

การตรวจพบเชื้อไวรัสโรยด์โรคเตี้ยแคระเบญจมาศจากต้นเบญจมาศในแปลงปลูก  
**Detection of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from *Chrysanthemum*  
Plants in the Fields**

ฉมาภรณ์ เนตรวงศ์<sup>1/</sup> กนกมณี ต้นสุวรรณ<sup>1/</sup> คณิงนิตย์ เกรียงวรากร<sup>1/, 2/, 3\*</sup>  
Chamaporn Netwong<sup>1/</sup> Kanokmanee Tansuwan<sup>1/</sup> Kanungnit Reanwarakron<sup>1/, 2/, 3\*</sup>

Received 20 Oct 2019/Revised 3 Jan 2020/Accepted 30 Jan 2020

**ABSTRACT**

Twenty-three chrysanthemum samples showing stunting, chlorotic leaves, small and abnormal flowers were collected from the field grown plants in Wang Nam Khiao district, Nakhon Ratchasima province and determined for the presence of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) by using reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Eight samples produced DNA products of about 360 basepairs. Cloning and sequencing of these DNA fragments revealed 354 nucleotides in size. All of them were 100% identical, and were identified as *Chrysanthemum stunt viroid* based on criteria of 98-100% identity to CSVd accessions previously recorded in GenBank as AF394452, JQ685739, HQ891018, JX909290, JF414238, JF398538, Z68210, DQ094298, FN646407 and U82445. For bioassay, tomato cv. Rutgers and chrysanthemum plants were inoculated with sap from CSVd-infected plant. The Rutgers tomato were symptomless while chrysanthemum plants showed chlorosis, small leaves and leaf distortion. All these bioassayed plants were confirmed for CSVd infection by RT-PCR. This is the first report of CSVd natural infection of chrysanthemum in Thailand.

**Keywords** : Viroid, chrysanthemum, RT-PCR, Sequencing

<sup>1/</sup> ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>1/</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>2/</sup> ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

<sup>2/</sup> Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

<sup>3/</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานับพันทิศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

<sup>3/</sup> Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE). Bangkok 10900, Thailand

\* Corresponding author: agrknr@ku.ac.th

## บทคัดย่อ

เก็บตัวอย่างเบญจมาศที่แสดงอาการเตี้ยแคระ ใบซีดเหลือง ดอกมีขนาดเล็กและมีลักษณะผิดปกติจาก อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา จำนวน 23 ตัวอย่าง นำมาตรวจหาเชื้อ *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) ด้วยเทคนิค reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อ CSVd พบว่า มีเบญจมาศ 8 ตัวอย่าง ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 360 คู่เบส ทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอที่ได้ พบว่า ทุกตัวอย่างมีลำดับเบสยาว 354 นิวคลีโอไทด์ มีความเหมือนกัน 100% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ CSVd ในฐานข้อมูลของ GenBank (AF394452, JQ685739, HQ891018, JX909290, JF414238, JF398538, Z68210, DQ094298, FN646407 และ U82445) มีความเหมือนกัน 98-100% จึงจำแนกเชื้อที่พบเป็น *Chrysanthemum stunt viroid* เมื่อปลูกเชื้อ CSVd ลงบนมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ไม่พบอาการผิดปกติ แต่เมื่อปลูกเชื้อบนต้นเบญจมาศพบว่า มีอาการซีดเหลือง ใบมีขนาดเล็กกล และใบผิดปกติ และตรวจพบเชื้อ CSVd ในพืชทั้งสองชนิดด้วยเทคนิค RT-PCR งานวิจัยนี้นับเป็นการตรวจพบเชื้อ *Chrysanthemum stunt viroid* ในสภาพแปลงปลูกเบญจมาศเป็นครั้งแรกของประเทศไทย

**คำสำคัญ:** ไวรอยด์, เบญจมาศ, อาร์ที-พีซีอาร์, ลำดับเบส

## บทนำ

เบญจมาศเป็นไม้ตัดดอกที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ดอกเบญจมาศมีลักษณะที่หลากหลายและมีสีสันสวยงามมีอายุการใช้งานที่ยาวนาน การเพาะปลูกเบญจมาศให้ผลตอบแทนต่อพื้นที่สูง มีมูลค่าการผลิตติดอันดับ 1 ใน 4 ของการผลิตไม้ดอกทั่วโลกแต่ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกเบญจมาศลดลงจาก 1,205.59 ไร่ เหลือเพียง 390.31 ไร่ ตามทะเบียนเกษตรกร (ดวงกมลวรรณ, 2562) ผลผลิตเฉลี่ย 4,775 กก./ปี

