

-----

- คำสำคัญ :** สัมโน, อาการไอบหิก, อาการยอดหิก, ไวรส์พีช

## ABSTRACT

From the study of the crinkly leaf symptoms in the pummelo orchards in different areas of Thailand, it was confirmed that samples of pummelos, lime and lemons showing crinkly leaves, twisting, blotches along midrib. Concave into one side of the leaf (notch) is noticeable. Symptoms is more observable during the young leaves stage. Based on symptoms, transmission through budding and PCR detection revealed that Citrus chlorotic dwarf associated virus (CCDav) belonging to Geminiviridae is the causal agent of disease. Currently CCDav reported in Turkey (2012) and China (2015). Virus spread primarily due to the use of vegetative propagation (bud, shoot, marcotting). There is no evidence of disease spread by seeds or mechanical methods. The disease mainly found in pummelo and lime orchards across Thailand.

**Key words :** Pummelo, pomelo, Crinkly leaves, CCDav, Citrus chlorotic dwarf association virus, Geminivirus

## 6. คำนำ

จากผลการศึกษาและสำรวจโรคกรีนนิงของส้มโอ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายปี 2555 ในโครงการศึกษาการจัดการปุ๋ยและการระบาดของโรคกรีนนิงของส้มโอในแหล่งปลูกพื้นที่ อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายนอกจากจะพบความเสียหายที่เกิดจากโรคกรีนนิงซึ่งมีผลกระทบทำให้ผลส้มโอร่วงก่อนอายุการเก็บเกี่ยวและผลผลิตไม่มีคุณภาพ สร้างปัญหาอย่างให้กับเกษตรกรชาวสวนส้มในพื้นที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายแล้ว ยังพบโรคของส้มโออีกโรคหนึ่งคือโรคใบหงิก (crinkly leaf disease) และเกษตรกรชาวสวนส้มได้กล่าวว่าเมื่อ 2 – 3 ปี ที่ผ่านมาพบโรคระบาดเพียงเล็กน้อยประมาณ 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ปัจจุบันโรคระบาดมากถึง 70 – 80 เปอร์เซ็นต์และนับวันยิ่งจะเพิ่มมากขึ้นทุก ๆ ปี บางสวนพบโรคเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตลดลงและต้นที่แสดงอาการใบหงิกรุนแรง ผลส้มโอจะเกิดอาการแข็งด้าน ไม่มีคุณภาพ และไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ทางกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ได้ทำการพิสูจน์เบื้องต้น ตามกรรมวิธีทางไวรัสวิทยา พบเพียงบางตัวอย่างประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่เป็นโรคไวรัสทริสเทซ่า แสดงว่าอาการใบหงิกของส้มโอไม่ได้มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสทริสเทซ่า แต่อาจเกิดจากเชื้อไวรัสชนิดอื่น แม้ว่าไมตรีและคณะ (2529) ได้รายงาน ว่าอาการใบหงิกที่เกิดบนมะนาวเป็นอาการชนิดหนึ่ง(strain) ของโรคทริสเทซ่า อาจจะเป็นเพราะมะนาวเป็นพืชตระกูลส้มที่อ่อนแอ (susceptible) ต่อไวรัสทริสเทซ่าโดยการนำโรคของแมลง

พาหะเพลี้ยอ่อน จึงตรวจพบเชื้อไวรัสเทริสเทซาทุกครั้ง ซึ่งตรงกันข้ามกับส้มโอที่ค่อนข้างทนทาน (tolerant) ต่อเชื้อไวรัสเทริสเทซา (mixed infection) ในธรรมชาติ และอาการโรคใบหงิก ดังกล่าวมีอาการคล้ายกับโรค Citrus variegation ที่มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัส Citrus variegation virus (CVV) ที่เกิดกับพันธุ์ส้ม Pleatine sweet lime ประเทศ Costa Rica (Moreira et al., 2011) ทำให้ส้มเกิดอาการใบหงิก (Crinkly leaf) บิดเบี้ยวและต่าง (Chlorotic mottle) ผลผลิตลดลงและไม่มีคุณภาพ สำหรับประเทศไทยโรคนี้ยังไม่มีรายงานมาก่อน นอกจากจะพบเป็นกับส้มโอในพื้นที่อำเภอเวียงแก่น จังหวัดเชียงรายแล้ว ยังพบเกิดกับส้มโอในจังหวัดนครปฐม ราชบุรี พิจิตร สุโขทัย นครนายกและปราจีนบุรี และคงจะแพร่ระบาดไปยังจังหวัดอื่น ๆ อีก โดยนำกิ่งพันธุ์เป็นโรคขยายปลูก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษา และพิสูจน์ว่าอาการใบหงิกที่เกิดบนส้มโอโดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธุ์ทองดีว่ามีสาเหตุจากเชื้ออะไร และสามารถถ่ายทอดแพร่ระบาดได้อย่างไร เพื่อจะได้หาแนวทางอย่างมีประสิทธิภาพในการ ป้องกันและควบคุมโรคต่อไปในอนาคต

