1952

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

การศึกษาโรคไวรัสบนไม้ประดับ

A Study of Virus Diseases on Ornamental Plants.

โดย

นางสาวรัตนา วิทยะประสาท

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการอาจารย์ที่ปรึกษา .....

(อาจารย์ ดร.นวลพรรณ งามยี่สุน)

วันที่ 15 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2538

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช .....

(อาจารย์ สำเริง คำทอง)

วันที่ 15 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2538

14656
13 มิ.ค. 2541

ฝพ.
ร 375ก
2537

14656

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาโรคไวรัสบนไม้ประดับ

A Study of Virus Diseases on Ornamental Plants.

โดย

นางสาวรัตนา วิทยะประสาท

อาจารย์ที่ปรึกษา

ปพ.
ส๓๔๕ก
๒๕๓๔

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 99024
ลงชื่อ.....

อาจารย์ดร.นวลพรรณ งามยี่สุน

เสนอ

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต(เกษตรศาสตร์)

พุทธศักราช 2537

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้ที่สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความอนุเคราะห์และความอุปการคุณจากหลายๆท่านที่ได้ให้คำปรึกษาและให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน

ดิฉันขอกราบขอบพระคุณ และขอขอบคุณทุกๆท่านเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย ได้แก่ คุณพ่อและพี่สาวที่ให้การสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำปัญหาพิเศษ อาจารย์ ดร. นวลพรรณ งามยี่สุ่น ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ซึ่งได้ให้คำปรึกษาทางด้านวิชาความรู้และข้อแนะนำต่าง ๆที่เป็นประโยชน์ในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ได้สำเร็จอย่างสมบูรณ์ และเพื่อนๆ น้องๆ ในภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ตลอดจนเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืช ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและสนับสนุนในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดี

รัตนา วิทยะประสาท

ชื่อเรื่อง การศึกษาโรคไวรัสบนไม้ประดับ

A Study of Virus Diseases on Ornamental Plants.

โดย นางสาวรัตนา วิทยะประสาท

ภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.นวลพรรณ งามยิ่งสุน

บทคัดย่อ

การศึกษาโรคไวรัสบนไม้ประดับ มีขั้นตอนในการศึกษา คือ การสำรวจอาการบนไม้ประดับ โดยสังเกตรูปแบบของอาการที่เกิดบนพืช ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส (virus - like disease) พบว่าต้นเดหลี (*Spathiphyllum floribundum*) ต้นพลูฉลุ (*Monstera oblique expilata*) ต้นพุดด่าง (*Gardinia collinsae* Craib) ต้นหนวดปลาหมึกด่าง (*Brassaia actinophylla* Endl.) และต้นไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracena sp.*) มีอาการใบด่าง ใบหดเสียรูปทรง มีอาการบิดเบี้ยว และการเจริญเติบโตจะลดลงกว่าพืชปกติ การศึกษาพืชอาศัยโดยการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ เป็นการถ่ายทอดเชื้อทางน้ำคั้น (sap transmission) โดยการนำใบพืชที่เป็นโรคบดใน phosphate buffer หรือ phosphate buffer ผสมสารละลาย PVP (polyvinylpyrrolidone) ความเข้มข้น 2%หรือ phosphate buffer ผสมสารละลาย PVP ความเข้มข้น 5% ทำแผลด้วยผง celite หลังจากนั้นก็ทำการปลูกเชื้อ และคอยสังเกตอาการที่เกิดขึ้น การตรวจดู inclusion bodies โดยการลอกเซล epidermis ของใบพืชที่เป็นโรค และย้อมด้วยสารละลาย rose bengal ความเข้มข้น 0.5% ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบ inclusion bodies ในใบของเดหลีและใบหนวดปลาหมึกด่าง การทำOuchterlony agar gel double diffusion test โดยการเท agar gel บน plate ที่เคลือบด้วยสารละลาย formvar และเจาะหลุมด้วย cork borer ตามแบบ หลังจากนั้นหยด antiserum ของเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) potato virus Y (PVY) และ cucumber mosaic virus(CMV) ที่หลุมกลางส่วนหลุมที่อยู่รอบๆหยด antigenซึ่งได้แก่น้ำคั้นจากใบพืช แล้วปิดฝา plate ให้ความชื้นและสังเกตปฏิกิริยาที่จะเกิดขึ้น พบว่าทุก plate ไม่มีปฏิกิริยาระหว่าง antiserum และ antigen เกิดขึ้น ในขณะที่ตรวจพบอนุภาคของเชื้อไวรัสลักษณะยาวคดงอ(flexous rod) ความยาวประมาณ 650 - 700 นาโนเมตร ในใบเดหลีและพลูฉลุ ซึ่งอนุภาคของเชื้อไวรัสจากใบเดหลีทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาในการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน ด้วยวิธี ISEM กับ antiserum ของเชื้อ DMV