(ดอกช่อ) รายได้ 169,875 บาท/ไร่/ปี รายได้สุทธิ 124,975 บาท/ไร่/ปี ในด้านตลาดการส่งออกเบญจมาศตัดดอกของประเทศไทยในปี 2560 ไทยมีการส่งออกปริมาณ 151,636 กก. คิดเป็นมูลค่า 5,523,278 ล้านบาท แต่ในปี 2561 การส่งออกลดลงเหลือเพียง 47,179 กก. คิดเป็นมูลค่า 2,086,277 ล้านบาท ประเทศไทยส่งออกไปมากที่สุด คือ เมียนมาร์ (ร้อยละ 97) ในขณะเดียวกันไทยก็มีการนำเข้าเบญจมาศตัดดอกจากประเทศมาเลเซีย ปริมาณ 4,858,474 กก. คิดเป็นมูลค่า 283,734,337 ล้านบาท ปัญหาและข้อจำกัดของประเทศไทยในการผลิตเพื่อตัดดอกเบญจมาศมาจากการที่เกษตรกรมักนิยมขยายพันธุ์จากต้นพ่อแม่พันธุ์เดิมอยู่เรื่อยๆ ทำให้ต้นอ่อนแอและมีโรคสะสม เช่น โรคราสนิม และโรคที่เกิดจากไวรัส ทำให้คุณภาพของดอกไม้ และไม่สม่ำเสมอ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2561) นอกจากนี้ ยังมีโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรอยด์ 2 ชนิด ได้แก่ *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) และ *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CCMVd) (Horst and Nelson, 1997; Bouwen and Zaayen, 2003) ซึ่งเชื่อดังกล่าวจัดอยู่ในวงศ์ *Pospiviroidae* และ *Avsunviroidae* ตามลำดับ และจัดเป็นเชื้อโรคพืชกักกันของหลายประเทศในแถบทวีปยุโรป ภายใต้คำสั่งของสหภาพยุโรป (Monger *et al.*, 2010) เชื้อ CSVd มีการแพร่ระบาดในธรรมชาติโดยการสัมผัส ในห้องปฏิบัติการถ่ายทอดได้โดยการทาน้ำคั้นพืชที่เป็นโรคนบนใบพืช การติดไปกับอุปกรณ์ตัดแต่งติดไปกับท่อนพันธุ์ และการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด (Hollings and stone, 1970 ; Bachelier *et al.*, 1976) เชื้อ CSVd ก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมาก ทำให้เบญจมาศมีลักษณะอาการ ต้นแคระแกร็น ใบมีจุดสีซีด ใบเสี้ยวรูปร่าง ใบและดอกมีขนาดเล็ก การเจริญของรากลดลง ในบางสายพันธุ์ก็เกิดอาการแคระแกร็นอย่างรุนแรง แต่บางสายพันธุ์ไม่แสดงอาการ นอกจากนี้ ยังมีเชื้อ *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) เป็นเชื้อโรค

พืชที่สำคัญอีกเชื้อหนึ่งที่จะเข้าทำลายเบญจมาศ ก่อให้เกิดความเสียหาย ซึ่งจะทำให้ใบเบญจมาศ มีลักษณะอาการต่างเหลือง จุดสีเหลืองอ่อน และมีขนาดเล็กลง แต่เชื้อ CChMVd พบก่อโรคกับเบญจมาศบางสายพันธุ์ (Cho *et al.*, 2013) ในการศึกษานี้ได้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่าง เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสของเบญจมาศในแปลงปลูก เพื่อจะได้ศึกษาหาวิธีการป้องกันกำจัดต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 1. ตัวอย่างพืชที่เป็นโรค

เก็บตัวอย่างใบเบญจมาศจากต้นพืชในแปลงเขตพื้นที่ อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา จำนวน 23 ตัวอย่าง ที่แสดงลักษณะอาการที่คาดว่าน่าจะเกิดจากเชื้อไวรัสได้แก่ ต้นเดี่ยวแคะใบซีดเหลือง ใบด่าง ใบม่วง ต้นโทรม และดอกมีขนาดเล็ก จากนั้น นำตัวอย่างใบเบญจมาศมาสกัดกรดนิวคลีอิกด้วยวิธี CTAB (ปรีเชษฐ, 2548)

### 2. วิธีตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส และหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ใช้เทคนิค reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR) เริ่มจากสังเคราะห์ cDNA ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้ไพรเมอร์ AtropaNad2.1a:5' GGACT CCTGACGTATACGAAGGATC 3' และ AtropaNad2.2b:5' AGCAATGAGATT CCCCAATATCAT 3' (Thompson *et al.*, 2003) จากนั้น ตรวจหาเชื้อ CSVd โดยใช้ไพรเมอร์ cCS1: 5' TTA GGA TTA CTC CTG TCT CGC AGG 3' และ hCS1: 5' ACA GGG TTT TCA CCC TTC CTT TAG 3' (ปรีเชษฐ, 2548) และตรวจหาเชื้อ CChMVd โดยใช้ไพรเมอร์ CChMVd\_\_RE294: 5'TGG GAC TGG CCC CAT CTC CCT TCT CC 3' และ CChMVd\_\_FW295: 5'GTC GGT TCG CTC TCG TAG TCA CAG CC 3' (Navarro and Flores, 1997)