## 7. วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

#### 1. ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการโรค และตัวอย่างพืชปกติ

- ส้มโอ ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน และมะนาว ที่มีอาการไหม้หรือบิดเบี้ยวและต้นกล้าส้มโอพันธุ์ทองดี ส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม ส้มเขียวหวาน มะนาว และมะกรูด
- ดินปลูกพืช ฤๅเพาะชำ ปุ๋ยเคมี 16-16-16 สารป้องกันกำจัดแมลง
- มีดตัดตา, กรรไกรตัดกิ่ง, เทปพันกิ่ง

#### 2. อุปกรณ์ห้องปฏิบัติการ ได้แก่

- เครื่องชั่งละเอียด (precision balance) 2 ตำแหน่ง
- ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส (freezer)
- ตู้ดูดควัน / ตู้ดูดไอสารเคมี (Fume Hood)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (C1000™ Thermal Cycler, BIO-RAD)
- เครื่องเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis)
- เครื่องวิเคราะห์เจลและบันทึกภาพ (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD)

#### 3. อุปกรณ์ด้านวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- หลอดไมโครทิวป์ (Microtube) ขนาด 0.5, 1.5 และ 2 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปตต์ทิป (Micropipette tip) ขนาด 10, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

#### 4. สารเคมีวิทยาศาสตร์ ได้แก่

- ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GeneJET Plant DNA Purification Mini Kit
- GoTaq® Green Master mix (Promega, USA)
- ดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler 1kb /100 bp DNA Ladder (Fermentas®)
- Agarose gel (SeaKem®)
- ชุดไพรเมอร์ (Primer set)
- พลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Promega)

## - วิธีการ

### 1. เก็บตัวอย่างใบและกิ่งส้มโอ

เก็บตัวอย่างในแหล่งปลูกส้มโอที่มีอาการใบหงิกหรือบิดเบี้ยวคล้ายอาการจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายจากแหล่งปลูกในภาคเหนือ กลาง อีสาน และ ภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย พิจิตร ชัยนาท ชัยภูมิ ปทุมธานี นนทบุรี นครปฐม ชัยภูมิ สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ภูเก็ต นำตัวอย่างกิ่งพันธุ์ที่เก็บมาทำการเสียบยอดหรือติดตาไว้บนต้นกล้าส้มโอทองดีที่ใช้เป็นต้นตออายุประมาณ 6 – 8 เดือน ซึ่งเพาะจากเมล็ดส้มโอทองดีซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชสวนเชียงราย ทำการเพาะเมล็ดโดยใช้วัสดุปลูกสูตรไทย-เยอรมัน เพื่อป้องกันปัญหาโรครากเน่าโคนเน่าเมื่อต้นกล้าอายุประมาณ 2 - 3 เดือน ทำการย้ายต้นกล้าใส่ในถุงพลาสติกขนาด 6 x 12 นิ้ว แล้วเก็บรักษาไว้ในโรงเรือนกันแมลงของกลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช ให้น้ำและปุ๋ยอย่างสม่ำเสมอ และตัวอย่างใบไปสกัดสารพันธุกรรมเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิกและระบุชนิดเชื้อไวรัสต่อไป

### 2. การตรวจสอบและระบุเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิกในส้มโอ

#### 2.1 ทำการสกัดสารพันธุกรรม

นำตัวอย่างใบส้มโอที่เก็บมาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยชั่งตัวอย่างใบส้มโอ ประมาณ 0.2 กรัม นำใส่โถงแล้วเติมไนโตรเจนเหลวบดให้เป็นผงละเอียด สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN (Germany) และเติม AP1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่เติม RNase A ปริมาตร 4 ไมโครลิตร นำใส่หลอด microcentrifuge tube ไปแช่ที่ 65 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเติม AP2 buffer ปริมาตร 130 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดส่วนน้ำใสทั้งหมดใส่ลงใน QIAshredder Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนน้ำใส มาเติม absolute ethanol ปริมาตร 1.5 เท่า แล้วดูดส่วนน้ำใสปริมาตร 650 ไมโครลิตร ใส่ลงใน DNeasy Mini Spin Column หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที แล้วล้าง column ด้วย RW1 buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วชะล้าง DNA ออกจาก column โดยเติม AE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หมุนเหวี่ยงที่ 13,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ทำการเก็บดีเอ็นเอที่สกัดไว้ที่ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ในขั้นต่อไป

## 2.2 การตรวจสอบสาเหตุโรคไวรัสโดยใช้เทคนิค PCR

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดไว้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ 3202fw/6rev (Loconsole *et al.*, 2012) เป็นตัวเริ่มต้นในการเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย จากปฏิกิริยา PCR จะแสดงแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 444 เบส