ABSTRACT

Title : A Study of Virus Diseases on Ornamental Plants.

By : RATTANA WITHAYAPRASART

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Department : Pest Management Technology

Advisor : .....N. Ngamyeesoon.....

(Dr. Nualphan Ngamyeesoon)

.....15./.May..../.1995

A study of virus diseases on ornamental plants. There are steps by surveys of symptoms occuring in natural plants which were the symptoms of virus - like disease on *Spathiphyllum floribundum* , *Monstera oblique expilat* , *Gardinia collinsae* Craib , *Brassaia actinophylla* Endl. *and Dracena sp.* The most patterns of them were mosaic, yellow and green mottling, distortion and stunted in growth. A study of indicator plants or test plants by sap transmission with extracts of infected leaves and triturated in phosphate buffer, phosphate buffer with 2%PVP (polyvinylpyrrolidone) , phosphate buffer with 5%PVP. Celite was dusted onto the leaves of test plants as an abrasive before inoculation , and the symptoms were observed for 4 weeks. A study of inclusion bodies was done from epidermal strips and stained in 0.5% rose bengal. After an examination with light microscope for inclusions. There were amorphous inclusion bodies on *Spathiphyllum floribundum* and *Brassaia actinophylla* Endl. While, a study of Ouchterlony agar gel double diffusion test of infected leaves extracts against antisera of dasheen mosaic virus (DMV) , potato virus Y (PVY) and cucumber mosaic virus (CMV) showed no reaction. However, an examination of electron microscope by leaf dip method found only a few flexuous virus particles about 650-700 nm in length from leaves of *S. floribundum* and *M. oblique expilata.* Whereas, there was also a positive reaction of particles from *S. floribundum* leaves tested with DMV antiserum by ISEM method.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญภาพ	I
สารบัญตาราง	II
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	8
ผลการทดลอง	13
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	28

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของพลุฉลุ	13
2.	แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของเดหลีเล็ก	14
3.	แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของพุดด่าง	15
4.	แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของไผ่ฟิลิปปินส์	16
5.	แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของหนวดปลาหมึก	17
6.	แสดงลักษณะของ inclusion bodies ใน epidermal strips ของเดหลี	18
7.	แสดงลักษณะของ inclusion bodies ใน epidermal strips ของหนวดปลาหมึก	19
8.	แสดงลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นของใบเดหลี โดยวิธี leaf dip	21
9.	แสดงลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นของใบเดหลี โดยวิธี ISEM	22

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงรายชื่อของพืชอาศัยชนิดต่างๆที่ใช้ทดสอบ 10

