การสำรวจ จำแนกและศึกษาอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis

Survey, Identification and Characterization of Chlorotic Ringspot on Phalaenopsis Orchid

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

Progress report

Characterization of chlorotic ringspot symptom on Phalaenopsis orchid, symptom of mosaic or chlorotic ring spot and sport on leaves were observed in orchid gardens in Chiang Mai and Lamphun provinces. The disease samples were collected and inoculated on differential host plant by mechanical inoculation. The results show that, chlorotic spot was observed on tobacco (*Nicotiana benthamiana*) leaves with inoculation then become to yellow necrotic spot and dead. For tomato (*Lycopersicon esculentum*), cape gooseberry (*Physalis minima*), bush bean (*Vigna sinensis*) and quinoa (*Chenopodium quinoa*) found that the lesion was enlarged to yellow spot and necrotic spot on leaves 15-20 days after inoculation. *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) was detected using electron microscope by Brandes' dip technique but virus particle was not found. In addition, RNA was extracted from Phalaenopsis orchid leaves which shown the disease symptom, including design and analysis of specific primers for molecular technique detection and analysis the sequence of nucleotides of the gene.

รหัสการทดลอง 03-30-60-01-01-02-04-60

รายงานความก้าวหน้า

ลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis พบลักษณะอาการด่างเหลืองหรือใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) และใบจุด (local lesion) ในสวนกล้วยไม้ที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน และเมื่อทำการเก็บตัวอย่างดังกล่าวมาทำการศึกษาบนพืชทดสอบ โดยปลูกเชื้อด้วยวิธี mechanical พบว่าในยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*) เกิดลักษณะอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อเป็นจุดเหลืองและตาย ส่วนมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), โทงเทง (*Physalis minima*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) พบแผลขยายเป็นวงสีเหลืองบนใบและเกิดอาการจุดตายบนใบภายหลังปลูกเชื้อได้ประมาณ 15-20 วัน และเมื่อทำการตรวจหาเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยเทคนิค Brandes' dip ผลปรากฏว่าไม่พบอนุภาคของเชื้อไวรัส และนอกจากนั้นได้ดำเนินการสกัด RNA จากตัวอย่างใบกล้วยไม้ Phalaenopsis ที่แสดงอาการ รวมทั้งทำการออกแบบและวิเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่อไป

คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกและนำเข้าต้นกล้วยไม้เพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ สำหรับประเทศที่นำเข้าต้นกล้วยไม้จากไทยส่วนใหญ่นำไปประดับ มีส่วนน้อยที่นำไปเป็นต้นพันธุ์ แต่การนำเข้าของผู้ปลูกเลี้ยงในประเทศไทยจะนำพันธุ์ที่แปลกใหม่มาเป็นต้นพันธุ์ขยายพันธุ์ด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ การนำต้นที่ติดเชื้อไวรัสเข้ามาโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัสที่ไม่เคยมีมาก่อนในประเทศไทยย่อมมีผลกระทบโดยตรงต่อการเพิ่มและแพร่ กระจายโรคไวรัสที่ติดมากับต้นพันธุ์ ส่วนที่นำต้นพันธุ์เข้ามาเพื่อผสมพันธุ์แม้เชื้อจะไม่ถ่ายทอดทางเมล็ด แต่เป็นการนำต้นกล้วยไม้ที่มีเชื้อไวรัสมาปะปนอยู่ในแหล่งปลูก จากการสำรวจตั้งแต่ปี พ.ศ. 2545-2550 ตรวจพบโรคไวรัสที่เกิดจากเชื้อไวรัส CyMV ในกล้วยไม้ลูกผสมสกุลหวาย (Dendrobium), สกุลแวนด้า (Vanda), สกุลสาวน้อยเต้นระบำ (Oncidium), แกรมมาโตไฟลัม (Grammatophyllum) และสกุลฟาแลนอพซีส (Phalaenopsis) ในอัตราตั้งแต่ 30-100 เปอร์เซ็นต์ในทุกพันธุ์ ORSV ถูกตรวจพบในกล้วยไม้สกุลต่างๆในอัตราที่น้อยกว่า CyMV พบเฉลี่ยประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ แต่มีผลกระทบรุนแรงมากกว่าต่อปริมาณผลผลิตของดอกและคุณภาพของช่อดอกทำให้สกุล Vanda มีอาการเนื้อเยื่อตายเป็นแผลรูปวงแหวนแล้วเปลี่ยนเป็นแผลสีดำบนใบทั้งต้น สกุล Oncidium เป็นพันธุ์ที่ตรวจพบเชื้อ ORSV ในอัตราสูงกว่ากล้วยไม้สกุลอื่นๆ มีอาการรุนแรงใบเรียวเล็กเหลือแต่เส้นกลางใบและมีใบด่างร่วมด้วย (สุรภี, 2536) และปัจจุบันได้มีการตรวจพบอาการด่างเหลืองเป็นวง (chlorotic ringspot) บนใบของกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ในบางแหล่งปลูกของประเทศซึ่งจากรายงานของ Zheng *et. al* (2008) พบว่ามีสาเหตุมาจากเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) และมีการระบาดในประเทศไต้หวัน ซึ่งเป็น