ลำดับเบสคู่ไพรเมอร์ 3202fw และ 6rev ดังนี้

3202fw : 5'-GTTCTGTGTTTCGACCCGTT-3'

6rev : 5'-GGGATTCGCATGGATAGCTCATCCAA-3'

ส่วนประกอบสำคัญที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ปริมาตรรวมทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ได้แก่

|                                                   |                |
|---------------------------------------------------|----------------|
| - น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (dH <sub>2</sub> O) | 7.0 ไมโครลิตร  |
| - ไพรเมอร์ forward (3202fw) (10 pmol)             | 1.0 ไมโครลิตร  |
| - ไพรเมอร์ reverse (6rev) (10 pmol)               | 1.0 ไมโครลิตร  |
| - Green master mix                                | 10.0 ไมโครลิตร |
| - ดีเอ็นเอต้นแบบ                                  | 1.0 ไมโครลิตร  |
| รวม                                               | 20.0 ไมโครลิตร |

นำส่วนประกอบการทำปฏิกิริยา PCR มาผสมกันแล้วนำไปทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมาย ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Thermal cycler) โดยตั้งโปรแกรมการทำงาน ดังนี้

|            |      |               |                        |
|------------|------|---------------|------------------------|
| ขั้นที่ 1: | 94°C | นาน 5 นาที    | 1 รอบ                  |
| ขั้นที่ 2: | 94°C | นาน 30 วินาที |                        |
| ขั้นที่ 3: | 54°C | นาน 30 วินาที |                        |
| ขั้นที่ 4: | 72°C | นาน 30 วินาที | (ขั้นที่ 2 - 4) 30 รอบ |
| ขั้นที่ 5: | 72°C | นาน 7 นาที    | 1 รอบ                  |

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ 1% gel agarose เตรียมในสารละลาย 0.5 TBE buffer แบ่งผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มา 10 ไมโครลิตร โดยเปรียบเทียบกับ 100 bp DNA Ladder แล้วนำ agarose gel มาผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่าง

ศักย์ 100 โวลต์ นาน 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel มาย้อมด้วย สารละลาย ethidium bromide นาน 15 นาที และแช่น้ำเปล่า 10 นาที และนำแผ่น agarose gel มาส่องดูขนาดดีเอ็นเอ ด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (ChemiDoc™ Touch Imaging System, BIO-RAD) ทำการบันทึกภาพและสรุปผลที่เกิดขึ้น

### 2.3 การโคลนยีนเพื่อระบุเชื้อสาเหตุอาการใบหงิกในส้มโอ

โคลน insert DNA จากข้อ 2.2 เข้าในพลาสมิดพาหะ pGEM-T easy vector (Figure 1 ) ตามระบบของ TA cloning system ที่แสดงไว้ในคู่มือโดยผสมส่วนประกอบต่างๆ ในหลอดปฏิกิริยา PCR ขนาด 0.5 ml ดังนี้ Ligation buffer (2x) 5 µl, pGEM-T easy vector 1 µl, PCR product (template) 2 µl, DEPC treated water 1 µl, T4 DNA ligase 1 µl ปริมาตรรวมเท่ากับ 10 µl โดยในระหว่างการเติมสารต่างๆ ต้องทำในกระตักน้ำแข็ง หลังจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง thermal cycle โดยตั้งโปรแกรมคงที่ 4 °C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง การส่งถ่าย recombinant plasmid เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายดีเอ็นเอที่ทำการเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ ปริมาตร 10 µl ใส่ลงในหลอด ขนาด 1.5 มล. จากนั้นจึงเติม competent cell ปริมาตร 50 µl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ไมโครปิเปตกวนเบาๆ นำไปวางบนน้ำแข็ง 30 นาที จากนั้นย้ายลงในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 42 °C นาน 45 วินาที และนำไปวางบนน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที จากนั้นจึงเติม SOC medium ปริมาตร 950 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C พร้อมทั้งเขย่าด้วยความเร็วประมาณ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง , นำสารละลายมา spread บนอาหาร LB+ampicillin ความเข้มข้น 50 ppm บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 14 – 17 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนี *E. coli* บนอาหาร LB+ampicillin ลักษณะโคโลนี กลม, ใส, ขนาดเล็ก ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีที่คัดเลือกมาแตะบนจานอาหาร LB+ampicillin ที่มีช่องตารางหมายเลขกำกับ นำไม้จิ้มฟันที่แตะเชื้อหย่อนลงบนอาหาร LB ปริมาตร 4 ml + ampicillin ความเข้มข้น 50 ppm (เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ) เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน ใช้ลูปเขี่ยเชื้อ *E. coli* โคลนที่มีขึ้นดีเอ็นเอสกัดแทรกอยู่บนอาหาร LB + ampicillin ความเข้มข้น 50 ppm บ่มไว้ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นจึงคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวเลี้ยงในหลอด ขนาด 1.5 ml ที่มีอาหาร LB + ampicillin ความเข้มข้น 50 ppm เอียง บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ข้ามคืน จากนั้นจึงส่งไปทำการหาลำดับเบสที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์เชื้อไวรัสที่มีรายงานใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)

