1346 14650

วิทยาลัยสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสใบด่างของไม้สกุล Dieffenbachia sp.

Identification of mosaic disease in Dieffenbachia sp.

โดย

นางสาวจินตนา สุกานดา

T098935

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา .....

(อาจารย์ ดร.นวลพรรณ งามยี่สุน)

วันที่ ....

แขหมู่.....
เลขทะเบียน 98935
วัน เดือน ปี .....

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช .....

(อาจารย์ สำเริง คำทอง)

วันที่.....

ปพ.
จ4821
2537

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ ดร. นวลพรรณ งามยิ่งสุน อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จเรียบร้อยและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยาที่ได้ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ

ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในด้านปัจจัยต่างๆ ตลอดจนขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องช่วยเป็นกำลังใจและให้การช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

จินตนา สุกานตา

มีนาคม 2538

ชื่อเรื่อง การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสใบด่างของไม้สกุล Dieffenbachia sp.

Identification of mosaic disease in Dieffenbachia sp.

โดย นางสาวจินตนา สุกานดา

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต(เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

คณะ เทคโนโลยีการเกษตร

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.นวลพรรณ งามยิ่สุ่น

บทคัดย่อ

จากการสำรวจไม้ประดับในวงศ์ Dieffenbachia sp. มักมีอาการใบด่างคล้ายลักษณะอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส โดยพันธุ์ "Compestra" จะแสดงอาการด่างจางๆ ระหว่างเส้นใบและทั่ว ๆ ไปบนใบเป็นอาการด่างที่ไม่ชัดเจน อาจมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น ขอบใบม้วนขึ้น พันธุ์" Rudolph Roehrs" แสดงอาการด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน และด่างเป็นจุด ๆ ถ้ายกใบขึ้นส่องดูกับแสงจะเห็นได้ชัดเจนและพันธุ์ "Snowdrop" แสดงอาการด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน และพบอาการ vein clearing เส้นใบมีสีซีดลง พบมีอาการใบหงิกเป็นคลื่นร่วมด้วย จึงได้มีการศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุโดย ทดสอบปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย โดยวิธี mechanical sap transmission ไม่ปรากฏอาการเข้าทำลายของเชื้อบนพืชอาศัยที่ใช้ทดสอบ การตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา (serology) ด้วยวิธี Agar - gel double diffusions test ระหว่างแอนติซีรัมที่ใช้คือ dasheen mosaic virus (DMV) และ tobacco mosaic virus (TMV) กับแอนติเจนคือน้ำคั้นใบพืชที่เป็นโรคทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองไม่เกิดปฏิกริยาระหว่างแอนติซีรัมและแอนติเจน และวิธีตรวจดูผลึก (inclusions body)ของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์พบผลึก 2 ชนิด

คือ ผลึกรูปเข็ม (needle crytalline) และผลึกรูปคล้ายดาว (amorphous cytoplasmic inclusions)

จากการตรวจสอบใบพืชที่เป็นโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนด้วยวิธี leaf dip method พบอนุภาคของเชื้อไวรัสลักษณะคดงอ ขนาด 650-700 นาโนเมตร เมื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิค immunosorbent electron microscopy (ISEM) พบอนุภาคไวรัสจากใบพืชเป็นโรคในสกุล Dieffenbachia sp.พันธุ์ "Compestra" และ พันธุ์ "Snowdrop" ทำปฏิกริยากับเชื้อ DMV ในขณะที่อนุภาคไวรัสจากใบพืชพันธุ์ "Rudolph Roehrs"ไม่ทำปฏิกริยากับแอนติซีรัมดังกล่าว

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ก
สารบัญภาพ	ข
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	7
ผลการทดลอง	19
สรุปผลการทดลองและวิจารณ์	25
เอกสารอ้างอิง	27

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของพืชอาศัยและเวลาเมื่อใช้ทดลอง 15

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงอาการใบด่างของพืชสกุล Dieffenbachia sp.
พันธุ์ "Compestra" 11

ภาพที่ 2 แสดงอาการใบด่างของพืชสกุล Dieffenbachia sp.
พันธุ์ "Rudolph Roehrs" 12

ภาพที่ 3 แสดงอาการใบด่างของพืชสกุล Dieffenbachia sp.
พันธุ์ "Snowdrop" 13

ภาพที่ 4 ก.แสดงลักษณะภายในของเซลพืชปกติของพันธุ์ "Compestra"
ข.แสดงลักษณะ inclusions body แบบรูปเข็ม
(needle crystalline) ที่พบในใบพืชเป็นโรค 21

ภาพที่ 5 ก.แสดงลักษณะภายในของเซลพืชปกติของพันธุ์ "Rudolph Roehrs"
ข.แสดงลักษณะ inclusion body แบบรูปเข็ม และรูปดาว
ที่พบในใบพืชเป็นโรค 22

ภาพที่ 6 ก.แสดงลักษณะภายในของเซลพืชปกติของพันธุ์ "Snowdrop"
ข.แสดงลักษณะ inclusions body แบบ amorphous
cytoplasmic inclusions ที่พบในใบพืชเป็นโรค 23

ภาพที่ 7 การตรวจสอบดด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน 24
ก.อนุภาคเชื้อไวรัส จากน้ำคั้นพืชพันธุ์ "Rudolph Roehrs"
ข.อนุภาคเชื้อไวรัส จากน้ำคั้นพืชพันธุ์ "Snowdrop"

คำนำ

สาวน้อยประแป้ง (Dumb Cane) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Dieffenbachia sp. เป็นไม้ใบที่นิยมปลูกกันเป็นไม้กระถางกันมากทั่วไปในเขตร้อน ใช้ประดับภายในอาคารและนอกอาคาร ส่วนมากชอบขึ้นอยู่ในที่ร่ม เป็นไม้ในร่ม (indoor plant) มีถิ่นกำเนิดจากประเทศในเขตร้อนทั่ว ๆ ไป ในอเมริกาใต้ และหมู่เกาะอินดิสตะวันตก