ขั้นตอนแรก สังเคราะห์ cDNA ของเชื้อไวรัสด้วยวิธีการ reverse transcription (RT) ปฏิกริยาประกอบด้วยไพรเมอร์สาย C ความเข้มข้น 2 pmole ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ตัวอย่างอาร์เอ็นเอ 1.75 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้ 96°ซ. นาน 5 นาที 1 รอบ นำมาแช่น้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเติม reverse transcriptase buffer ความเข้มข้น 1X, dNTPs ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และเอนไซม์ reverse transcriptase ความเข้มข้น 100 ยูนิต แล้วจึงนำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยตั้งโปรแกรมการทำงานที่ 45°ซ. นาน 1 ชม. 15 นาที

ขั้นตอนที่สอง การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจาก cDNA ด้วยเทคนิค PCR นำ cDNA ที่สังเคราะห์ได้มาเพิ่มปริมาณปฏิกริยาซึ่งประกอบไปด้วย น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9.4 ไมโครลิตร, 10x PCR buffer 2.0 ไมโครลิตร, 25 mM MgCl<sub>2</sub> 0.8 ไมโครลิตร, 10 mM dNTPs 0.5 ไมโครลิตร, 2 pmol/l สาย C และสาย h อย่างละ 2.0 ไมโครลิตร, 5U/ITaq DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร และ cDNA 2.0 ไมโครลิตร นำเข้าเครื่อง thermal cycler โดยใช้อุณหภูมิสำหรับ pre-denature ที่ 94°ซ. นาน 3 นาที 1 รอบ, denaturing ที่ 94°ซ. นาน 40 วินาที, annealing ที่ 56°ซ. นาน 40 วินาที, extension ที่ 72°ซ. นาน 40 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย extension ที่ 72°ซ. นาน 7 นาที 1 รอบ นำผลผลิตที่ได้จากการทำ RT-PCR มาตรวจสอบขนาดของผลผลิตด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ 2% agarose gel ละลายใน 0.5X TBE buffer และนำไปผ่านสนามไฟฟ้าที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที จากนั้นนำ agarose gel ย้อมด้วย ethidium bromide เพื่อให้ดีเอ็นเอติดสี และนำไปดูแถบดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel Documentation UV-transilluminator จากนั้นโคลนดีเอ็นเอผลผลิตจาก PCR กับพลาสมิดพาหะ แล้วนำเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E.coli* สายพันธุ์ DH 5 $\alpha$  (ปรีเชษฐ, 2548) สกัดพลาสมิดแล้วส่ง

ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Sanger sequencing method (Sanger and Coulson, 1975) กับบริษัท Solgen (Korea) นำมาเปรียบเทียบกับเชื้อไวรอยด์ในฐานข้อมูลของ GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE__TYPE=BlastSearch)) วิเคราะห์ค่า Percent Identity Matrix ด้วยโปรแกรม Clustal Omega และวิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA X (Kumar et al., 2018)

### 3. การปลูกเชื้อ CSVd บนพืชทดสอบ (Bioassay)

วิธีการนี้เป็นการทดสอบทางชีวภาพของเชื้อไวรอยด์บนพืชอาศัย โดยเลือกพืชอาศัยที่เหมาะสมและการชักนำให้พืชแสดงอาการ (Legrand, 2015) เพื่อให้ทราบถึงเชื้อสาเหตุที่ทำให้พืชเกิดโรคอย่างแท้จริง โดยอาศัยหลักการของ Koch's postulate ในการศึกษาที่ใช้ RNA ที่สกัดจากตัวอย่างใบเบญจมาศที่ตรวจสอบแล้วว่า มีเชื้อ CSVd เป็นแหล่งของเชื้อ CSVd สำหรับการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล เตรียมเชื้อโดยผสมอาร์เอ็นเอ กับ 0.1M phosphate buffer pH 9.0 ในอัตราส่วน 1:1 (อย่างละ 25 ไมโครลิตร) พืชทดสอบที่ใช้ในขั้นแรก ได้แก่ ต้นมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers อายุ 1 เดือน ภายหลังปลูกเชื้อ CSVd CS 13-1 ให้กับมะเขือเทศแล้ว 4, 8 และ 12 สัปดาห์ สังเกตลักษณะอาการ และตรวจสอบการติดเชื้อ CSVd ด้วยเทคนิค RT – PCR จากนั้น ปลูกเชื้อบนพืชทดสอบขั้นที่สอง ได้แก่ ต้นเบญจมาศตัดดอก (คละสี) อายุ 1 เดือน เตรียมน้ำคั้นจากใบมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers ที่ติดเชื้อ CSVd โดยบดใบมะเขือเทศ 0.1 กรัม ใน 0.1M phosphate buffer pH 9.0 ปริมาตร 1 มล. ทาน้ำคั้นลงบนใบเบญจมาศที่ใช้ทดสอบ สังเกตลักษณะอาการและตรวจหาเชื้อ CSVd ด้วยเทคนิค RT – PCR ภายหลังปลูกเชื้อแล้ว 4, 8 และ 12 สัปดาห์