### 3. การถ่ายทอดเชื้อไวรัส *Citrus chlorotic dwarf associated virus*

#### 3.1 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยวิธีกรีดแผลบนต้นกล้า

นำตัวอย่างใบอ่อนของต้นกล้าส้มโอทองดีที่ได้รับการตรวจยืนยันว่าเป็นโรคใบหงิกแล้วด้วยเทคนิคพีซีอาร์และแสดงอาการใบหงิก บิดงอ และด้านหลังใบมีอาการจุดดำตามแนวเส้นใบมาบดให้ละเอียดใน Phosphate buffer pH 7.2 และแช่สารละลายไว้ในกระตักน้ำแข็ง หลังจากนั้นใช้มีดติดตาจุ่มในสารละลายแล้วนำไปกรีดบนต้นกล้าส้ม 7 ชนิด ได้แก่ ส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มทับทิมสยาม ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน มะนาว มะกรูด จำนวน ชนิดละ 3 ต้น จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในเรือนเพื่อสังเกตอาการและนำมาตรวจหาใช้ไวรัสในระ 3 เดือน และ 6 เดือน ต่อไป

#### 3.2 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสทางเมล็ดพันธุ์

เพาะเมล็ดจากผลส้มโอจากต้นส้มโอทองดีที่เป็นโรคใบหงิก (Figure 7) ทำการย้ายต้นกล้าจำนวน 200 ต้น หลังจากเพาะเมล็ด 60 วัน แล้วเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง เพื่อสังเกตอาการโรคและนำตัวอย่างใบไปสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการในข้อ 2.1 สำหรับการตรวจด้วยเทคนิค PCR เพื่อยืนยันการเกิดโรคใบหงิกในต้นกล้าส้มโอทองดี จำนวน 2 ครั้ง ครั้งที่ 1 เมื่อต้นกล้าส้มโอทองดีอายุ 6 เดือน และครั้งที่ 2 เมื่อต้นกล้าส้มโอทองดี 12 เดือน ตามลำดับ

- เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2560-กันยายน 2562

สถานที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา และ สวนส้มโอเกษตรกร

ของสำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

## 8. ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. เก็บตัวอย่างใบและกิ่งส้มโอที่มีอาการใบหงิก

เก็บตัวอย่างพืชตระกูลส้มที่มีอาการใบหงิก บิดเบี้ยว ม้วนงอ รูปร่างผิดปกติคล้ายกับอาการที่เกิดจากการถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายในแปลงปลูกส้มโอ, มะนาวและส้มเขียวหวาน (Figure 2) ในภาคเหนือ กลาง อีสาน และ ภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงราย จำนวน 5 ตัวอย่าง สุโขทัย 3 ตัวอย่าง จังหวัดชัยนาท 7 จังหวัดนนทบุรี 1 ตัวอย่าง นครปฐมชัยภูมิ 3 ตัวอย่าง จังหวัดชุมพร 1 ตัวอย่าง จังหวัดนครศรีธรรมราช 4 ตัวอย่าง จังหวัดภูเก็ต 2 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 35 ตัวอย่าง (Table 1) นำตัวอย่างกิ่งพันธุ์ที่เก็บมาทำการเสียบยอดไว้บนต้นกลาส้มส้มโอ (Figure 3) และตัวอย่างในนำไปสกัดสารพันธุกรรมเพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิก

### 2. การตรวจสอบและระบุเชื้อไวรัสสาเหตุอาการใบหงิกในส้มโอ

#### 2.1 การเชื้อสาเหตุโรคใบหงิกในส้มโอและมะนาว

ตัวอย่างส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มโอทับทิมสยาม มะนาวแป้น และ มะนาวตาฮิติ ที่เก็บมาจากแปลงเกษตรกร (ตารางที่ 1) รวม จำนวน 35 ตัวอย่าง นำมาสกัดดีเอ็นเอ และทำการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมเชื้อไวรัสด้วยไพรเมอร์ 3202fw/6rev (Loconsole *et al.*, 2012) ด้วยเทคนิค PCR พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณขึ้นดีเอ็นเอได้ขนาดประมาณ 444 bp (Figure 4)