คำว่า Dieffenbachia เป็นชื่อที่ได้รับเกียรติมาจาก J.F. Dieffenbach นักพฤกษศาสตร์ชาวเยอรมัน Dieffenbachia อยู่ในตระกูล Arum หรือ Family Araceae ลักษณะของต้นเป็นไม้กอ อวบน้ำ ไม่มีเนื้อไม้ ลำต้นกลม และสูงประมาณ 4 ฟุต ใบใหญ่เป็นใบเดี่ยว (simple leaf) มีจุดหรือมีสีสันสลับเป็นลายขาวครีม บนพื้นใบสีเขียว มีกาบใบห่อหุ้มลำต้นอยู่ เนื่องจากมีจุดขาว ๆ ประเต็มใบที่มีพื้นสีเขียว ไทยจึงเรียกว่า สาวน้อยประแป้ง จีนเรียกว่า บ้วนยี่แช ในประเทศไทยมีหลายสิบชนิด ที่มีชื่อเป็นภาษาไทย ตั้งชื่อตามรูปร่างลักษณะของแต่ละต้น

สาวน้อยประแป้งเป็นพืชที่ปลูกง่าย โตเร็ว และการดูแลรักษาไม่ยุ่งยาก ปลูกได้ทุกภาคทั่วประเทศ กล่าวได้ว่าเป็นไม้ประดับที่สำคัญชนิดหนึ่ง จากการสำ--รวจในแหล่งที่มีการปลูกบางแห่งพบโรคที่สำคัญ คือโรคที่เกิดจากเชื้อรา เนื่องจากการระบายน้ำไม่ดีพอ ควรเก็บความชื้นได้ ไม่ขังน้ำจนเกินไป ในหน้าหนาวต้องรดน้ำน้อยลงเพราะอาจจะเกิดเชื้อราที่มากับความหนาวได้ และยังพบโรคใบด่างแพร่ระบาดอยู่ทั่วแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบ คือ ใบแสดงอาการด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ถ้ายกใบขึ้นส่องดูกับแสงจะเห็นได้ชัดเจน อาการ

ด่างจางๆ ระหว่างเส้นใบเป็นอาการด่างที่ไม่ชัดเจน อาการ vein clearing เส้นใบจะมีสีซีดลง อาจมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น ขอบใบม้วนขึ้น เส้นใบนูน ใบย่น ใบหงิกเป็นคลื่น ซึ่งโรคใบด่างจากเชื้อไวรัสนี้ เป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายให้กับพืช ซึ่งเป็นไม้ประเภทตัดใบเพื่อการค้า ทำให้สูญเสียมูลค่าของผลผลิต ซึ่งมีทั้งตลาดทั้งในและนอกประเทศ

ตลาดในประเทศ Dieffenbachia ตลาดภายในประเทศยังมีความนิยมอยู่มาก โดยเฉพาะพันธุ์ "Tropic snow" และ "Snowdrop" โดยใช้เป็นไม้ประดับภายในอาคารที่ดีต้นหนึ่ง แต่การผลิตของเกษตรกรขาดความสม่ำเสมอของขนาดถ้ามีการปรับปรุงการผลิตให้มีขนาดสม่ำเสมอความต้องการของตลาดจะเพิ่มมากขึ้น ส่วนมากเกษตรกรจะนำไม้ขนาดนี้ลงกระถางขนาด 10-12 นิ้ว ซึ่งเหมาะและเป็นที่ต้องการของตลาด ราคาจำหน่ายจัดว่าเป็นไม้ที่มีราคาดี การผลิตในเขตกรุงเทพฯก็มีพื้นที่ อำเภอบางกรวย อำเภอบางบำหรุ อำเภอตลิ่งชัน อำเภอบางใหญ่ และในจังหวัดปทุมธานี

ตลาดต่างประเทศ การส่งออกไม้ประดับสกุล Dieffenbachiaนี้ ตลาดต่างประเทศนิยมพันธุ์ "Tropic snow" และ "Snowdrop" ประเทศไทยส่งออกไม้ประดับสกุลนี้จำหน่ายที่ประเทศญี่ปุ่นและประเทศเนเธอร์แลนด์

ลักษณะการส่งออกจะเป็นต้นพันธุ์ล้างราก ขนาดต้นพันธุ์ความสูง 30-50 เซนติเมตร ก่อนส่งต้องงดการให้น้ำ 1 วัน เนื่องจากว่าถ้าให้น้ำจะทำให้ใบสดเปราะและหักได้ ส่วนรากจะหุ้มด้วยขุยมะพร้าว

วัตถุประสงค์

ศึกษาคุณสมบัติบางประการและการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัส สาเหตุโรคใบด่างบนพืชสกุล Dieffenbachia sp.

การตรวจเอกสาร

วงศ์ Araceae ประกอบด้วยพืชมากว่า 100 genus และ 1,500 species ซึ่งได้รวมถึง Dieffenbachia sp. ซึ่งเป็นไม้ประเภทตัดใบ พืชพวก aroids ทั้งหมดจะถูกทำลายได้โดยง่ายโดยการติดเชื้อแบบเรื้อรังพืชพวก aroidนี้ มักจะติดเชื้อจากโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสและคล้ายไวรัสได้หลายโรค รวมถึงเชื้อ tobacco necrosis virus ของ Dieffenbachia (Paludan and Begtrap,1982.)