คำนำ

ไม้ประดับในปัจจุบันกำลังได้รับความนิยมอย่างสูง สามารถนำมาใช้ประดับและตกแต่ง อาคารบ้านเรือน อาคารสำนักงาน สวนหย่อม และสวนสาธารณะต่างๆ ซึ่งในอนาคตยังมีแนวโน้มที่จะส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ประเทศไทยนับว่ามีพันธุ์ไม้ประดับที่สวยงามหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นรูปทรง สี ขนาดของใบ การแตกกิ่ง และขนาดของลำต้น ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดหรือพันธุ์ของไม้ประดับนั้นๆ ความงามเหล่านี้ส่วนหนึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์หรืออาจติดเชื้อไวรัสมาจากที่อื่น ซึ่งจะพบลักษณะอาการต่างๆ ในไม้ประดับดังนี้ คืออาการที่มีสีเปลี่ยนไป(color deviation)จากธรรมดาของพืชนั้น ไม่ว่าจะเป็นสีใดก็ตาม ที่พบมากเป็นอาการด่างแบบ mosaic อีกอาการหนึ่ง คืออาการที่พืชเจริญเติบโตผิดปกติ (abnormal growth) แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ การเจริญเติบโตลดลง (growth reduction) หรือการหยุดการเจริญเติบโต (stunting) หรืออาการแคระแกรน (dwarfing) และอาการผิดปกติในระดับเซลและเนื้อเยื่อ (cytological and histological deviation)เป็นอาการผิดปกติในระดับที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่าจะต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจดูและจะต้องทำการศึกษาเปรียบเทียบกับพืชปกติด้วย เซลพืชเป็นโรคบางเซล เกิดการสร้างสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า inclusion bodies จากอาการเหล่านี้ทำให้คาดคะเนว่า ไม้ประดับโดยทั่วๆไปที่มีลักษณะดังกล่าวข้างต้น อาจจะมีสาเหตุจากเชื้อไวรัส เพราะฉะนั้นจึงได้ทำการศึกษาโรคไวรัสบนไม้ประดับนี้ขึ้น โดยระยะแรกจะทำการสำรวจหาไม้ประดับที่มีอาการของโรคไวรัส หลังจากนั้นนำมาไว้ในโรงเรือนเพื่อคอยสังเกตอาการที่อาจจะเปลี่ยนแปลงไป เพื่อให้แน่ใจว่าอาการที่ปรากฏเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส จึงทดสอบโดยการปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย อีกวิธีหนึ่งคือ การตรวจดู inclusion bodies และวิธีสุดท้ายคือ การทำ Ouchterlony agar gel double diffusion test และเพื่อเป็นการยืนยันว่ามีเชื้อสาเหตุจากไวรัสจริงก็ได้ส่งตัวอย่างพืชไปทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนที่ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาอาการของโรคไวรัสที่เกิดบนไม้ประดับ
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทางน้ำคั้น
3. เพื่อวินิจฉัยชนิดของเชื้อสาเหตุจากไวรัส

การตรวจเอกสาร

การสำรวจอาการโรคไวรัสในไม้ดอกไม้ประดับ Abo El-nil และคณะ (1977) รายงานว่า dasheen mosaic virus (DMV) พบครั้งแรกในปี 1970 เป็นไวรัสในกลุ่ม potyvirus ซึ่งเข้าทำลายพืชในวงศ์ Araceae และหลังจากนั้นมีการตรวจพบในพืชเศรษฐกิจพวก aroids ในฟลอริดา อียิปต์ เปอโตริโก เวเนซูเอลา ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ และเกาะโซโลมอน Chase และ Zettler (1982) รายงานว่า พืชในตระกูล *Dieffenbachia* sp. หลายชนิดซึ่งปลูกเป็นบริเวณกว้างในฟลอริด้าเพื่อทำเป็นการค้า พบ เชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) เป็นเชื้อสาเหตุที่แสดงอาการ systemic ทำให้เกิดปัญหากับผลผลิตในวงศ์ Araceae เช่นพืชพวก *Aglaonema, Caladium, Colocasia, Dieffenbachia, Xanthosoma และ Zantedeschia* โดยพบว่ามีการติดเชื้อในธรรมชาติ