แหล่งนำเข้ากล้วยไม้ของประเทศไทย สำหรับประเทศไทยยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัสชนิดนี้ในกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ดังนั้น จึงควรทำการสำรวจ จำแนกและศึกษาลักษณะอาการดังกล่าวบนกล้วยไม้ เพื่อจัดทำเป็นข้อมูลปัจจุบัน ทำให้ได้ข้อมูลของการเป็นโรคและความเสียหายของต้นกล้วยไม้ในแหล่งปลูก เพื่อกำหนดแนวทางในการควบคุมอัตราการเป็นโรคหรือลักษณะอาการดังกล่าว รวมทั้งทำให้ทราบถึงชนิด ลักษณะอาการและการควบคุม ทั้งยังเป็นการเฝ้าระวังการเกิดและการแพร่ระบาดในประเทศไทย

มีรายงานการตรวจพบเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus ในกล้วยไม้อยู่หลายชนิดได้แก่ *Bean yellow mosaic virus*, *Clover yellow vein virus*, Dendrobium mosaic potyvirus, Filamentous Orchid virus, Spiranthes mosaic virus, Turnip mosaic virus (Zettler *et al*., 1990) แล้วยังพบว่าพืชในตระกูล Orchidaceae หลายชนิดมีเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus เข้าทำลายได้ ได้แก่ Vanilla พบเชื้อ Vanilla mosaic potyvirus, Pecteillis mosaic potyvirus และ Habenaria พบเชื้อ Habenaria mosaic potyvirus รวมทั้ง Dendrobium พบเชื้อ Dendrobium mosaic potyvirus เข้าทำลายเป็นต้น และเชื้อไวรัสเหล่านี้สามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงเพลี้ยอ่อน ดังนั้น นอกเหนือจากเชื้อ CyMV และ ORSV แล้วยังมีเชื้อ OFV, TRSV และไวรัสในกลุ่มของ Potyvirus หลายชนิดดังกล่าวที่ถูกตรวจพบบนกล้วยไม้ Mackenzie (1998) ตรวจพบ Potyvirus ในกล้วยไม้ 33 ชนิด ด้วยวิธี RT-PCR ด้วยชุด primers ที่เฉพาะเจาะจงกับกลุ่ม Potyvirus ในส่วนของ SP6 หรือ T7 ลำดับเบสของ genome ของไวรัสที่แยกจากกล้วยไม้เป็นโรค 5 ตัวอย่างโดยส่วนใหญ่มีความสัมพันธุ์ใกล้กับ bean common mosaic group

Chang (1991) ได้สำรวจโรคไวรัสในกล้วยไม้ในประเทศเกาหลี จำนวน 640 ชนิด ใน 13 genera พบไวรัส หลายชนิด ได้แก่ *Orchid fleck virus* (OFV), *Cymbidium mosaic virus* (CyMV), *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Dendrobium mosaic virus* (DMV) และ Potyvirus พบทั้งที่เข้าทำลายกล้วยไม้เป็นเชื้อเดี่ยวและเข้าทำลายทีละ 2-3 เชื้อ

Chang (2007) แยกเชื้อ OFV ออกมาได้จากกล้วยไม้พันธุ์ Cymbidium, Dendrobium, Odontoglossum, Oncidium, Angulorea และ Pescatorea เชื้อ OFV มีพืชอาศัยหลายชนิด ได้แก่ ยาสูบใบใหญ่ ยาสูบใบเล็ก *Chenopodium amaranticolor* และถ่ายทอดด้วยวิธีการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นพืช อนุภาคของ OFV เป็นแบบ bacilliform ที่มีขนาดประมาณ 40 X 150 nm

Singh (2007) แยกเชื้อ Potyvirus ได้จากกล้วยไม้ป่าพันธุ์ Cymbidium pendulum และ *C. tigrinum* ที่เมือง Sikkim ทางเหนือของอินเดีย ตรวจสอบด้วยวิธี ELISA, RT-PCR และ Northern blot analysis การใช้ primer ที่มีความเฉพาะของ Potyvirus group พบว่าไวรัสนี้มีความสัมพันธุ์ใกล้กับ *Calanthe mild mosaic virus*