เนื่องจากว่า dasheen mosaic virus (DMV) พบครั้งแรกในปี 1970 เป็น Potyvirus ชนิดเดียวที่ถูกค้นพบว่าก่อให้เกิดการติดเชื้อ กับ aroid ได้ (Mathews,1982) และเป็นไวรัสที่จะก่อให้โรคได้มากและแพร่หลายที่สุดกับ aroid ไวรัสชนิดนี้มักปรากฏอยู่ทั่วโลก และสามารถติดเชื้อได้อย่างน้อย 14 genus ของพืช aroid ซึ่งรวมไปถึง Dieffenbachia

Zettler และคณะ (1978) ได้รายงานว่า อาการที่เกิดจากเชื้อ DMV จะแตกต่างไปอย่างมากตามชนิดของ aroid ที่ติดเชื้อและฤดูที่ปลูกในบาง aroid เช่น Dieffenbachia sp. อาการจะเกิดอย่างรุนแรงลักษณะเฉพาะของ aroid แต่ละตัว คือ DMV จะแสดงอาการให้เห็นเป็นระยะ ๆ และบ่อยครั้งที่ทำให้การตรวจสอบเป็นไปได้ยาก ในบางตัวอย่างที่เกิดกับ Dieffenbachia อาการที่แสดงออกจะเป็นไปตามฤดูกาล และอาการส่วนใหญ่จะปรากฏในใบที่ถูกผลิตในเดือนที่เป็นฤดูใบไม้ร่วง หรือฤดูใบไม้ผลิ

คุณสมบัติของ DMV ที่มีการสรุปก่อนหน้านี้ จะเหมือนกับ potyvirus อื่นๆ คือ DMV จะมีความยาวอนุภาคเฉลี่ย 700-800 นาโนเมตร ซึ่งก่อให้เกิดผลึก cylindrical inclusion และสามารถถ่ายทอดทางเพลี้ยอ่อน ด้วยวิธี stylet-borne นอกจากนี้ capsid protein ของเชื้อจะมีความเกี่ยวข้องทางเซรุ่มวิทยากับ capsid protein ของ potyvirus อื่น ๆ ด้วย

นอกเหนือจากอาการเฉพาะที่ DMV ก่อให้เกิดสามารถวินิจฉัยได้หลายทาง ซึ่งรวมไปถึงวิธี Bioassay serology และโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

เช่นเดียวกับที่กล่าวมาข้างต้น เนื่องจากว่ามีไวรัส flexuous rod ตัวเดียวที่ถูกรู้จักว่าติดเชื้อกับ aroid การตรวจสอบไวรัสชนิดนี้ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนก็สามารถถูกใช้เป็นหลักฐานสำหรับ DMV ได้ด้วยเช่นกัน การตรวจสอบผลึก cylindical inclusions โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนสามารถที่จะทำให้หาหลักฐานสำหรับอาการที่ปรากฏ (Zettler, 1978)

แม้ว่าเชื้อไวรัสจะมีการแพร่กระจายอย่างแพร่หลายในการปลูก aroid ทั่วโลก แต่ตัวเลขที่แน่นอนสำหรับการสูญเสียของผลผลิตยังไม่ปรากฏ อย่างไรก็ตาม การศึกษาไม้ประดับหลายชนิดซึ่งได้รวมถึง Dieffenbachia sp. มีรายงานความเสียหายของผลผลิตเชิงปริมาณมากว่า 60 % (Hartman and Zettler,1974)

Aroid ประเภทใบ เช่น Dieffenbachia sp. Aglaonema sp. Philodendron sp.รวมกันเป็น 30 % ของอุตสาหกรรมที่มีมูลค่า 300 ล้านดอลล่าร์ในอเมริกา ในทางตรงกันข้ามกับ aroid ที่ใช้รับประทานส่วนมากไม่ปรากฏว่าเป็นพืชที่ส่งออกอย่างแพร่หลายในเชิงพาณิชย์ ส่วนไม้ประดับ aroid มีการส่งออกไปทั่วโลกในปริมาณมาก (Smith และคณะ1982)

การควบคุมเชื้อ DMVในพืช aroid ตัวแรกที่ประสบความสำเร็จโดยการปลูกเลี้ยงในเนื้อเยื่อ ก็คือ Caladium sp.และ Colocasia sp. และตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งถูกปรับปรุงและประสบความสำเร็จ และประยุกต์ใช้กับ aroid ตัวอื่นอีกหลายชนิดรวมถึง Dieffenbachia sp.(Knauss,1976)

Samyn และ Welvaert (1977) ได้รายงานว่า มีการประสบความสำเร็จในการควบคุมการติดเชื้อ DMV ของ Dieffenbachia sp. ในยุโรป

การแพร่กระจายไปทั่วโลกของ DMV เป็นผลจากหลายปัจจัย

ประการแรก คือ DMV ส่วนใหญ่จะติดเชื้อเรื้อรังมากกว่าการติดเชื้อถึงตายในพืชอาศัย ในบางที่ DMV อาจก่อให้ถึงตายได้ เช่นโดยเฉพาะใน Dieffenbachia sp. จะกำจัดตัวเองและผลที่ตามมาจากการวิจัย ผลการสำรวจเรือนปลูกพืชของพืชที่ติดเชื้อ DMV จึงไม่ถูกเปิดเผย (Chase,1982)

ประการที่สอง คือ DMV มีคุณสมบัติเหมือน potyvirus อื่น ๆ คือมีการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน (Morales, 1977) 2 ชนิด ได้แก่ Aphis gossypii และ Myzus persicae ซึ่งถูกรู้จักดีว่าเป็น vector ของ DMV

ประการที่สาม เนื่องจากมีการปลูก aroid จึงเท่ากับเป็นการส่งเสริมให้มีการแพร่กระจาย แม้ว่า DMV จะไม่เป็น seed borne (Zettler,1978) ซึ่งก่อให้เกิดปัญหากับ aroid ส่วนใหญ่หลายตัว

ประการสุดท้าย ความสำคัญแห่งพืชกรรมของ aroid ในฐานะที่เป็นพืชอาหารและไม้ประดับก็เป็นสาเหตุประการสุดท้ายที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของ DMV ซึ่งพืชพวก aroid ได้ถูกปลูกมานานแล้วก่อน 500 ปี ก่อนคริสตร์ศักราช

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้แบ่งออกเป็น

1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัส

เมล็ดพืชได้แก่ พักเขียว แตงโม แตงไทย แตงกวา แตงแคนตาลูป ฟักทอง บวบ ถั่วเหลือง ถั่วผี ถั่วแขก ถั่วฟุ่ม ยาสูบ Chenopodium quinoa และ C.amaranticolor ดังตารางที่ 1 ถุงพลาสติกขนาด 8 x 16 cm. ดินผสม โกร่ง กระดาษหนังสือพิมพ์ ปิเปต ขนาด 10 ml.