อาการของโรคที่พบ Verplancke (1930) รายงานว่า เชื้อ DMV ทำให้พืชแสดงอาการแบบ systemic ของ yellowing ที่เส้น veins และ chlorotic spots ใน *Sapronaria vaccaria* มีอาการ chlorotic Tompkins และ Gardner (1934) รายงานว่า พบอาการในพืชทดสอบ โดยแสดงอาการของโรคใน *P. selloum* อาการที่พบบน P. selloum หลังการปลูกเชื้อ 2-3 สัปดาห์ มีลักษณะเป็นขีดและ 3 ใบแรกจะหด อัตราการเจริญเติบโตลดลง อาการ systemic ใน Araceae มีอาการแตกต่างกัน โดยเฉพาะอาการที่3ใบแรกไม่ชัดเจน ทำให้บอกความแตกต่างจากพืชธรรมชาติได้ยาก ส่วนใน caladium และใน calla lily อาการจะชัดเจนและมีอาการด่างที่ 3 ใบแรก ซึ่งมีอาการใบหดร่วมด้วย อาการที่ติดเชื้อของ DMV ในพืชตระกูล Malanga (*X. sagittacfolium* (L.) Schott.) หลายชนิดจะแสดงอาการบนใบใหม่ Tompkins และคณะ (1934) ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดโดยวิธีกลของไวรัส flexous rod (เป็นเส้นสายขนาดเล็ก จัดอยู่ในกลุ่ม potyvirus หรือเรียกว่า Flexible thread) พบอาการในพืช aroid ที่มีการขยายพันธุ์แบบปกติ เชื้อที่มีความสัมพันธ์กับพืชพวก araceous คือ tomato spotted wilt Alconero (1971) รายงานว่า พืชที่พบมีอาการใบด่างคล้ายกันกับพืชทดสอบตระกูลบอน(*Caladium hortulanum* Bridsey , *C. esculenta* , *Dieffenbachia picta* Schott และ *Xanthosoma caracu* Koch & Bouche) Chase และ Zettler (1982) รายงานว่า อาการที่พบ คือ ลักษณะแผลเป็นจุดวงแหวน (ring spots) อาการด่าง(mosaic) และอาการบิดเบี้ยว (distortion) การเก็บเกี่ยวเคลื่อนย้ายโดยขาดความระมัดระวังจะเป็นการเพิ่มปริมาณของเชื้อ DMV ใน stock ของพืชมีลักษณะอาการด่างที่เด่นชัดและอาการบิดเบี้ยว Rana, Vovlas และ Zettler (1983) รายงานว่า พืชพวก *Richardia africana*(= *Zantedeschia aethiopica*) ใบมีอาการบิดเบี้ยวและมีสีผิดปกติ อาการที่พบส่วนใหญ่จะเด่นชัดในใบอ่อนในช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วง อาการเกิดทั่วไปบนใบ เชื้อบริสุทธิ์ จาก dasheen mosaic virus(DMV) จะแสดงอาการ

ใน *Colocasia esculenta*

Chase และ Zettler (1982) รายงานว่า การเข้าทำลายของ DMV พบเป็นส่วนใหญ่ใน *Dieffenbachia* ทั้ง *D. maculata* และ *D. amoena* และพวก nonaroid ที่มีความอ่อนแอต่อเชื้อนี้ คือ *Datura stramonium* จะเกิดอาการของโรคไวรัส

ชนิดของพืชอาศัย Tompkins และ Gardner (1934) รายงานว่า พืชที่ใช้ทดสอบในการถ่ายทอดเชื้อ DMV คือ *Apium gravolens rapacean* DC. 'Giant Praque' , *Capsicum annuum* L. 'California Wonder' , *C. annuum* 'Tabasco' , *Carica papaya* L. , *Cassia occidentalis* L. , *Chenopodium amaranticolor*. Coste & Reyr., *Crotalaria spectabilis* Roth, *Cucurbita pepo* L. 'Small Sugar' , *Datura stramonium* L. , *Gomphrena globosa* L. , *Lupinus angustifolius* L. , *Nicotiana tabacum* L., 'Samsun NN' , *N. tabacum* 'Samsun Turkish' , *Phaseolus vulgaris* L. 'Red Kidney' , *Pisum sativum* L. 'Alaska' , *Sorghum vulgare* Pers. 'E-57' , *Tropacolum majus* L. , *Vicia faba* L. 'Longpod' , *Vigna sinensis* (L.) Endl. 'Black Local' , *Zea mays* L. 'Golden Cross Bantam' *Z. mays* 'Ioana' พบว่าสามารถใช้เป็นพืชอาศัยในการถ่ายทอดเชื้อ DMV ได้ Alconero (1971) รายงานว่าเชื้อ DMV ไม่แสดงอาการบนพืชทดสอบพวก *Beta vulgaris, Cucumis sativus* 'Marketer', *Cucurbita pepo, Datura stramonium, Gomphrena globosa, N. clevelandii, N. glutinosa, N. rustica, N. tabacum* 'White Burley' and 'Samsun', *Phasiolus aureus, P. vulgaris* ' La Victoire'

