ 92.62 เปอร์เซ็นต์ และทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อและลักษณะอาการบนพืชทดสอบ 4 ชนิด คือ *Nicotiana benthamiana*, *Lycopersicon esculentum*, *Vigna sinensis* และ *Chenopodium quinoa* ด้วยวิธี mechanical

[1] สังกัด กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ในโรงเรือนควบคุมอุณหภูมิ 25-28 °C พบอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อเป็นจุดเหลืองตายบน *N. Benthamiana* และ *C. quinoa* ส่วน *L. esculentum* และ *V. sinensis* ไม่แสดงอาการบนใบหลังปลูกเชื้อ จากการศึกษาทำให้พบว่าลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ที่พบในประเทศไทยมีความเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ที่มีรายงานในไต้หวัน

คำหลัก: กล้วยไม้, ฟาเลนอพซิส, จุดแผลสีเหลือง

Abstract

The diagnosis of the chlorotic ringspot's characteristics on Phalaenopsis orchid leaves which the yellow mosaic, the ring spot chlorosis expanding on leaves, and the local lesions are found. Furthermore, when testing with primer CaCV.NPF 5'TTA CAC TTC TAT AGA AGT ACT A 3' and CaCV.NPR 5'ATG TCT AAC GTT AGG CAA CTT A 3' with the technique of reverse transcription PCR (RT-PCR), the DNA bar is found as well as when analysing the nucleotides' order, it is found that there are 92.62% of identity similarity with the *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph). Additionally, the virus transfer and the characteristic of plants' symptoms are studied in 4 types of plant named as *Nicotiana Benthamiana*, *Lycopersicon Esculentum*, *Vigna Sinensis*, and *Chenopodium Quinoa* with the mechanical method in the greenhouse which the temperature is controlled around 25 to 28 °C; as a result, the chlorotic yellow lesion spot is found on the leaves which were inoculated; later, it become to yellow necrotic spot and dead in *N. Benthamiana* and *C. Quinoa* differentiating form *L. Esculentum* and *V. Sinensis* which the symptoms are not shown after inoculation. According to the study, it could be found that the chlorotic ringspot's symptom characteristics on the Phalaenopsis orchid which is found in Thailand resembling with *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) reported in Taiwan.

Keywords: Orchid, Phalaenopsis, chlorotic ring spot

คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกและนำเข้าต้นกล้วยไม้เพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ สำหรับประเทศที่นำเข้าต้นกล้วยไม้จากไทยส่วนใหญ่นำไปประดับ มีส่วนน้อยที่นำไปเป็นต้นพันธุ์ แต่การนำเข้าของผู้ปลูกเลี้ยงในประเทศไทยจะนำพันธุ์ที่แปลกใหม่มาเป็นต้นพันธุ์ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การนำต้นที่ติดเชื้อไวรัสเข้ามาโดยเฉพาะอย่าง