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. ตัวอย่างเบญจมาศ และการตรวจหาเชื้อ CSVd ด้วยเทคนิค RT-PCR

ลักษณะอาการต้นเบญจมาศที่เก็บมาจากแปลง ได้แก่ ต้นเตี้ยแคระ, ใบด่าง, ขอบใบสีแดง/ม่วง, ต้นโทรม, ใบซีด/เหลือง, ดอกอยู่ยี่เป็นต้น จากการใช้เทคนิค RT-PCR และไพรเมอร์ AtropaNad2.1a และ AtropaNad2.2b (Thompson et al., 2003) ตรวจสอบอาร์เอ็นเอ พบแถบดีเอ็นเอขนาด 188 คู่เบส ซึ่งแสดงว่าสกัดอาร์เอ็นเอได้ตามเป้าหมาย ผลการตรวจด้วยไพรเมอร์ มีความจำเพาะต่อเชื้อ CSVd พบแถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 360 คู่เบส จากเบญจมาศจำนวน 8 ตัวอย่าง ในขณะที่ผลการตรวจด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ CChMVd ไม่พบแถบดีเอ็นเอ

### 2. การจำแนกชนิดไวรอยด์และศึกษาความสัมพันธ์

ผลผลิตดีเอ็นเอจาก PCR ที่ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่า มีขนาด 354 คู่เบส ทั้ง 8 ตัวอย่าง (CS13-1, CS15-1, CS16-1, CS17-1, CS18-1, CS20, CS21-1 และ CS22-1) ซึ่งทั้งหมดมีค่า identity 100% (Table 1) และจากการใช้โปรแกรม Clustal Omega พบว่า มีความเหมือนกัน 98.31-99.72% กับเชื้อ CSVd ไอโซเลต K1 (AF394452), CSVd6 (JQ685739), H5-1 (HQ891018), 2214-BR(JX909290), CSVd 37(JF414238), AF164 (JF938538), CSVd Ageratum (Z68201), CSVd-Vm (DQ094298), Petunia isolate (U82445), และ Palampur (FN646407) (Table 2) ซึ่งโดยทั่วไปในการจำแนกเชื้อไวรอยด์จะพิจารณาจากค่า identity หากอยู่ในระดับสูงกว่า 90% ขึ้นไป จะจัดเป็นไวรอยด์ชนิดเดียวกัน จึงสรุปได้ว่าเชื้อไวรอยด์ทั้ง 8 ไอโซเลต ที่ศึกษาครั้งนี้เป็นเชื้อ *Chrysanthemum stunt viroid*

ผลการศึกษา Phylogenetic tree โดยใช้เชื้อ CChMVd (HQ891017), CLVd

(AM698094) และ *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (HQ284030) มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ร่วมกับไวรอยด์ชนิด CSVd พบว่า เชื้อ CSVd แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มี 2 กลุ่มย่อย กลุ่มย่อยแรกจัดว่ามีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุดประกอบด้วยเชื้อ CSVd ทั้ง 8 ไอโซเลตที่ได้จากเบญจมาศ ในการศึกษาครั้งนี้ รวมทั้งเชื้อ CSVd ที่พบในเบญจมาศ (*Chrysanthemum* และ *Dendranthema*) ได้แก่ ไอโซเลต K1 (เกาหลี), H5-1 (จีน) และ P4-1 (ญี่ปุ่น) ไอโซเลตที่ได้จากพืชอาศัยอื่น ได้แก่ CSVd6 (อิตาลี) และ AF164 (ฝรั่งเศส) กลุ่มย่อยที่ 2 ประกอบด้วยเชื้อ CSVd ไอโซเลต Palampur (อินเดีย) และ 2214-BR (บราซิล) ที่พบในเบญจมาศ และไอโซเลตที่พบในพืชอาศัยอื่น ได้แก่ CSVd *Ageratum* (เยอรมนี), CSVd-Vm (แคนาดา), CSVd 37 (ออสเตรเลีย) และ CSVd *Petunia* (สหรัฐอเมริกา) กลุ่มที่ 2 สำหรับเชื้อไวรอยด์อีกสามชนิดที่นำมา