You-Xiu Zheng *et.al* (2008) พบว่าอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis มีสาเหตุมาจากเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) และจัดอยู่ในกลุ่ม tospovirus มีการระบาดในประเทศไต้หวัน

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

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- Ultra centrifuge
- Spectrophotometer
- ตู้แช่แข็ง -80°C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และตรวจสอบตัวอย่าง

สำรวจและเก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ที่มีอาการด่างเหลืองหรือใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) และใบจุด (local lesion) ในแปลงปลูกของเกษตรกรในพื้นที่ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำพูน และจังหวัดราชบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม-สิงหาคม 2560 และนำกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) และเพื่อนำไปทดสอบหาเชื้อในพืชทดสอบไวรัส

2. การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV)

2.1 ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างกล้วยไม้จากรังกล้วยไม้ ในแต่ละแหล่งปลูกที่เก็บรวบรวมในข้อ 1 มาตรวจสอบหาเชื้อไวรัส โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip โดยบดตัวอย่างใบพืชใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 บนแผ่นไสลด์ นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh (มีช่องสี่เหลี่ยม 300 ช่องต่อตารางนิ้ว) มาคว่ำลงบนน้ำคั้นทิ้งไว้ 1 นาที ใช้คีมคีบกริดขึ้นจากน้ำคั้น ซับส่วนที่เป็นของเหลวรอบกริด หยดน้ำกลั่นลงบนกริดเพื่อชะล้างสารโมเลกุลใหญ่ เช่น เกลือต่างๆ ออกไป ทำการย้อมสีแบบ negative staining ซึ่งเป็นการย้อมสีพื้นที่รอบๆ อนุภาคของเชื้อไวรัสด้วย 2% Phosphotungstic acid (PTA) นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.2 การสกัดและตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล

การตรวจหาเชื้อไวรัสและสังเคราะห์ cDNA ด้วยเทคนิค reverse transcription PCR (RT-PCR) สกัดอาร์เอ็นเอจากตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ chlorotic ringspot ตามวิธีของ You-Xiu Zheng *et.al* (2011) โดยนำตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการน้ำหนักประมาณ 15 กรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว เติม extraction buffer (45 ml ของ STE buffer (pH 6.8) และ 20 ml ของ 10% SDS; 0.1 ml ammonia solution; 0.8ml ของ 4% bentonite; 1 ml β-mercaptoethanol ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม chloroform-isoamylalcohol ปริมาตร 50 ml และสารละลาย Tris-saturated phenol (pH 6.8) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร นำไปกวนที่อุณหภูมิ 37°C นาน 45 นาที เมื่อกวนเสร็จนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างส่วนใสด้านบน และเติม 100% ethanol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 17% ทำการดูดซับ dsRNAs โดยเติม CF-11 cellulose จำนวน 2 กรัม นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37°C นาน 45 นาที ล้างด้วย STE buffer (pH 6.8) ที่ผสมกับ 16.5% ethanol ปริมาตร 100 ml ในคอลัมน์ dsRNAs จะถูกปล่อยออกมาอยู่ใน 10 ml ของ STE buffer (pH6.8) ทำการตกตะกอนด้วย ethanol และละลายตะกอนด้วย DEPC-treated water จากนั้นทำการวิเคราะห์ dsRNA ด้วยเทคนิค electrophoresis โดยใช้ 0.8% agarose gel เก็บ dsRNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -80°C สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

ทำการออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อโปรตีนใน ribosome ของไวรัสตรงยีนในส่วนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein gene) ของ *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ด้วยการสืบค้นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์และใช้โปรแกรม Oligonucleotide Properties ทำการออกแบบและวิเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจง เพื่อนำมาใช้ในการเพิ่มปริมาณ cDNA และตรวจสอบลักษณะอาการ chlorotic ringspot ในกล้วยไม้ phalaenopsis

2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

นำ cDNA product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับ Sequence หรือลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโน ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของทอสโพไวรัสที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูล Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)

3. การปลูกเชื้อบนพืชอาศัย

นำใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการมาปลูกเชื้อ โดยบดใบพืชให้ละเอียดผสมกับ 0.5M phosphate buffer pH 7.0 และผสมผงซีไลท์ (celite) ก่อนนำน้ำคั้นทาลงบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), โทงเทง (*Physalis minima*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