#### 2.2 การระบุสาเหตุโรคใบหงิกในส้มโอ

สกัดดีเอ็นเอจากต้นส้มโอที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อโรคใบหงิก (Figure 3) ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป GenUP™ Plant DNA kit ด้วย Lysis buffer จะได้สารละลายดีเอ็นเอของโรคใบหงิกไว้สำหรับตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาตรวจสอบอาการใบหงิกในส้มโอด้วยเทคนิค PCR โดยคู่ไพรเมอร์ 3202fw/6rev (Loconsole *et al.*, 2012) และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า ได้ขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 444 bp (Figure 4) ทำการโคลนยีนนำขึ้นดีเอ็นเอขนาดประมาณ 444 bp มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดสำเร็จรูป QIAquickGel Extraction Kit (Qiagen, Germany) และนำมาเชื่อมเข้ากับพลาสมิดพาหะ pGEM-T Easy vector (Promega) (Figure 1) ด้วยเอนไซม์ T4 DNA Ligase และทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่คาดว่ามิพลาสมิดลูกผสมสอดแทรกด้วยเทคนิค colony PCR แล้วทำการสกัดพลาสมิดลูกผสมด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป Plasmid Mini Kit QIAGEN (QIAGEN, Germany) และตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Gel electrophoresis พบว่า แสดงแถบดีเอ็นเอของพลาสมิดสายผสมของขึ้นดีเอ็นเอจากคู่ไพรเมอร์ 3202fw/6rev มีขนาดประมาณ 400 bp (Figure 4) แล้วนำส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 2 โคลน ด้วยเครื่องวิเคราะห์ automated DNA sequencer

(the BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit chemistry) ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd ประเทศมาเลเซีย หลังจากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ซึ่งมีความยาว 444 เบส (Figure 5) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีรายงานในฐานข้อมูลฐานข้อมูล GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>) ด้วยโปรแกรม Blastn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) พบว่ามีความเหมือนกับ Citrus chlorotic dwarf associated virus isolate YN-EL4 (Sequence ID: KX840470.1) ที่ระดับความเหมือน 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่มีรายงานจากประเทศจีน (Zhou et al, 2017)

### 3. การถ่ายทอดสาเหตุโรคใบหงิกในส้มโอ

#### 3.1 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยวิธีกล

ต้นกล้าส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มทับทิมสยาม ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน มะนาว มะกรูด จำนวน ชนิดละ 3 ต้น ที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อไวรัส Citrus chlorotic dwarf associated virus สาเหตุของโรคใบหงิกส้มโอ โดยวิธีกลด้วยการกรีดสร้างแผลบนต้นกล้า (Figure 6) พบว่าหลังการถ่ายทอดเชื้อไวรัสนาน 3 เดือน และ 6 เดือน ไม่พบต้นกล้าส้มทั้ง 7 ชนิดแสดงอาการของโรคใบหงิกส้มโอและเมื่อนำตัวอย่างใบมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบว่าไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบหงิกในทุกตัวอย่าง

#### 3.2 การถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์

ต้นกล้าส้มโอทองดีจำนวน 200 ต้น ซึ่งเพาะเมล็ดจากผลส้มโอของต้นส้มโอทองดีที่เป็นโรคใบหงิก ที่เก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง พบต้นกล้าส้มโอแสดงอาการใบบิดเล็กน้อยในบางตัวอย่าง ลักษณะคล้ายอาการรอยบาก(notch) ซึ่งเป็นอาการอย่างหนึ่งที่พบในต้นส้มโอหรือมะนาวที่เป็นโรคใบหงิก แต่เมื่อนำมาตรวจยืนยันด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 2 ครั้ง เมื่อกล้าส้มโอ อายุ 6 เดือน และ 12 เดือน ไม่พบแถบดีเอ็นเอเป้าหมายของเชื้อไวรัส Citrus chlorotic dwarf associated virus สาเหตุของโรคใบหงิกส้มโอ (Figure 8)

### 9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

อาการใบหงิกในพืชตระกูลส้มที่ปลูกในพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทยพบว่าตัวอย่างส้มโอและมะนาวที่แสดงอาการลักษณะใบหงิกงอ บิด ต่างเป็นจุดจำตามด้านหลังตามแนวเส้นใบและมีลักษณะเป็นรอยบาก (notch) เว้าเข้ามาด้านใดด้านหนึ่งของใบ ซึ่งอาการจะเห็นได้ชัดเจนในช่วงแตกใบอ่อน ส่วนในใบที่โตเต็มที่แล้วไปจนถึงใบแก่สังเกตเห็นอาการโรคได้ยาก เกิดจากเชื้อไวรัส Citrus chlorotic