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา

จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง บิกเกอร์ขนาด 20,250 ml. cork borrer No.4 ไมโครเวฟ เครื่องหมุนเหวี่ยง หลอดหยด ช้อนตักสาร

1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจหาผลึก (inclusion body)

กระจกสไลด์ กระจกปิดสไลด์ เข็มเขี่ยเชื้อ มีดโกน กล้องจุลทรรศน์ จานเพาะเชื้อ

1.4 สารเคมีที่ใช้ในการปลูกเชื้อและถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่แสดงอาการใบด่าง

Buffer: phosphate buffer ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์

pH 7.0

ผง celite 545

1.5 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา

agar	0.8	gm
SDS	0.5	gm
NaN_3	1.0	gm
NaCl	0.9	gm
น้ำกลั่น	100	ml

fomvar ความเข้มข้น 1% ในสารละลาย chloroform

1.6 สารเคมีที่ใช้ในการหาตรวจผลึก (inclusion body)

rose bengal

lactophenal

oil immersion

1.7 แอนติซีรัมที่ใช้ในการทดสอบ dasheen mosaic virus (DMV)และ tobacco mosaic virus (TMV)

ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์แอนติซีรัมของเชื้อไวรัสและมายโค-พลาสมาพืชแห่งประเทศไทย กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

เวลา เริ่มการทดลอง ตุลาคม พ.ศ. 2537
สิ้นสุดการทดลอง มีนาคม พ.ศ. 2538

สถานที่ ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา และเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การทดลองที่ 1 การศึกษาอาการของโรค

จากการสำรวจพืชสกุล Dieffenbachia sp. ในเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร พบว่าไม้ประดับสกุล Dieffenbachia sp. แสดงอาการใบด่างจากเชื้อไวรัส ดังนี้

พันธุ์ "Compestra" จะแสดงอาการด่างจางๆ ระหว่างเส้นใบและทั่ว ๆไปบนใบเป็นอาการด่างที่ไม่ชัดเจน อาจมีอาการอื่นร่วมด้วย เช่น ขอบใบม้วนขึ้น (ภาพที่ 1)

พันธุ์ "Rudolph Roehrs" แสดงอาการด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน และด่างเป็นจุด ๆ ถ้ายกใบขึ้นส่องดูกับแสงจะเห็นได้ชัดเจน (ภาพที่ 2)

และพันธุ์ "Snowdrop" แสดงอาการด่างเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน และพบอาการ vein clearing เส้นใบมีสีซีดลง พบมีอาการใบหงิกเป็นคลื่นร่วมด้วย

ภาพที่ 1 แสดงอาการใบด่างของพืชสกุล Dieffenbachia sp.
พันธุ์ "Compestra"

93935

ภาพที่ 2 แสดงอาการใบด่างของพืชสกุล Dieffenbachia sp.
พันธุ์ "Rudolph Roehrs"

ภาพที่ 3 แสดงอาการใบด่างของพืชสกุล Dieffenbachia sp.
พันธุ์ "Snowdrop"

การทดลองที่ 2 การตรวจสอบไวรัสพืชด้วยการปลูกเชื้อ

นำเมล็ดที่ต้องการทดสอบหาพืชอาศัยทั้ง 14 ชนิด ปลูกในถุงพลาสติกสีดำ ถุงละ 3-5 เมล็ด รดน้ำทุกวันจนเมล็ดงอกเป็นต้น ใบเลี้ยงคลี่บานเต็มที่ซึ่งจะกินเวลา 7-10 วัน หลังการเพาะเมล็ด (ดังตารางที่ 1) คลุมต้นพืชที่ต้องการปลูกเชื้อ ด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อทำให้พืชอ่อนแอง่ายต่อการเกิดโรค และเมื่อครบกำหนดแล้วนำกระดาษที่คลุมออก ล้างมือให้สะอาดก่อนทำ การปลูกเชื้อ นำโกร่งที่แช่เย็นออกมา แล้วนำใบสาวน้อยประแป้ง ที่แสดงอาการใบด่างของทั้ง 3 พันธุ์ ได้แก่พันธุ์ "Compestra" พันธุ์ "Rudolph roe-hrs" และพันธุ์ "Snowdrop" นำมาบดในโกร่งแช่เย็นด้วย 0.1 phosphate buffer pH 7 เติมสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วนของใบพืชต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บดใบพืชให้ละเอียดโดยทำที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพของเชื้อ เติมผง celite 545 ลงไปเล็กน้อย เพื่อทำให้พืชเกิดบาดแผลเชื้อไวรัสจะเข้าสู่ต้นพืชที่จะทำการทดสอบได้ง่าย หลังจากนั้นทำการปลูกเชื้อโดยใช้นิ้วมือจุ่มน้ำคั้นแล้วทาบนใบจากโคนใบสู่ปลายใบและใช้มืออีกข้างรองรับพืชด้านล่าง เมื่อทาครบทุกต้นแล้วใช้น้ำล้างเศษพืชที่ติดบนใบออก เพราะอาจมีพิษต่อพืชได้ นำกระดาษหนังสือพิมพ์ชุบน้ำมาคลุมไว้ 24 ชั่วโมงเมื่อครบกำหนด แล้วนำกระดาษหนังสือพิมพ์ออก รดน้ำทุกวัน ตรวจดูอาการ หลังจากปลูกเชื้อในช่วงเวลา 1 เดือน โดยมีพืชเปรียบเทียบ (control) ที่ไม่ได้รับการปลูกเช้อ ชนิดละ 1 ต้น

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของพืชอาศัยและเวลาเมื่อใช้ทดลอง

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	อายุเมื่อใช้ทดลอง (วัน)
Chenopodiaceae	C. amaranticolor	goose foot	30
	C. quinoa	-	30
Cucurbitaceae	Benincasa hispida	ฟักเขียว	7-10
	Citrullus vulgaris	แตงโม	7-10
	Cucumis melo	แตงไท	10
	C. sativus	แตงกวา	7-10
	C. melo	แตงแคนตาลูป	7-10
	Cucurbita moschata	ฟักทอง	7
	Luffa acutangula	บวบ	10
Leguminosae	Glycine max	ถั่วเหลือง	7
	Phaseolus lathyroides	ถั่วผี	7-10
	P.vulgaris	ถั่วแขก	20
	Vigna sinensis	ถั่วพุ่ม	7
Solanaceae	Nicotiana tabacum	ยาสูบใบใหญ่	25