ยิ่งเชื้อไวรัสที่ไม่เคยมีมาก่อนในประเทศไทยย่อมมีผลกระทบโดยตรงต่อการเพิ่มและแพร่ กระจายโรคไวรัสที่ติดมากับต้นพันธุ์ ส่วนที่นำต้นพันธุ์เข้ามาเพื่อผสมพันธุ์แม้เชื้อจะไม่ถ่ายทอดทางเมล็ดแต่เป็นการนำต้นกล้วยไม้ที่มีเชื้อไวรัสมาปะปนอยู่ในแหล่งปลูก จากการสำรวจตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2550 ตรวจพบโรคไวรัสที่เกิดจากเชื้อไวรัส CyMV ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย (Dendrobium), สกุลแวนด้า (Vanda), สกุลสาวน้อยเต้นระบำ (Oncidium), แกรมมาโตไฟลั่ม (Grammatophyllum) และสกุลฟาแลนอพซีส (Phalaenopsis) ในอัตราตั้งแต่ 30-100 เปอร์เซ็นต์ในทุกพันธุ์ ORSV ถูกตรวจพบในกล้วยไม้สกุลต่าง ๆ ในอัตราที่น้อยกว่า CyMV พบเฉลี่ยประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ แต่มีผลกระทบรุนแรงมากกว่าต่อปริมาณผลผลิตของดอกและคุณภาพของช่อดอกทำให้สกุล Vanda มีอาการเนื้อเยื่อตายเป็นแผลรูปวงแหวนแล้วเปลี่ยนเป็นแผลสีดำบนใบทั้งต้น สกุล Oncidium เป็นพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อ ORSV ในอัตราสูงกว่ากล้วยไม้สกุลอื่น ๆ มีอาการรุนแรงใบเรียวเล็กเหลือแต่เส้นกลางใบและมีใบด่างร่วมด้วย (สุรภี, 2536) และปัจจุบันได้มีการตรวจพบอาการด่างเหลืองเป็นวง (chlorotic ringspot) บนใบของกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ในบางแหล่งปลูกของประเทศซึ่งจากรายงานของ Zheng *et. al* (2008) พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) และมีการระบาดในประเทศไต้หวัน นอกจากนั้น You-Xiu Zheng *et al.* (2008) พบว่าอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) และจัดอยู่ในกลุ่ม Tospovirus มีการระบาดในประเทศไต้หวัน ซึ่งเป็นแหล่งนำเข้ากล้วยไม้ของประเทศไทย สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ดังนั้นจึงควรทำการสำรวจ จำแนกและศึกษาลักษณะอาการดังกล่าวบนกล้วยไม้ เพื่อจัดทำเป็นข้อมูลปัจจุบัน ทำให้ได้ข้อมูลของการเกิดโรคและผลกระทบต่อต้นกล้วยไม้ เพื่อวางแนวทางในการควบคุมโรคหรือลักษณะอาการดังกล่าวกับกล้วยไม้ รวมทั้งทำให้ทราบชนิดเชื้อสาเหตุ ทั้งยังเป็นการเฝ้าระวังการเกิดโรคและการแพร่ระบาดในประเทศไทย

ดังนั้นเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุของอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis โดยทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนดูอนุภาค ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากพืชเป็นโรคกับพืชทดสอบ และตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา ด้วยวิธี ELISA และใช้วิธี RT-PCR เป็นวิธีตรวจสอบในกรณีเชื้อไวรัสมีปริมาณน้อย และยังใช้เป็นวิธีช่วยทวนสอบให้ชัดเจนมากขึ้น โดยออกแบบ primers ที่เฉพาะเจาะจง

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- primer
- PCR
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และตรวจสอบอาการ chlorotic ringspot บน Phalaenopsis

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนใบ ที่มีอาการด่างเหลือง หรือใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) และใบจุด (local lesion) ในแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำพูน และจังหวัดราชบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม-สิงหาคม 2560 และนำกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อสาเหตุและเพื่อนำไปทดสอบลักษณะอาการบนพืชทดสอบต่อไป

2. การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุ chlorotic ringspot บน Phalaenopsis

2.1 การสกัดและตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

การตรวจหาเชื้อไวรัส โดยทำการสกัดอาร์เอ็นเอและนำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัดมาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ชุด One Step RT-PCR Kit (biotechrabbit) เพิ่มปริมาณของชิ้น cDNA สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ chlorotic โดยใช้ชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งใบกล้วยไม้ที่มีอาการของโรค ประมาณ 0.1 กรัม บดในโกร่งที่เย็นโดยการเติมไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงละเอียด ใช้ช้อนพลาสติกที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ตักผงละเอียดที่บดไว้ใส่หลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติม buffer RLT ที่เติม beta mercaptoethanol (10 ไมโครลิตร/1 มิลลิลิตร RLT) 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยและนำหลอดไปแช่ที่ 56 °C นาน 1-3 นาทีจากนั้นดูด ส่วนผสมทั้งหมดใส่ใน QIAshredder spin column (สีม่วง) นำ column ซ้อนบนหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 2 นาที น้ำใสจะผ่าน column ลงในหลอดที่รองรับขนาด 2 มิลลิลิตร ส่วนเศษชิ้นส่วนพืชติดอยู่ด้านบนcolumn