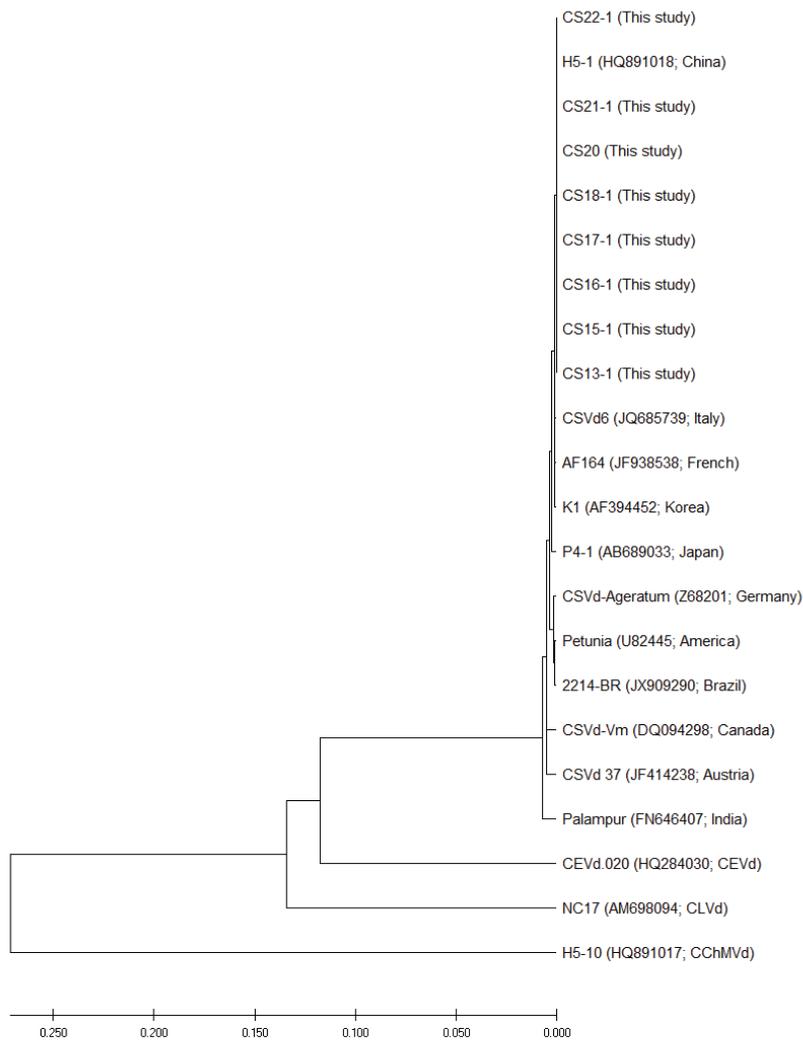
เปรียบเทียบ ได้แก่ เชื้อ CEVd (CEVd.020), เชื้อ CLVd (NC17), เชื้อ CChMVd (H5-10) จับกลุ่มกันแยกออกจากเชื้อ CSVd (Figure 1) เชื้อ CSVd ที่ศึกษาพบในครั้งนี้นี้มีความสัมพันธ์กับเชื้อ CSVd ที่ปรากฏในหลายประเทศ ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อ CSVd ตรวจพบในแปลงปลูกธรรมชาติในประเทศไทย ซึ่งไม่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทยมาก่อน น่าจะเป็นการติดมากับเมล็ดพันธุ์นำเข้าของทั้งเบญจมาศและไม้ดอกไม้ประดับอื่น ๆ ที่เป็นพืชอาศัยของเชื้อ เนื่องจาก เชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ (Cho *et al.*, 2013) การศึกษาในครั้งนี้ มีความสำคัญต่อการผลิตเบญจมาศและไม้ดอกไม้ประดับอื่น ๆ เพราะเชื้อ CSVd สามารถแพร่ระบาดสู่พืชเศรษฐกิจชนิดอื่น ๆ และก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิต เช่น มะเขือเทศ พริก และมันฝรั่ง เป็นต้น (Yoon *et al.*, 2014; Mutsushita, 2013) ซึ่งควรมีการตรวจติดตามและป้องกันกำจัดอย่างถูกวิธีต่อไป