dwarf associated virus (CCDaV) ปัจจุบันมีรายงานในประเทศตุรกี (2012) และประเทศจีน (2015) เชื้อไวรัส CCDaV สันนิษฐานว่ามีแมลงหริขาว 2 ชนิด คือ ในประเทศตุรกี *Parabemisia myricae* Kuwana (Bayberry whitefly) ส่วนในประเทศจีนตรวจพบเชื้อไวรัสในแมลงหริขาว *Dialeurodes citris* Ashmead (Citrus whitefly) แต่ปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดจากแพร่ระบาดคือการใช้ส่วนขยายพันธุ์ เช่น ตา, กิ่ง, การตอนกิ่ง จากต้นที่มีเชื้อไวรัสแล้วนำไปขยายพันธุ์ในสวนหรือแหล่งปลูกใหม่ ๆ โดยเฉพาะการซื้อกิ่งตอนครั้งละมาก ๆ ทำให้มีโอกาสสูงที่เชื้อไวรัสจะติดไปกับกิ่งตอนเนื่องจากไม่ปรากฏอาการหรือสับสนกับอาการที่เกิดจากแมลงเข้าทำลาย และจากการตรวจต้นกล้าส้มโอทองดี 200 ต้น ที่เพาะจากต้นส้มโอที่เป็นโรคใบหงิกเมื่อ อายุ 6 เดือน และ 12 เดือน ไม่พบแถบติเอ็น เป้าหมายของเชื้อไวรัส CCDaV สาเหตุของโรคใบหงิกส้มโอ และไม่พบการเกิดโรคใบหงิกส้มโอ จาก ต้นกล้าส้มโอทองดี ส้มโอขาวแตงกวา ส้มโอทับทิมสยาม ส้มโชกุน ส้มเขียวหวาน มะนาว มะกรูด ที่ ได้รับการถ่ายทอดโรคโดยการกรีดสร้างบาดแผล ดังนั้นเกษตรกรที่จะทำการสร้างสวนใหม่หรือนำกิ่งพันธุ์ส้มโอและมะนาวไปปลูกในพื้นที่ใหม่ควรจะต้องทำการเลือกกิ่งพันธุ์จากต้นแม่พันธุ์ที่ไม่มีอาการใบหงิก ใบด่าง ข้อหดสั้น ของเชื้อไวรัส CCDaV โดยการเดินสังเกตอาการรอบ ๆ ต้นแม่พันธุ์ในช่วงที่มีการแตกยอดอ่อนจะเห็นอาการได้ชัดเจน และเมื่อนำไปปลูกแล้วให้หมั่นตรวจสอบเมื่อต้นกล้าส้มโอหรือมะนาวมีการแตกยอดใหม่ หากพบอาการอาการใบหงิก ใบด่างให้ทำการกำจัดทิ้งทันทีโดยการถอนแล้วฝังกลบและเนื่องจากเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสจึงไม่มีสารเคมีในการป้องกันกำจัดในปัจจุบัน

#### การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ :

- สามารถใช้เป็นคำแนะนำในการเลือกต้นกล้าส้ม กิ่งตอน หรือ ตาพันธุ์ส้มชนิดต่าง ๆ เพื่อป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส
- เป็นประโยชน์กับเกษตรกรผู้ปลูกพืชตระกูลส้มทุกชนิด เช่น ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ มะนาว มะกรูด หากเกษตรกรมีต้นกล้าส้ม กิ่ง ตา พันธุ์ที่สะอาดเพื่อนำไปปลูกจะเป็นการลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับผลผลิต และเป็นการลดแหล่งสะสมของโรคและแมลงพาหะ