3. เติม absolute ethanol ในหลอดที่รองรับน้ำใส ปริมาตร 0.5 เท่า (225 ไมโครลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette ดูดขึ้นลง

4. ดูดส่วนผสมทั้งหมดใส่ลงใน RNeasy mini column (สีชมพู) และวางซ้อนบนหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร และนำไปหมุนเหวี่ยงตะกอนที่ 12,000 รอบ/นาทีนาน 15 วินาที

5. เททิ้งส่วนที่ผ่าน column แล้วเติมสารละลาย RW1 ลงใน column ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 15 วินาที

6. เททิ้งส่วนที่ผ่าน column แล้วล้าง column ด้วย RPE 500 ไมโครลิตร โดยการหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบ/นาที 15 วินาที

7. ย้าย column ซ้อนบนหลอด micro centrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำ (RNase-free water) 50 ไมโครลิตร ใน column เพื่อชะล้าง RNAจาก column รอประมาณ 1 นาที ก่อนไปหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที อาร์เอ็นเอที่ได้ละลายในน้ำผ่าน column และถูกเก็บไว้ในหลอดรองรับ จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -80°C

ตรวจสอบลักษณะอาการ chlorotic ringspot ในกล้วยไม้ Phalaenopsis โดยใช้คู่โดยใช้คู่ไพรเมอร์ตามวิธีของ Jones R.A.C. and M. Sharman, (2005) CaCV.NPF 5’TTA CAC TTC TAT AGA AGT ACT A 3’ และ

CaCV.NPR 5’ATG TCT AAC GTT AGG CAA CTT A 3’ สังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR)

2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

ตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา RT-PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวล์ท ใน TAE บัฟเฟอร์ เป็นเวลา 30 นาที

2.3 การทำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR บริสุทธิ์ (Purification PCR product)

โดยนำชิ้นส่วนเจลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการทำปฏิกิริยา PCR บน 0.7% agarose gel มาทำให้บริสุทธิ์โดยปฏิบัติตามคำแนะนำและวิธีใช้ของชุด PCR clean up และ Gel extraction (NucleoSpin® Extract II)

2.4 หาลำดับเบสและตรวจสอบความเหมือนของลำดับเบส

นำผลผลิตของปฏิกิริยา PCR (จากการทดลองข้อ 2.4) ส่งไปหาลำดับเบสที่บริษัทกิบไทย เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของยีนชนิดอื่น ๆ ในฐานข้อมูล (GenBank) โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

3. การปลูกเชื้อบนพืชอาศัย

นำใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ chlorotic ringspot มาปลูกเชื้อ โดยบดใบพืชให้ละเอียดผสมกับ 0.5M phosphate buffer pH 7.0 และผสมผงซีไลท์ (celite) ก่อนนำน้ำคั้นทาลงบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือน โดยหมั่นสังเกตลักษณะอาการของพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

เวลาและสถานที่

<u>ระยะเวลา</u> เริ่มเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และตรวจสอบตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้สกุล ฟาเลนอพซิส (*Phalaenopsis*) ที่แสดงลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ที่มีอาการด่างเหลืองหรือใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) และใบจุด (local lesion) จากแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ราชบุรี และในโรงเรือนกล้วยไม้มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่ ในระหว่างเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2560 (Figure 1) ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวที่ปรากฏนั้นสอดคล้องกับรายงาน

ของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) ที่พบอาการ centric necrosis และพบลักษณะอาการเป็น chlorotic ringspot ขนาดใหญ่บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ในประเทศไต้หวัน ส่งผลทำให้เกิดความเสียหายร้ายแรงต่อการผลิตกล้วยไม้ในไต้หวัน จากรายงานดังกล่าวของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) และ You-Xiu Zheng *et al*., (2011) ได้จำแนกสาเหตุลักษณะอาการ chlorotic ringspots บนใบกล้วยไม้ Phalaenopsis ในประเทศไต้หวันพบว่าเป็นเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) จัดอยู่ในกลุ่ม Tospovirus

2. การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อสาเหตุ chlorotic ringspot บน Phalaenopsis

2.1 การสกัดและตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

ตามรายงานรายงานของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) ที่พบอาการ centric necrosis และพบลักษณะอาการเป็น chlorotic ringspot ขนาดใหญ่บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ในประเทศไต้หวันและสอดคล้องกับอาการที่พบบนกล้วยไม้ Phalaenopsis ในประเทศไทย จึงได้ทำการสกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ chlorotic ringspot ด้วยชุดสกัดอาร์เอ็นเอสำเร็จรูป (RNeasy Kit ของ QIAGEN) และนำอาร์เอ็นเอของเชื้อที่ได้จากการแยกสกัดมาทำปฏิกิริยา RT-PCR โดยใช้ชุด One Step RT-PCR Kit (biotechrabbit) เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ตามวิธีของ You-Xiu Zheng *et al*., (2011) ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR) โดยใช้คู่โดยใช้คู่ไพรเมอร์ตามวิธีของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) CaCV.NPF 5’ TTA CAC TTC TAT AGA AGT ACT A 3’ และ CaCV.NPR 5’ ATG TCT AAC GTT AGG CAA CTT A 3’ ซึ่งจากผลการตรวจ พบว่า primers สามารถจับและสังเคราะห์ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 828 นิวคลีโอไทด์ (Figure 2)

2.2 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

จากการศึกษาลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอใน Figure 2 นำ DNA product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (ส่งวิเคราะห์บริษัท กิบไทย จำกัด) เพื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของยีนที่ตรวจพบที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) พบว่ามีขนาด 828 นิวคลีโอไทด์ (Figure 3) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ในกล้วยไม้ Phalaenopsis ตามที่มีรายงานในฐานข้อมูล Genbank พบว่ามี percent identity ถึง 92.62% และสอดคล้องกับรายงานของ You-Xiu Zheng *et al*., (2011) แสดงว่าลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ที่พบในประเทศไทยมีความเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ที่มีรายงานในไต้หวัน

3. การปลูกเชื้อบนพืชอาศัย

นำใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการมาบดใบให้ละเอียดกับ 0.5 M phosphate buffer pH 7.0 ที่ผสม 2-mercaptoethanol อัตรา 0.2% ผสมผงซีไลท์ (celite) นำน้ำคั้นทาลงบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีโนโปเดียม

(*Chenopodium quinoa*) แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อแล้วเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ โดยลักษณะอาการที่พบเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานของ Zheng *et al*., (2008) ปรากฏอาการแรกเริ่มจะเป็นจุดบนใบและขยายออกซึ่งพบว่า ทั้งยาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana benthamiana*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) เกิดอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อตายเป็นจุดหลังปลูกเชื้อแล้ว 10-15 วัน ส่วนมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) และถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) ไม่แสดงอาการบนใบหลังปลูกเชื้อ (Figure 3)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis นั้น พบลักษณะอาการด่างเหลือง ใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) ขยายใหญ่บนใบกล้วยไม้และมีอาการใบจุด (local lesion) ตรงกลางแผล เมื่อตรวจด้วย primer ตามวิธีของ You-Xiu Zheng *et al*., (2008) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตรงกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ที่มีรายงานในไต้หวัน และหลังปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบด้วยวิธี mechanical บนต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) พบว่าในยาสูบและคีโนโปเดียมเกิดลักษณะอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อเป็นจุดเหลืองและตาย ส่วนมะเขือเทศ (Lycopersicon esculentum) และถั่วพุ่ม (Vigna sinensis) ไม่แสดงอาการบนใบหลังปลูกเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาทำให้พบว่าลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนใบกล้วยไม้สกุลฟาเลนอพซิส (Phalaenopsis) ที่พบในประเทศไทยมีความเหมือนกับเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV-Ph) ที่มีรายงานในไต้หวัน

เอกสารอ้างอิง

Chang,M.U., A.Kei, D.Yoji and Y. Koyoshi. 2007. Morphology and Intracellular Appearance of Orchid fleck virus. The Phytopathological Society of Japan Vol 42 (2) :156-167.