**Table 1** Viroid sequence of various isolates from GenBank used for comparison with CSVd isolates in this study

Viroid isolate	Viroid Species	Accession number	Genome size (nt)	Host, Origin	Reference
K1	CSVd	AF394452	354	<i>Dendranthema grandiflorum</i> cv. Chunkwang, Korea	Chung <i>et al.</i> , 2001
H5-1	CSVd	HQ891018	354	<i>Chrysanthemum</i> , China	Zhang <i>et al.</i> , 2011
CSVd6	CSVd	JQ685739	354	<i>Argyranthemumfrutescens</i> cv. Meteor red, Italy	Torchetti <i>et al.</i> , 2012
CSVd- Ageratum	CSVd	Z68201	354	<i>Ageratum</i> , Germany	Henkel and Saenger, 1995
CSVd-Vm	CSVd	DQ094298	355	<i>Vinca major</i> , Canada	Nie <i>et al.</i> , 2005
AF164	CSVd	JF938538	355	<i>Argyranthemumfrutescens</i> (cultivar Buttery), France	Marais <i>et al.</i> , 2011
CSVd 37	CSVd	JF414238	354	<i>Solanum jasminoides</i> , Austria	Grausgruber-Groeger and Gottsberger, 2012
<i>Petunia</i> isolate	CSVd	U82445	355	<i>Petunia X hybrida</i> cv. Surnia purple, USA	Verhoeven <i>et al.</i> , 1998
Palampur	CSVd	FN646407	355	<i>Chrysanthemum</i> sp., India	Walia <i>et al.</i> , 2014
P4-1	CSVd	AB689033	354	<i>Chrysanthemum x morifolium</i> Ramat., Japan	Nabeshima <i>et al.</i> , 2012
2214-BR	CSVd	JX909290	354	<i>Dendranthema grandiora</i> , Brazil	Gobatto <i>et al.</i> , 2014
NC17	CLVd	AM698094	368	Tomato, Thailand	Marat <i>et al.</i> , 2007
H5-10	CChMVd	HQ891017	399	<i>Chrysanthemum</i> , China	Zhang <i>et al.</i> , 2011
CEVd.020	CEVd	HQ284030	371	Citrus tree, China	Xu <i>et al.</i> , 2012

**Table 2** Percentage identity of *Chrysanthemum stunt viroid* nucleotide sequences in this study with other isolates from GenBank

Viroid isolate	% Identities																							
	H5-10	NC17	CEVD.020	Palampur	CSVd-Vm	CSVd	CSVd-Ageratum	Petunia	2214-BR	P4-1	K1	CSVd6	AF164	CS13-1	CS15-1	CS16-1	CS17-1	CS18-1	CS20	CS21-1	CS22-1	H5-1		
H5-10	100	42.76	44.59	54.86	54.69	55.17	55.66	55.49	55.49	57.14	55.17	55.8	55.31	55.49	55.49	55.49	55.49	55.49	55.49	55.49	55.49	55.49	55.49	55.49
NC17		100	63.61	70.66	72.16	72.16	72.07	72.46	72.46	70.68	72.16	72.16	72.46	72.46	72.46	72.46	72.46	72.46	72.46	72.46	72.46	72.46	72.46	72.46
CEVD.020			100	73.57	74.17	75.08	74.17	74.77	74.77	73.49	75.08	74.47	74.85	74.77	74.77	74.77	74.77	74.77	74.77	74.77	74.77	74.77	74.77	74.77
Palampur				100	97.18	97.74	97.17	97.46	97.74	98.14	98.59	98.02	98.02	98.31	98.31	98.31	98.31	98.31	98.31	98.31	98.31	98.31	98.31	98.31
CSVd-Vm					100	98.31	98.3	98.02	98.31	98.51	98.59	98.59	98.59	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87
CSVd						100	97.73	98.02	98.31	98.51	99.15	98.59	98.59	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87
CSVd-Ageratum							100	99.72	99.43	98.51	98.58	98.58	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87	98.87
Petunia								100	99.72	98.88	98.87	98.87	99.15	99.15	99.15	99.15	99.15	99.15	99.15	99.15	99.15	99.15	99.15	99.15
2214-BR									100	99.26	99.15	99.15	99.44	99.44	99.44	99.44	99.44	99.44	99.44	99.44	99.44	99.44	99.44	99.44
P4-1										100	99.63	99.26	99.26	99.26	99.26	99.26	99.26	99.26	99.26	99.26	99.26	99.26	99.26	99.26
K1											100	99.44	99.44	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72
CSVd6												100	99.44	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72
AF164													100	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72	99.72
CS13-1														100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CS15-1															100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
CS16-1																100	100	100	100	100	100	100	100	100
CS17-1																	100	100	100	100	100	100	100	100
CS18-1																		100	100	100	100	100	100	100
CS20																			100	100	100	100	100	100
CS21-1																				100	100	100	100	100
CS22-1																					100	100	100	100
H5-1																						100	100	100



**Figure 1** Phylogenetic tree as reconstructed by MEGA X showing genetic relationship of *Chrysanthemum stunt viroid* in this study (isolate CS13-1,CS15-1,CS16-1,CS17-1,CS18-1,CS20, CS21-1 and CS22-1) to other isolates from Genbank database (isolate CSVdH5-1, CSVd6, AF164, CSVd 37, Palampur, K1, CSVd-Vm, 2214-BR, CSVd-Ageratum Petunia and P4-1) as well as other viroids (H5-10, NC17 and CEVd.020)