#### กลุ่มเป้าหมาย

- หน่วยงานและนักวิชาการที่เกี่ยวข้องทั้งภาคภาครัฐและภาคเอกชน
- เกษตรกร

#### 10. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : -

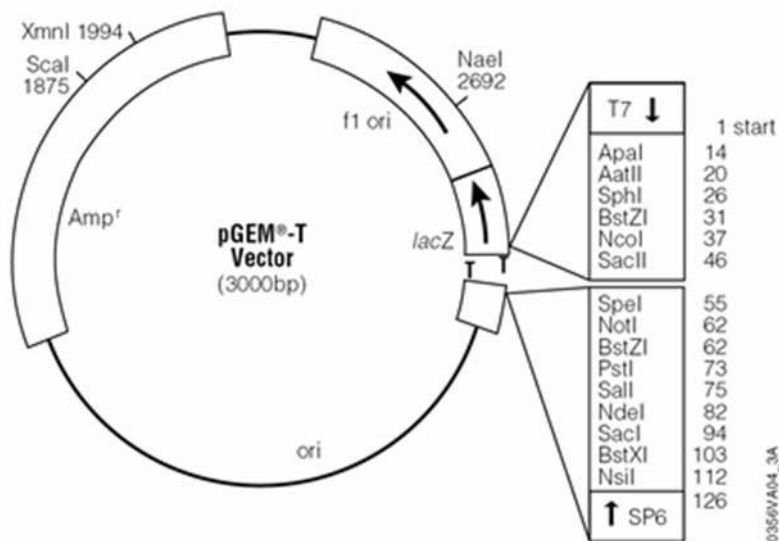
## 12. เอกสารอ้างอิง

- ไมตรี พรหมมินทร์, กิตติศักดิ์ กิริติยะอังกูร, เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์และนวลจันทร์ ดีมา.2529.ความแตกต่างของลักษณะอาการโรคทริสเทซ่าในมะนาวที่เกิดจาก isolate ที่ต่างกัน. วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 4 เล่มที่ 2 หน้า 143-148.
- Davino M., Areddia R. and Garney S.M.1998. Distribution of Citrus variegation virus within citrus hosts. In : Proc. 10<sup>th</sup> Conf. IOCV, 322-326. IOCV, Riverside, CA
- Guo J., Lai X. P., Li J. X., Yue J. Q., Zhang S. Y., Li Y. Y., Gao J. Y., Wang Z. R., Duan H. F. and Yang J. D. 2015. DISEASE NOTES : First Report on Citrus Chlorotic Dwarf Associated Virus on Lemon in Dehong Prefecture, Yunnan, China. Plant Disease, 99(9), 1287. Retrived from : <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-01-15-0011-PDN>
- Loconsole G., Saldarelli P., Doddapaneni H., Savino V., Martelli G. P. and Saponari M. 2012. Indentification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family Geminiviridae. J. Virology (432) 162-172.
- Moreira L., Albertazzi F. J., Garita L., Ortiz B. and Villalobos W. 2011. First report of Citrus variegation virus in Palestine Sweet lime, as Coffee Shade in Costa Rica. In: Proc. 18<sup>th</sup> Conf. IOCV. Page
- Roistacher C.N.1991. Graft-Transmission of Citrus Handbook for detection and diagnosis. IOCV.FAO.286p.
- Roy A., Fayad A., Barthe G., and Bransky R.H. 2005. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple virus in citrus tree. J. Virol. Meth. 129: 47-55.
- Whiteside J.O., Garney S.M. and Timmer L.M. 1998. Compendium of Citrus Disease. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 80p.

### 13. ภาคผนวก

Table 1 Crinkly leaf samples from pummelo and lime

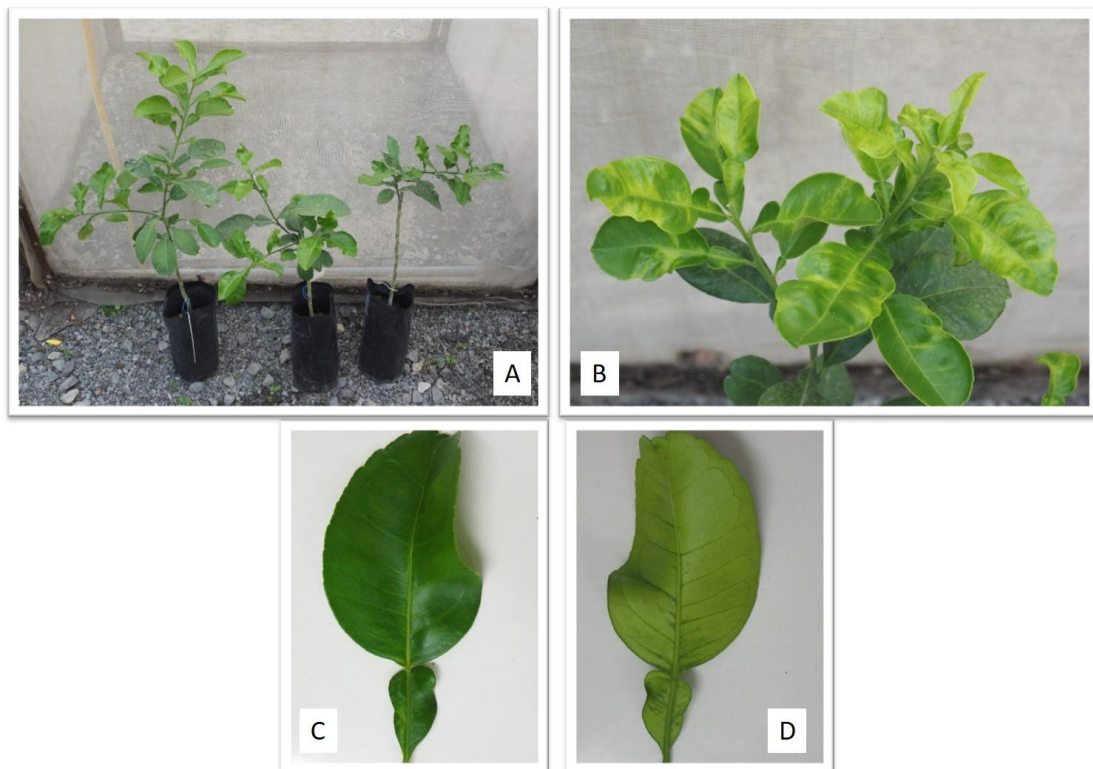
| Provinces           | Plant                            | No. |
|---------------------|----------------------------------|-----|
| Chiang rai          | Pummelo (Thong Dee cultivar)     | 5   |
| Sukhothai           | Pummelo (Thong Dee cultivar)     | 3   |
| Chainat             | Pummelo (Thong Dee cultivar)     | 3   |
| Chainat             | Pummelo (Khao Tang Kwa cultivar) | 4   |
| Chainat             | Tahiti lime                      | 2   |
| Pathum Thani        | Lime (Manao pan cultivar)        | 1   |
| Nakhon Pathom       | Pummelo (Thong Dee cultivar)     | 3   |
| Nonthaburi          | Pummelo (Thong Dee cultivar)     | 1   |
| Chaiyaphum          | Pummelo (Thong Dee cultivar)     | 5   |
| Chumphon            | Pummelo (Thong Dee cultivar)     | 1   |
| Nakhon Si Thammarat | Pummelo (Tubtim Siam cultivar)   | 3   |
| Nakhon Si Thammarat | Pummelo (Thong Dee cultivar)     | 1   |
| Nakhon Si Thammarat | Lime (Manao pan cultivar)        | 1   |
| Phuket              | Pummelo (Tubtim Siam cultivar)   | 1   |
| Phuket              | Lime (Manao pan cultivar)        | 1   |