การถ่ายทอดเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นการถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ดบนพืชทดสอบตระกูล aroid 2 ชนิด คือ *Philodendron selloum* และ *Z. elliottiana* รวมทั้งพืชไม่มีเมล็ดในตระกูล nonaraceous สามารถถ่ายทอดเชื้อ DMV ได้โดยวิธีกล Verplancke (1930) รายงานว่า การถ่ายทอดโดยวิธีกล 'filterable virus' ที่ปลูกเชื้อบน aroids คือ Anthurium , Monstera , *Philodendron* และ *Zantedeschia* Tompkins และคณะ (1934) รายงานว่า พบการถ่ายทอดเชื้อ DMV ใน calla lily (*Zantedeschia* spp.) Raychaudhuri และ Gunguly (1965) รายงานว่าเชื้อ DMV ถูกถ่ายทอดโดยใช้เพลี้ยอ่อน *Aphis craccivora* Koch และ *Myzus persicae* (Sulzer) ซึ่งเลี้ยงบนพืชที่ปลอดไวรัสพวก *Vicia faba* L 'Longpod' และ *Nicotiana tabacum* L. 'Samsun NN' ส่วน Hartman (1974) ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ โดยใช้เพลี้ยอ่อนจากใบ Dasheen ที่เป็นโรคจากแหล่งที่เป็นโรคไวรัส และจาก *P. selloum* พบว่าเพลี้ยอ่อนสามารถถ่ายทอดเชื้อได้เพียงเล็กน้อย และเพลี้ยอ่อนจะตายภายใน 1-6 ชั่วโมง

การปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ Verplancke (1930) รายงานว่า การถ่ายทอดเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ไปยังพืชตระกูล nonaraceous ที่อ่อนแอต่อเชื้อไวรัสนี้ โดยการทำแผลด้วย

celite ในการปลูกเชื้อจากใบที่เป็นโรคของ *R. africana* หลังจากนั้นไว้ในที่ร่มอุณหภูมิ 18 - 24°C จากการสังเกตพบว่า น้ำคั้นจากใบ *R. africana* เมื่อนำมาเจือจางในพืชที่เคยเป็นพืชอาศัย จะแสดงอาการบนใบของ *Chenopodium amaranticolor, C. quinoa, C. ambrosioides, Nicotiana benthaniana* และ *Saponaria vaccaria* ใน *C. quinoa* และ *N. benthaniana* จะมีอาการ local chlorotic spots Raychaudhuri และ Gunguly (1965) รายงานว่า การปลูกเชื้อโดยวิธีกลของน้ำคั้นจากใบพืช และทำให้เจือจางโดยน้ำประปา การปลูกเชื้อใช้ carborandum ทำแผลที่ใบของพืชทดสอบ พืชที่ใช้ทดสอบควรเป็นพืชที่ปลูกจากเมล็ด ประมาณ 2 - 3 สัปดาห์หลังการปลูกเชื้อ น้ำคั้นจะทำให้เป็นโรคและมีอาการบนพืชทดสอบ และเพิ่มจำนวนขึ้นหลังการปลูกเชื้อ ซึ่งตรวจสอบได้จากอนุภาคไวรัส การศึกษารายละเอียดของไวรัสจากใบ *Colocasia esculenta* (L.) Schott ที่เป็นโรคและ อาการบน *Dieffenbachia* ที่พบหลังจากการปลูกเชื้อมี 3 รูปแบบ (Bos,1970) คือ อาการแรกจะมีอาการที่ไม่รุนแรงตามด้วยอาการเรื้อรัง และจะรุนแรงขึ้นอย่างช้าๆ จนในที่สุดจะตาย สำหรับพันธุ์ 'Perfection' และ 'Lemon' จะมีอาการด่าง ต่อมาจะมีอาการบิดเบี้ยวที่ใบใหม่และอาการจะหายไป และในที่สุดจะพบว่ามีอาการแคระแกรนและใบหด อาการที่สองพบอาการบน *D. maculata* และ *D. amoena* มีอาการจุดเฉพาะที่บนใบหลังการปลูกเชื้อ 10 - 20 วัน จุดจะขยายเป็น necrotic บนใบแก่ และขยายเป็น necrotic spots บนใบใหม่ พืชจะตายภายใน 60-70 วัน และอาการที่สาม คือ อาการ necrotic ที่พบจะขยายใหญ่ขึ้นบนใบที่ปลูกเชื้อ และพืชจะตายภายใน 25-45 วัน น้ำคั้นจากใบ *Philodendron selloum* ของเชื้อ DMV จะพบว่าจุดที่เป็น dilution end point อยู่ที่ 10^{-2} - 10^{-3} อุณหภูมิที่เชื้อยังคงสภาพอยู่ระหว่าง 60 - 65°C และคงสภาพที่อุณหภูมิห้อง 75 ชั่วโมง การปลูกเชื้อทำโดยใช้น้ำคั้น แต่เมื่อนำพืชอาศัย ไปทำการปลูกเชื้อกลับบน *Philodendron selloum* ไม่ประสบความสำเร็จ