### 3. การปลูกเชื้อ CSVd บนพืชทดสอบ (Bioassay)

ผลจากการทดสอบ พบว่า หลังการปลูก เชื้อนาน 3 เดือน ไม่พบลักษณะอาการที่เกิดขึ้น บนมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers แต่พบแถบตีเอ็นเอ ขนาดประมาณ 360 คู่เบสของเชื้อ CSVd ใน สัปดาห์ที่ 4 ในมะเขือเทศพันธุ์ Rutgers สำหรับการปลูกเชื้อ CSVd โดยใช้น้ำคั้นจากใบมะเขือเทศ พันธุ์ Rutgers ที่ติดเชื้อ CSVd พบว่า ต้นเบญจมาศ ตัดดอก (คละสี) ที่ติดเชื้อ CSVd แสดงลักษณะ อาการใบมีขนาดเล็กลง ใบผิดปกติในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 และในสัปดาห์ที่ 12 พบอาการใบซีดเหลือง เมื่อเปรียบเทียบกับต้นปกติที่ไม่ได้รับการปลูกเชื้อ

(Figure 2) และผลการตรวจสอบเชื้อ CChMVd ในตัวอย่างเบญจมาศที่ได้รับการปลูกเชื้อ ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CChMVd ไม่พบแถบ ตีเอ็นเอของเชื้อ CChMVd มีรายงานเบญจมาศ พันธุ์ Mistletoe ที่ติดเชื้อ CSVd แสดงลักษณะ chlorotic flecking และเป็นจุด ๆ บนใบ (Mutsushita, 2013) และพันธุ์ Bonnie Jean ที่ติดเชื้อ CSVd แสดงลักษณะเตี้ยแคระ และจุด เหลืองซีดขนาดใหญ่ (Yoon *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตาม การแสดงอาการบนพืชของเชื้อขึ้นกับสายพันธุ์เชื้อ สายพันธุ์พืชที่นำมาทดสอบ สภาพแวดล้อม และความเข้มแสง (Mutsushita, 2013)



**Figure 2** CSVd-inoculated chrysanthemum plants 4 and 8 weeks showed small leaves and leaf distortion (B,D), 12 weeks showed chlorosis (F) post inoculation, compared with uninoculated plants, A, C, E at 4, 8 and 12 weeks, respectively

### สรุปผลการทดลอง

ตัวอย่างเบญจมาศที่แสดงอาการคล้ายเกิดจากเชื้อไวรัสจำนวน 23 ตัวอย่าง จาก อ.วังน้ำเขียว จ.นครราชสีมา เมื่อนำมาตรวจหาเชื้อ *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) ด้วยเทคนิค RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CS-1 ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ CSVd จากนั้นทำการโคลนยีนและวิเคราะห์ลำดับเบส พบว่า 8 ตัวอย่าง มีเชื้อไวรัสที่มีขนาดจีโนมยาว 354 คู่เบส มีความเหมือนกันกับเชื้อ CSVd จากฐานข้อมูลใน GenBank ที่ระดับสูงกว่า 90% แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัส

ทั้ง 8 ไอโซเลต เป็นเชื้อ *Chrysanthemum stunt viroid* เมื่อตรวจสอบการก่อโรคของเชื้อ CSVd โดยปลูกเชื้อด้วยวิธีทาน้ำคั้นจากใบพืชเป็นโรคลงบนเบญจมาศ พบว่า เบญจมาศแสดงอาการใบเล็กลง ใบผิดปกติ และขีดเหลือง

### คำขอขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

จ.นครปฐม ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม

### เอกสารอ้างอิง

ดวงกมลวรรณ กบกันทา. 2561.เบญจมาศตัดดอก. แหล่งที่มา: <http://www.agriman.doae.go.th/home/news/2562/75-76.pdf> (สืบค้น: 16 ธันวาคม 2562)

ปรีเชษฐ ตั้งกาญจนภาสน์. 2548. การตรวจสอบเชื้อไวรอยด์ในแปลงผลิตเมล็ดพันธุ์มะเขือเทศในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 85 หน้า

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2561. วว. เปิดตัวเบญจมาศสายพันธุ์ใหม่ที่มีศักยภาพต้านทานโรคแห่งแรกของไทย. แหล่งที่มา:<https://klc.tistr.or.th/tistr/newsboard/shownews.php?Category=newsboard&No=1091> สืบค้น: 17 ธันวาคม 2562

Bachelier, J.C.,M.Monsion and J. Dunez. 1976.Possibilities of improving detection of chrysanthemum stunt and obtention of viroid-free plants by meristem tip culture. *Acta Horticulturae*. 59: 63-69.

Bouwen, I. and A. Van Zaayen. 2003. *Chrysanthemum stunt viroid*. Page: 218-223 In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Semancik, J.S. (Eds.), *Viroids*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.

Chung, B.N., G.S. Choi, H.R. Kim and J.S. Kim. 2001. *Chrysanthemum Stunt Viroid* in *Dendranthema grandiflorum*, *J. Plant Pathol.* 17: 194-200.

Cho, W.K., Y Jo , K-M. Jo and K-H. Kim. 2013. A current overview of two viroids that infect chrysanthemums: *chrysanthemum stunt viroid*

and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*. *Viruses*. 5: 1099-1113.