การทดลองที่ 3 การทดสอบทางเซรุ่มวิทยา

โดยวิธี Agar-gel double diffusion test

เตรียมวุ้นโดยละลาย Noble agar 0.8 gm. ในน้ำกลั่น 100 ml. อุ่นให้ร้อนจนผงวุ้นละลายเติม NaCl 0.9 gm ลงในสารละลายวุ้น ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 60 °C เติม sodium azide (NaN_3) 1.0 gm และ SDS 0.5 gm.เท สารละลายที่ได้ลงบนจานเพาะเชื้อ ที่เคลือบด้วย fomvarให้วุ้นหนาประมาณ 5 mm. พอวุ้นแข็งตัวใช้ cork borer ขนาด 4 mm.เจาะหลุมตรงกลาง 1 หลุม และรอบๆ อีก 6 หลุม ห่างจากหลุมกลาง 5 mm.หยด antiserum ของเชื้อ DMV หรือ TMV ในหลุมกลางและหยดน้ำคั้นจากพืชที่เป็นโรคในหลุมที่อยู่รอบ ๆโดยบดใบพืชด้วย NaCl 1.8 % จนละเอียด ใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็กเติมด้วย NaCl 1.8 % นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบต่ำ เป็นเวลาประมาณ 5 นาที จะได้สารละลายที่แยกชั้นออกจากตะกอนใบพืช ซึ่งจะตกตะกอนอยู่ก้นหลอดใช้ dropper ดูดเอาแต่สารละลายใสนำมาหยดลงในหลุมโดยหยดให้พอดีปากหลุม หลุมที่ตรงข้ามกันใช้สารชนิดเดียวกันหรือน้ำคั้นที่ได้จากพืชที่แสดงอาการชนิดเดียวกัน น้ำคั้นที่ได้จากพืชปกติเป็น control นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน ถ้าปฏิกริยายังไม่ชัดเจน นำเข้าตู้เย็น ตรวจดูปฏิกริยาที่เกิดขึ้นหลังจากนั้น 1-5 วัน

การทดลองที่ 4 วิธีตรวจดูผลึก (inclusions body)

ลอกผิวใบพืช (epidermal strip) ของพืช Dieffenbachia sp. ที่แสดงอาการใบด่างจากเชื้อไวรัส ของทั้ง 3 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์ "Compestra" พันธุ์ "Rudolph Roehrs" และพันธุ์ "Snowdrop" ให้บางที่สุด โดยลอกด้านใต้ใบ นำไปวางบนกระจกสไลด์ที่มีหยดน้ำ แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดากำลังขยายต่ำ จะพบวัสดุแปลกปลอมในเซลพืชซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของอนุภาคไวรัส (virus particle) ในส่วน cytoplasm จะมีขนาดและรูปร่างต่างกัน

เนื้อเยื่อผิวใบที่ลอกได้อาจนำไปย้อมด้วย rose bengal 1-2 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น วางบนกระจกสไลด์หยดด้วย lactophenal แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดากำลังขยายต่ำ

การทดลองที่ 5 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

โดยความอนุเคราะห์จากเจ้าหน้าที่ในกลุ่มงานไวรัสวิทยาช่วยตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นของพืชเป็นโรคด้วยวิธี leaf dip method และการตรวจสอบปฏิกริยาทางเซรุ่มวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนด้วยเทคนิค ISEM กับแอนติซีรัมของเชื้อ DMV

ผลการทดลอง

จากการศึกษาสมบัติบางประการของเชื้อไวรัส ผลการทดลองพอสรุปได้ดังนี้

1.จากการทดลองปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ โดยผ่านทางน้ำคั้นเพื่อหาชนิดของพืชอาศัยทั้งหมด 14 ชนิด 4 วงศ์ ดังตารางที่ 1 ไม่พบว่าเชื้อไวรัส ทำให้เกิดอาการกับต้นพืชที่ใช้ทดสอบ

2.การศึกษาความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยา ด้วยวิธี Agar-gel dou--ble diffusion test ระหว่างแอนติซีรัมของ DMV , TMV กับแอนติเจนคือน้ำคั้นของพืชที่เป็นโรคทั้ง 3 ชนิด ไม่เกิดปฏิกริยากับแอนติซีรัม

3.จากการตรวจดูผลึกในเซลพืชปกติจะไม่พบสิ่งแปลกปลอม ในขณะที่เซลพืชที่เป็นโรค พบ inclusions body ติดสีแดง โครงสร้างจุลภาคภายในเซลพืชเป็นโรคพบ cylindrical inclusions รูปเข็มและรูปคล้ายดาว โดยลักษณะผลึกที่พบจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชดังนี้