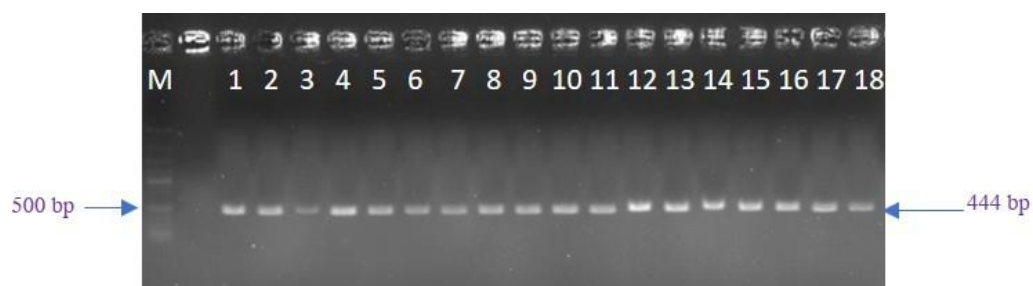
**Figure 1** pGEM® - T easy vector map



**Figure 2** Crinkly leaf disease symptoms on pummelo and lime orchards (A-B) symptoms on lime form Chainat and Nakhon Si Thammarat provinces, (C-D) Symptoms on Pummelo (Thab Tim Saim cultivar) and Pummelo (Thong Dee cultivar) from Nakhon Si Thammarat and Chaiyaphum provinces.



**Figure 3** Pummelo seedlings show crinkly disease symptoms (A), Symptoms on young leaves is noticeable (B), Concave into one side of the leaf (C), Blotchy symptoms along midrib on lower surface of the leaf



**Figure 4** Gel electrophoresis of crinkly leaf samples show PCR product about 444 bp. Electrophoresis is on 1.5% agarose gel of DNA amplified using 3202fw/6rev primers

GTGCTGTGTTTCGACCCGTTTCTTGCACTGGATCATGGCATGAAGGTGTGGGTCTCCGGATTCGTG  
 GAGTTCCTCACACACGCACATGTAAGTGATTGTGAATCGTGCGAGTGTTAGTCGAAGGAAAGCTT  
 GGAGGTGTTCTTGGTGCATGGGCACTTGGGGTATGTAAGGAAAATATTTTGGCTGAGAATCGG  
 AAGCTAGAGGAAGTGGAAGCCATGTTGTACGGATTGGTGGAGGAAAGATTAGCCCCCTTATGGTA  
 GTGGGAGTGGGAGTGCCAATTTTATATAATATTACAGGCACTCCCACTGTGACACGTGGCAGTTTA  
 GCAGCCACAAACAGAGATATGATGGAGAGATGCTCTACGTGGAATAACCTGAGGCCGTTAGATTT  
 GTGTTTCTCACTTTAAATAATAACCATTGGATGAGCTATCCATGCGAATCCC

**Figure 5** Nucleotide sequence (444 bp) of crinkly leaf pummelo from Chinat province is most similar to *Citrus chlorotic dwarf associated virus* from China



**Figure 6** The incision wound on the seedlings to transmit the crinkly leaf disease (A) Seedlings keep in the greenhouse to observe symptoms and transmission.



**Figure 7** Pummelo (Thong Dee cultivar) seeds and seedlings from infected tree (A) Vigor seeds (left), abortion seed (right); (B) Pummelo seedlings



**Figure 8** Pummelo seedlings (Thong Dee cultivar) from infected trees uninfected with crinkly leaf disease