Gobatto, D., A.L.R. Chaves, R. Harakava, J.M. Marque, J.A. Daro`s and M. Eiras. 2014. *Chrysanthemum stunt viroid* in Brazil: survey, identification, biological and molecular characterization and detection methods. *J. Plant Pathol.* 96: 111-119.

Grausgruber-Groeger, S. and R.A. Gottsberger. 2012. First report of *Tomato apical stunt viroid* and *Chrysanthemum stunt viroid* in *Solanum jasminoides* in Austria. *New Dis. Rep.* 24: 4.

Henkel, J. and H. Saenger. 1995. *Chrysanthemum stunt viroid* DNA (isolate CSVd-Ageratum). Journal Unpublished. (Accession No. Z68201)

Hollings, M. and O.M. Stone. 1970. Attempts to eliminate chrysanthemum stunt from chrysanthemum by meristem-tip culture after heat treatment. *Ann. Appl. Biol.* 65: 311-315.

Horst, R.K. and P.E. Nelson. 1997. *Compendium of Chrysanthemum Diseases*. USA. The American Phytopathological Society.

Kumar S., G. Li M. Stecher, C. Knyaz and K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35: 1547-1549.

Legrand, P. 2015. Biological assays for plant viruses and other graft-transmissible pathogens diagnoses: a review. *EPPO Bulletin*. 45: 240-251.

Marais, A., C. Faure, J-M. Deogratias and T. Candresse. 2011. First report of *Chrysanthemum stunt viroid* in various cultivars of *Argyranthemum*

- frutescens* in France. *Plant Dis.* 95: 9: 1196.
- Marat, S., K. Reanwarakorn and P. Tangkanchanapas. 2007. *Columnea latent viroid*, isolate NC17, complete genome. Accession No. AM698094. Available at: <http://www.dpvweb.net/dpv/showseq.php?seq=am698094> Accessed: 13 July, 2562
- Matsushita, Y. 2013. *Chrysanthemum stunt viroid*. *Jap. Agric. Res. Quart.* 47(3): 237-242.
- Monger, W., J. Tomlinson, N. Boonham, M.V. Marn, I.M. Plesko, V. Molinero-Demilly, X. Tassus, E. Meekes, M. Toonen and L. Papayiannis. 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *J. Virol.Methods.* 169: 207–210.
- Nabeshima, T., M. Hosokawa, S. Yano, K. Ohishi and M. Doi. 2012. Screening of chrysanthemum cultivars resistant to *Chrysanthemum stunt viroid*. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 81(3): 285–294.
- Navarro B. and R. Flores. 1997. *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*: unusual structural properties of a subgroup of viroids with hammer head ribozymes. Page: 11262-11267 *In:Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 94.
- Nie, X., R.P. Singh and H. Bostan. 2005. Molecular cloning secondary structure and phylogeny of three pospiviroids from ornamental plant. *J. Plant Pathol.* 27:592-206.
- Sanger, F. and A.R. Coulson. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94(3): 441-448.
- Thompson, J.R., S. Wetzel, M.M. Klerks, D. Vaskova, C.D. Schoen, J. Spak and W. Jelkmann. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *J. Virol. Methods.* 111: 85–93.
- Torchetti, E.M., B. Navarro, V.N. Trisciuzzi, L. Nuccitelli, M.R. Silletti and F.D. Serio. 2012. First report of *Chrysanthemum stunt viroid* in *Argyranthemum frutescens* in Italy. *J. Plant Pathol.* 94: 2.
- Verhoeven, J.Th.J., M.S.J. Arts, R.A. Owens and J.W. Roenhurst. 1998. Natural infection of petunia by *Chrysanthemum stunt viroid*. *Euro. J. Plant Pathol.* 104: 383-386.
- Walia, Y., S. Dhir, R. Ram, A.A. Zaidi and V. Hallan. 2014. Identification of the herbaceous host range of *Apple scar skin viroid* and analysis of its progeny variants. *J. Plant Pathol.* 63: 684–690.
- Xu, W., F. Bolduc, N. Hong and J-P. Perreault. 2012. The use of a combination of computer-assisted structure prediction and SHAPE probing to elucidate the secondary structures of ve viroids. *Molecular Plant Pathology.* 13(7): 666–676
- Yoon, J., E. Baek and P. Palukaitis. 2012. Are there strains of *Chrysanthemum stunt viroid* ?. *J. Plant Pathol.* 94(3):697–701.
- Yoon J-Y, I-S. Cho, G-S. Choi and S-K. Choi. 2014. Construction of infectious cDNA clone of a *chrysanthemum stunt viroid* Korean isolate. *Plant. Pathol. J.* 30(1):68-74.
- Zhang, Z.Z., S. Pan and S.F. Li. 2011. First Report of *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* in Chrysanthemum in China. *Plant Dis.* 95(10): 13