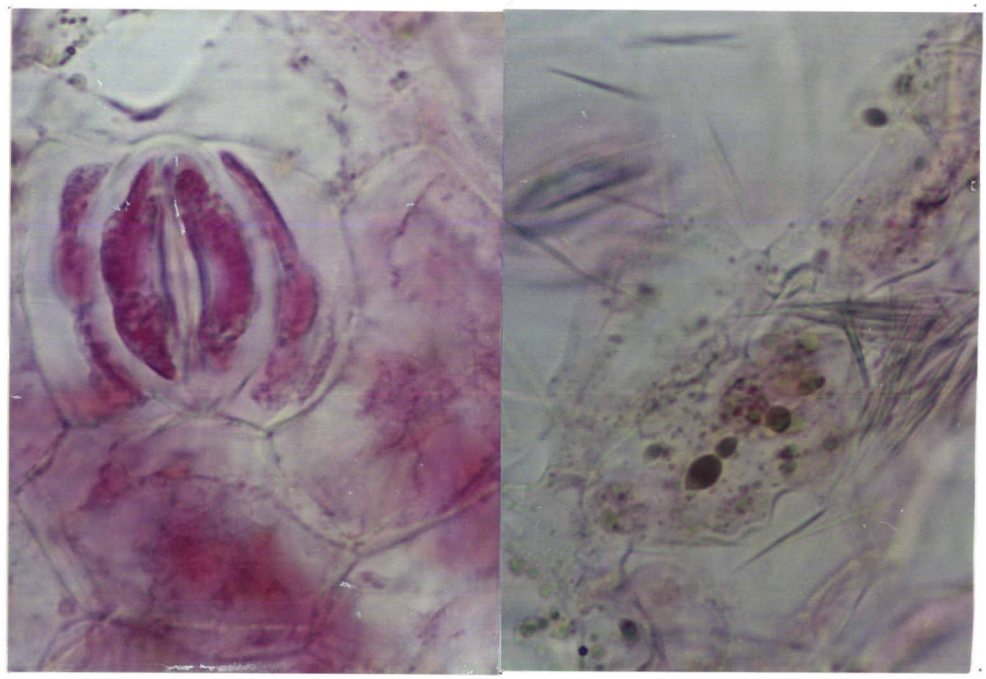
พันธุ์ "Compestra" ผลึกที่พบเป็นแบบรูปเข็ม (ภาพที่ 4ก และ ข)

พันธุ์ "Rudolph Roehrs" ผลึกที่พบเป็นแบบรูปเข็ม และรูปคล้ายดาว (ภาพที่ 5ก และ ข)

พันธุ์ "Snowdrop" ผลึกที่พบเป็นแบบรูปคล้ายดาว (ภาพที่ 6ก และ ข)

4.อนุภาคของไวรัสสาเหตุโรคของพืชทั้ง 3 ชนิด มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อในกรุ๊ป potyvirus คือมีอนุภาคแบบท่อนยาวคดงอ ส่วนใหญ่มีขนาดความยาวอยู่ในช่วง 650-700 นาโนเมตร จากตัวอย่างน้ำคั้นของพืชเป็นโรคทั้ง 3 พันธุ์ และจากการทดสอบด้วยวิธี ISEM พบอนุภาคของเชื้อจากตัวอย่างน้ำคั้นของพืชในสกุล Dieffenbachia sp. พันธุ์ "Compestra" และ"Snowdrop" ทำปฏิกริยากับแอนติซีรัมของเชื้อ DMVโดยแอนติซีรัมจะเคลือบอนุภาคของเชื้อไวรัสปรากฏเป็นเส้นทึบหนาทั่วอนุภาคในขณะที่อนุภาคไวรัสจากน้ำคั้นของพืชพันธุ์ "Rudolph Roehrs" ไม่พบปฏิกริยาดังกล่าว (ภาพที่ 7ก และ ข)