Chang, M.U., H.H. Chun, D.H. Baek and J.D. Chung. 1991. Study on the Viruses in Orchids in Korea : Dendrobium mosaic virus, Odontoglossum ringspot virus, Orchid fleck virus, and unidentified potyvirus. The Plant Pathology Jurnal. Vol. 6 :118-129.

Jones R.A.C. and M. Sharman. 2005. Capsicum chlorosis virus infecting Capsicum annuum in the East Kimberley region ofWestern Australia. Australasian Plant Pathology, 2005, 34, 397–399.

Mackenzie, A.M., M.Nolan, K.J.Wel, M.A. Clements, D.Gowanlock, B.J.Wallace and A.J.Gibbs. 1998 . Ceratobium mosaic Potyvirus : another virus from orchids. Archives of Virology. Vol 143 (5) 903-914.

Singh, M.K., A.R.Sherpa,V.Hallan and A.A.Zaidi. 2007. A Potyvirus in Cymbidium spp.in northern India. Australasian Plant Disease Notes 2(1) 11-13.

Zettler, F.W., N.J. Ko, G.C. Wisler, M.S. Elliottanc and S.M. Wong. 1990. Viruses of Orchids and Thair Control. Plant Disease, Vol. 74(9) 621-626.

Zheng YX, Chen CC, Yang CJ, Yeh SD and Jan FJ. 2008. Identification and characterization of a tospovirus causing chlorotic ringspots on *Phalaenopsis* orchids. Eur J Plant Pathol (2008) 120:199-209.

Zheng YX, Chen CC and Jan FJ. 2011. Complete nucleotide sequence of capsicum chlorosis virus isolated from *Phalaenopsis* orchid and the prediction of the unexplored genetic information of tospoviruses. Archives of Virology (2011) 156:421-432.

Figure 1 Symptoms chlorotic ringspot on orchids *Phalaenopsis*

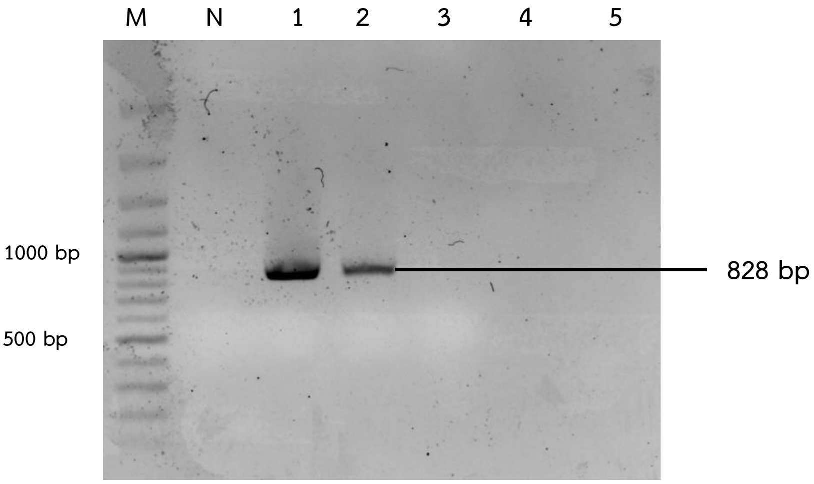

Figure 2 Detection of CaCV infecting plant samples by RT-PCR specific primer for gene of CaCV (828 bp) M: 100 bp Plus DNA ladder (Thermo), N: dH_2O as negative control, Lane 1: Pepper positive control, Lane 2: Orchid 1, Lane 3: Orchid 2, Lane 4: Orchid 3 and Lane 5: Orchid 4