อย่างน้อย 1 เดือน โดยหมั่นสังเกตลักษณะอาการของพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2560 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และตรวจสอบตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างใบกล้วยไม้สกุล ฟาเลนอพซิส (*Phalaenopsis*) ที่แสดงลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ที่มีอาการด่างเหลืองหรือใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) และใบจุด (local lesion) จากแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน ราชบุรี ในระหว่างเดือนตุลาคม-พฤศจิกายน 2560 และนำกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาเชื้อหาเชื้อไวรัส

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis

2. ตรวจหาเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Tospovirus โดยตรวจหาเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes'dip โดยได้นำตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่พบลักษณะอาการ chlorotic ringspot มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลการตรวจยังไม่พบเชื้อไวรัสดังกล่าวในตัวอย่างกล้วยไม้ทั้งหมดที่นำมาตรวจ ซึ่งตามรายงาน Zheng *et al.* (2011) ได้ตรวจตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่มีลักษณะอาการ chlorotic ringspot ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ด้วยเทคนิค ultra-thin section สามารถตรวจพบเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ได้ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Tospovirus โดยมี particles ประมาณ 70-100 nm

3. การปลูกเชื้อบนพืชอาศัย

หลังนำใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการมาปลูกเชื้อ โดยบดใบพืชให้ละเอียดผสมกับ 0.5M phosphate buffer pH 7.0 ที่ผสม 2-mercaptoethanol อัตรา 0.2% ผสมผงซีไลท์ (celite) นำน้ำคั้นทาลงบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), โทงเทง (*Physalis minima*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) แล้วล้างใบพืชด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนปลูกพืชทดสอบควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25-28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 1 เดือน ซึ่งพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อแล้วเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ โดยลักษณะอาการที่พบเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีรายงานของ Zheng *et al.* (2008) ปรากฏอาการแรกเริ่มจะเป็นจุดบนใบและขยายออก ซึ่งพบว่ายาสูบใบใหญ่ (*Nicotiana benthamiana*) เกิดอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อตายเป็นจุด หลังปลูกเชื้อแล้ว 10-15 วัน มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) แสดงอาการจุดเหลือง เนื้อเยื่อตายเป็นจุด หลังปลูกเชื้อได้ 15-20 วัน โทงเทง (*Physalis minima*) จะแสดงอาการเริ่มแรกเป็นจุดเหลือง และขยายเป็นวง หลังปลูกเชื้อได้ 15-20 วัน ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) จะแสดงอาการเป็นจุดและขยายเป็นวงแหวนสีเหลืองบนใบที่ปลูกเชื้อ หลังปลูกเชื้อได้ 10-12 วัน และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) หลังปลูกเชื้อได้ 11-14 วัน จะมีอาการจุดแผลสีน้ำตาล (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่แสดงลักษณะอาการ chlorotic ringspot บนกล้วยไม้ Phalaenopsis นั้น ได้พบลักษณะอาการด่างเหลืองหรือใบซีด (chlorosis) เป็นวงแหวน (ring spot) และใบจุด (local lesion) ในสวนกล้วยไม้ที่จังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ส่วนในสวนที่จังหวัดราชบุรี ที่ได้ทำการสำรวจนั้นยังไม่พบลักษณะอาการดังกล่าว และเมื่อได้ทำการเก็บตัวอย่างดังกล่าวมาทำการศึกษาบนพืชทดสอบ โดยปลูกเชื้อด้วยวิธี mechanical บนต้นยาสูบ (*Nicotiana benthamiana*), มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*), โทงเทง (*Physalis minima*), ถั่วพุ่ม (*Vigna sinensis*) และคีโนโปเดียม (*Chenopodium quinoa*) พบว่า ในยาสูบเกิดลักษณะอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อและต่อมาเนื้อเยื่อเป็นจุดเหลืองและตาย ส่วนมะเขือเทศ โทงเทง ถั่วพุ่มและคีโนโปเดียม พบแผลขยายเป็นวงสีเหลืองบนใบและเกิดอาการจุดตายบนใบ ภายหลังปลูกเชื้อได้ประมาณ 15-20 วัน และเมื่อทำการตรวจหาเชื้อไวรัส *Capsicum chlorosis virus* (CaCV) ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลปรากฏว่ายังไม่พบอนุภาคของเชื้อไวรัส และนอกจากนั้นได้ดำเนินการสกัด RNA จากตัวอย่างใบกล้วยไม้ที่แสดงอาการ รวมทั้งทำการออกแบบและวิเคราะห์ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะเจาะจงเพื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล และนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนต่อไป

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.

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.