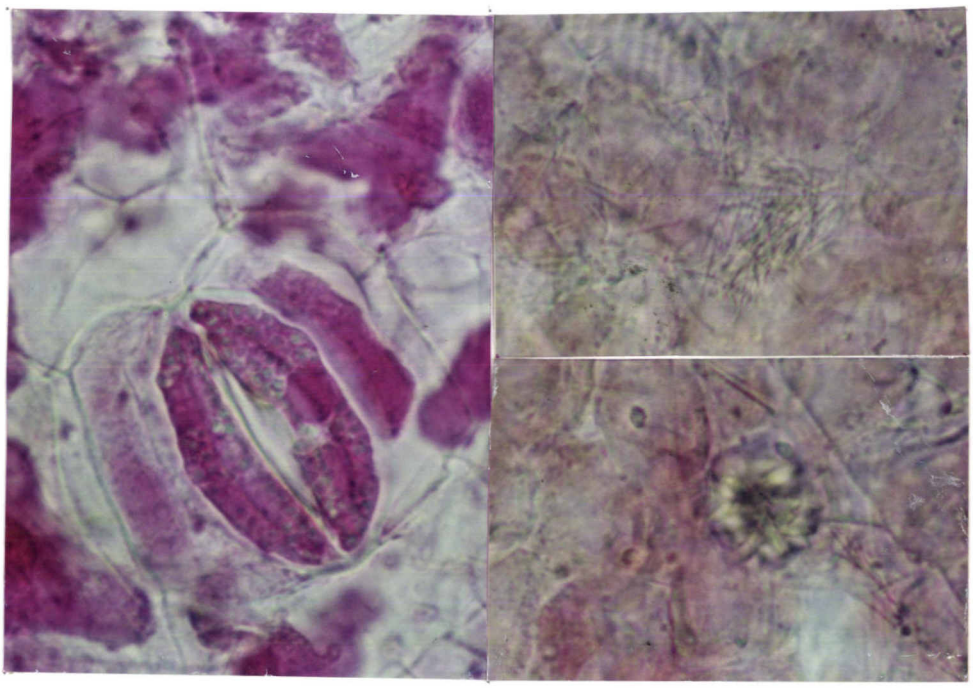
14650



ก ข

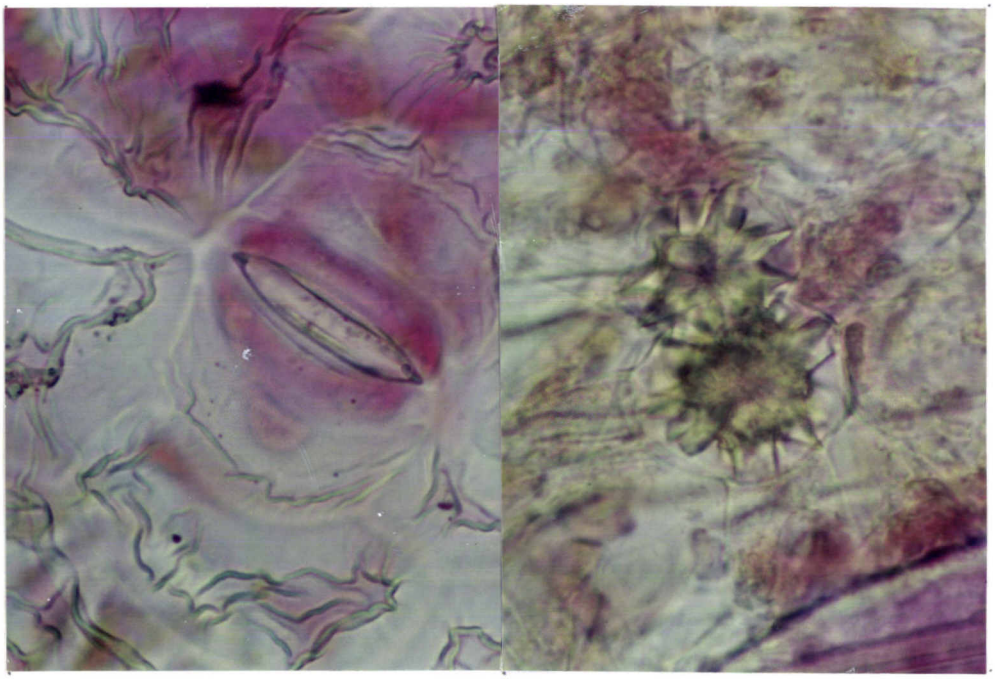
ภาพที่ 4 ก. แสดงลักษณะภายในของเซลพืชปกติของพันธุ์ "Compestra"
ข. แสดงลักษณะ inclusions body แบบรูปเข็ม
(needle crystalline) ที่พบในใบพืชเป็นโรค

ห้องสมุดวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง



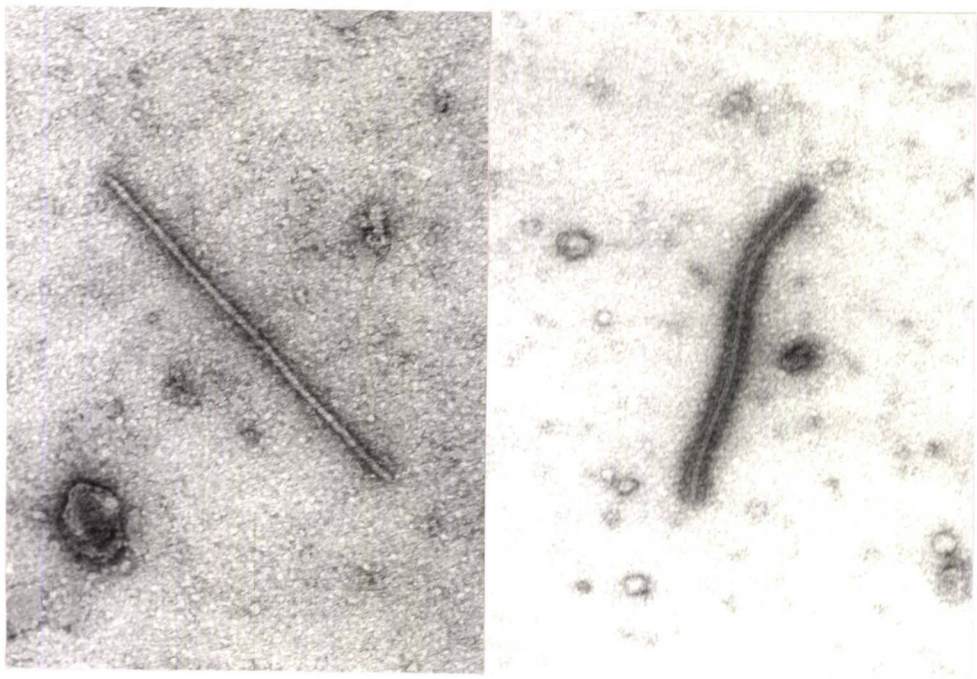
ก ข

ภาพที่ 5 ก. แสดงลักษณะภายในของเซลพืชปกติของพันธุ์ "Rudolph Roehrs"
ข. แสดงลักษณะ inclusion body แบบรูปเข็ม และรูปดาว
ที่พบในใบพืชเป็นโรค



ก ข

ภาพที่ 6 ก.แสดงลักษณะภายในของเซลพืชปกติของพันธุ์ "Snowdrop"
ข.แสดงลักษณะ inclusions body แบบ amorphous
cytoplasmic inclusions ที่พบในใบพืชเป็นโรค



ก ข

ภาพที่ 7 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทัศน์อิเลคตรอน

ก.อนุภาคเชื้อไวรัสความยาว 700 นาโนเมตร จากน้ำคั้นของพืชพันธุ์ "Rudolph Roehrs" โดยวิธี leaf dip กำลังขยาย 25,000 เท่า

ข.อนุภาคของเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นของพืชพันธุ์ "Snowdrop" ถูกเคลือบด้วย antiserum ของเชื้อ DMV โดยวิธี ISEM กำลังขยาย 25,000 เท่า

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองสรุปได้ว่า ไวรัสซึ่งเป็นสาเหตุของโรคใบด่างของพืช Dieffenbachia sp. ที่พบในแหล่งสำรวจ คือ dasheen mosaic virus (DMV) จากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน สามารถยืนยันได้ว่า เชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุของโรคนี้มีอนุภาคเป็นท่อนคด (flexuous rod) ซึ่งตรงตามที่ Hill(1980) ได้ทำการศึกษาไว้มีความยาวอนุภาคอยู่ในช่วง 650-700 นาโนเมตร และยังสามารถตรวจพบผลึก (inclussions body) ได้จากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดากำลังขยายต่ำ ผลึกที่พบมี 2 แบบ คือ รูปเข็ม (needle crytalline) และผลึกรูปดาว (amor--phous cytoplasmic inclusions) โดยลักษณะผลึกที่พบจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืชดังนี้ พันธุ์ "Compestra"ผลึกที่พบเป็นแบบรูปเข็ม พันธุ์ "Rudolph Roehrs" ผลึกที่พบเป็นแบบรูปเข็มและรูปคล้ายดาว พันธุ์ "Snowdrop" ผลึกที่พบเป็นแบบรูปคล้ายดาว

ในการเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างจุลภาคของ DMV กับ papaya ringspot virus (PRV) ที่รัชนี (2528)ได้ทำการศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคของมะละกอที่เป็นโรคจุดวงแหวนมีสาเหตุมาจากเชื้อ (PRV) ซึ่งเป็นไวรัสรูปท่อนยาวคดงอ ความยาวเฉลี่ย 790±75.79 นาโนเมตร พบ cylindrical (pinwheel) inclusions ซึ่งประกอบด้วย scrolls หรือ tube โดยจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน นอกจากนี้ยังพบ amorphous inclu-sions ในเนื้อเยื่อที่นำมาศึกษาด้วย

การปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบชนิดต่างๆ พบว่าไม่สามารถทำให้เกิดโรคได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการใบด่าง มีพืชอาศัยอยู่ในวงศ์จำกัด หรืออาจเป็นเพราะว่ากรดนิวคลิอิคของเชื้อในกรุ๊ป potyvirus โดยทั่วไปมีความสามารถในการเข้าทำลายพืชได้ต่ำ เนื่องจากแยกมาจากอนุภาคที่ไม่สมบูรณ์ หรือกรดนิวคลิอิดถูกแยกมาจากเอ็นไซม์ RNAse ในขณะทำการทดลอง (Makkouk และ Gumpf , 1974) หรือเข้าทำลายได้แต่ไม่ปรากฏอาการ ทั้งนี้เพราะการเกิดอาการอาจต้อง

การช่วงเวลาเพื่อความสมบูรณ์ และสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณ หรืออาจเป็นไปได้ ที่ว่าใช้ inoculum ที่เป็นโรคมานานจะทำให้เปอร์เซนต์การเป็นโรคของพืชทดสอบต่ำลง

จากการทดลองทางเซรุ่มวิทยา โดยวิธี Agar-gel double diffusion test ไม่ปรากฏว่าเกิดปฏิกริยาระหว่าง antiserum และ antigen อาจเนื่องมาจาก antiserum ที่ใช้อาจเสื่อมคุณภาพ พืชที่เป็นโรคที่ใช้ในการทดสอบมีความเข้มข้นของเชื้อต่ำ หรือเนื่องมาจากเชื้อไวรัสที่ใช้ในการทดลอง มีความยาวอนุภาคที่ยาวมาก ทำให้เคลื่อนที่ผ่านวุ้นได้ไม่ดี

เนื่องจากผลการทดลองของการถ่ายทอดเชื้อไปสู่พืชทดสอบ เพื่อหาชนิดของพืชอาศัย ไม่แสดงอาการ และการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา ด้วยวิธี Agar-gel double diffusion test ไม่เกิดปฏิกริยาระหว่างแอนติซีรัมและแอนติเจน จึงยังต้องใช้คุณสมบัติด้านอื่น ๆ ในการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสด้วย ซึ่งไม่สามารถใช้สมบัติเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งเป็นหลักในการจำแนกชนิดได้ จำเป็นต้องใช้ลักษณะอื่น ๆ ประกอบด้วย

การป้องกันกำจัด เนื่องจากเชื้อไวรัส DMV นี้ สามารถถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด คือ Aphis gossypii และ Myzus persicae โดยวิธี stylet-borne ดังนั้นเพื่อเป็นการป้องกันควรควบคุมกำจัดแมลงที่เป็นพาหะในการถ่ายทอดเชื้อ ปัจจัยสำคัญที่น่าจะได้มีการศึกษาโดยละเอียดต่อไปได้แก่ การศึกษาหาแหล่งที่มาของไวรัสที่ทำให้พืชเป็นโรคเมื่อมีการปลูก และการศึกษาเกี่ยวกับการแพร่ระบาดของโรคโดยแมลงพาหะที่สำคัญบางชนิดที่พบ เช่น เพลี้ยอ่อน เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับหาแนวทางในการป้องกันและกำจัดโรคนี้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

--- 2534.ไม้ตัดใบเพื่อการค้า เกษตรวันนี้ กรุงเทพฯ หน้า 48-49

นกเขาไฟ. 2534 ไม้ดอกไม้ประดับ สำนักพิมพ์ ม.ป.ท. กรุงเทพมหานคร 110 หน้า

รัชนี นิมมานพัชรินทร์ 2528. การเตรียมไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ เซรุ่มวิทยาและโครงสร้างจุลภาคของไวรัสโรคจุดวงแหวนของมะละกอ วิทยานิพนธ์ปริญญาโท บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chase,A. R. and F. W. Zettler. 1982. Dasheen mosaic virus infection of (Dieffenbachia cultivars. Plant Dis. 66:891-893.

Hartman, R. D. and F. W. Zettler. 1974. Effects of dasheen mosaic virus on yields of *Caladium, Dieffenbachia* and *Philodendron Phytopathology* 64:768.

Hill S.A. and D.M.Wright. 1980 Identification of dasheen mosaic virus in Dieffenbschia picta and xanthosoma helliborifolium by immune electron microscopy. Pl Pathol. 29: 143-144.

Knauss, J.F. 1976. A tissue culture method for producing *Dieffebachia picta* cv.'Perfection' free of fungus and bacteria. *Proc. Florida State Hort.Soc.* 89:293-296

Mathews, R.E.F. 1982 Classification and nomenclature of viruses .S. Karger,New York. 199 p.

Morales, F. J. and F. W. Zettler.1977.Aphid transmission characteristics of dasheen mosaic virus.Fitopatol. Columbiana 6: 134.

G. Don. Virus attack in Daish culture,survey and diagnosis.

Danish Res. Serv. for Plant and Soil Sci Report No. 1612: 399-404.

Samyn ,G and W. Welvaert. 1977. Dasheen mosaic virus on some Araceae species. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent* 42: 1227-1233

Smith, C. N., M.N. Miller, E.F. Scarborough, and J. R. Strain. 1982. An economic overview of the tropical foliage plant industry. *Foliage Digest* 5: 3-8

Zettler, F. W.,M.M. abo El-Nil, and R.D. Hartman.1978. Dasheen mosaic virus.Commonwealth Mycological Institute/Assoc. Appl Biol Description of plant virus No 191 Kew,Serrey England.