1 TTAGCACTAA AAGCTTTGTC CATGTACTTG ACTTGCTCAT CATATTTCTT
AATCGTGATT TTCGAAACAG GTACATGAAC TGAACGAGTA GTATAAAGAA

51 AAGTGAGATA GAACTAGCAG TACCAGGATT GCTTTCACTG AGCAATTTGA
TTCACTCTAT CTTGATCGTC ATGGTCCTAA CGAAAGTGAC TCGTTAAACT

101 CAGCTTGTTT GAACAATGTG TTCAGATCCT CCTTAAACTC TATTTGAGAA
GTCGAACAAA CTTGTTACAC AAGTCTAGGA GGAATTTGAG ATAAACTCTT

151 GCAGAAAGAA CTTTAGCCAC TTTGCAAACC TGTTCATAGG TAGAGAAATT
CGTCTTTCTT GAAATCGGTG AAACGTTTGG ACAAGTATCC ATCTCTTTAA

201 CTTAATGCCC AGTTTCTCCT TTTTAACATT TTGATAATAA GCTAATGGGA
GAATTACGGG TCAAAGAGGA AAAATTGTAA AACTATTATT CGATTACCCT

251 AAATAATTGG TGCAAGGCCT TTAATGCTGG ATAAGAGTGG TAAGGGACCA
TTTATTAACC ACGTTCCGGA AATTACGACC TATTCTCACC ATTCCCTGGT

301 CCAATACATA GCATCATCCT AAGAGCACAT GAATCAAACT GAGCAGGTAT
GGTTATGTAT CGTAGTAGGA TTCTCGTGTA CTTAGTTTGA CTCGTCCATA

351 GTTCAATCCA TAAGCTGCAA CTAATGGCAA TTCCATCACC TTTGCATACA
CAAGTTAGGT ATTCGACGTT GATTACCGTT AAGGTAGTGG AAACGTATGT

401 TCTCTTGTTT AGCAACTTCA TTCTTGCTCT TTTCTACCAT GTTGATCATC
AGAGAACAAA TCGTTGAAGT AAGAACGAGA AAAGATGGTA CAACTAGTAG

451 TTAACTCTTA TCAAAGCTTC TGTTCTCTTA AAAGTCCAGT CCTCTGGACC
AATTGAGAAT AGTTTCGAAG ACAAGAGAAT TTTCAGGTCA GGAGACCTGG

501 AACATTAGCA TCTGTAGAAA CAATAGTTTT CTCACAGAAC TTATACTTTC
TTGTAATCGT AGACATCTTT GTTATCAAAA GAGTGTCTTG AATATGAAAG

551 CACTTTTGCA AGCGGCAAAA ATCTGCTTTC TACACTTCAG AATATTAAGA
GTGAAAACGT TCGCCGTTTT TAGACGAAAG ATGTGAAGTC TTATAATTCT

601 CAGTTTGTGA AAGTCATTTC AACGCTTTTG TTGTTCTCAT AGAATGTCTT
GTCAAACACT TTCAGTAAAG TTGCGAAAAC AACAAGAGTA TCTTACAGAA

651 GAAACTGAAT CCAGGAGTTG AATCTTCGGT TTCAATTTCA ACATCTGCAG
CTTTGACTTA GGTCCTCAAC TTAGAAGCCA AAGTTAAAGT TGTAGACGTC

701 TTCCACCAGC CAAGAGTCTC TATAATTTTC TTCTCGGTAA GTTGCTAGTC
AAGGTGGTCG GTTCTCAGAG ATATTAAAAG AAGAGCCATT CAACGATCAG

751 TATAAGAAT
ATATTCTTA

Figure 3 The order of chlorotic ringspot nucleotides on Phalaenopsis orchid leaves which contain the percent of identity as same as *Capsicum chlorosis virus*