Verplancke(1930) รายงานว่า พืชพวก Araceous มีการทดสอบใน calla lily (*Z. elliottinia*) มีการเตรียมตัวอย่างโดยวิธี dip ของ Brandes เพื่อตรวจสอบอนุภาคของไวรัสในน้ำคั้นจากพืชทั้งหมดโดยการตรวจสอบด้วยวิธี negative stainใน1%potassium phosphotungstate ที่ pH 7.75 พบอนุภาคคดงอ (flexous-rod) Edwardson (1966) ได้ทำการศึกษาวิธีการตัด ultra-thin section ของใบ dasheen ที่เป็นโรค นำมาแช่ใน 6.25 % glutaraldehyde และแช่ใน 1% OsO4 สารทั้ง 2 ชนิดปรับค่า pH 6.8 ด้วย 0.1 M sodium phosphate ก่อนที่จะตรวจดูด้วยกล้องอิเลคตรอน ให้นำส่วนที่ถูกตัด section ย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate ตรวจพบอนุภาคเป็น pinwheels, circular inclusion, laminated aggregates และ bundles มีรูปร่าง 2 มิติ หรือ 3 มิติ และ tubular inclusion ซึ่งเป็นกลุ่มที่มี ความยาว 700-800 nm

intracellular inclusions ปกติเรียก inclusion bodies ซึ่งเกิดจากการทำลายของเชื้อไวรัส ในปี 1903 Iwanowski พบว่าใน cytoplasm ของโรคใบด่างยาสูบเป็นแบบ amorphous และ crystalline inclusions โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) เพื่อตรวจหาโครงสร้างของอนุภาค หลังการปลูกเชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วของ inclusion bodies การสังเกต inclusions ใน epidemal strips จากใต้ใบ ก้าน หรือลำต้นอ่อน Tompkins และคณะ (1934) ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดโดยวิธีกลของไวรัส flexous rod บนพืชกลุ่ม Araceous Brandes & Berks(1965) รายงานว่า อนุภาคที่พบจากใบ Dasheen ที่เป็นโรค 91% วัดความยาวได้ 700 - 800 nm ความยาวเฉลี่ยของ DMV 750 nm amorphous cytoplasmic inclusion ที่พบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในเนื้อเยื่อของใบ Dasheen ที่เป็นโรค และย้อมด้วย Calcomire orange และ 'Luxol' brilliant green เชื้อบริสุทธิ์จาก Dasheen เป็นตัวอย่างของไวรัสที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม Potato virus Y Samson และ Taylor (1968) ตรวจพบว่ามีไวรัสแบบ rod - shaped ในเนื้อเยื่อพืชในตระกูล calla lily Bos (1970) รายงานว่า ใน cytoplasm ของ *R. africana* พบว่าที่เซล epidermis มีinclusion ทรงกระบอกและมีอนุภาคไวรัสแบบ flexuous-rod เชื้อ DMV มีลักษณะของอาการของไวรัสแบบกลุ่ม potato virus Y DMV มีขนาดอนุภาคยาวประมาณ 750 nm. Hartman (1974) รายงานว่า การเกิด cytoplasmic inclusion ของเชื้อ DMV เหมือนที่พบในไวรัสกลุ่ม potyvirus

การใช้ ultrasonic ในการลดอนุภาค potato virus X (PVX) และ turnip mosaic virus เพื่อเพิ่มความสามารถในการแพร่ของอนุภาคด้วยวิธีการทดสอบ gel diffusion ซึ่งมีข้อเสียเนื่องจากต้องใช้ปริมาณของantiserumมาก แต่มีวิธีแก้ไข คือการใช้ทดสอบแบบ Immune diffusion drop test โดยแยกวุ้นที่มี antiserumผสมอยู่ลงใน petri dish และหยดส่วนผสมของ pyrrolidine น้ำคั้นจากพืช และวุ้นลงใกล้ๆกัน เมื่อแข็งตัวให้ดันหยดของน้ำคั้นเข้าหาหยดของ antiserum ปฏิกิริยาจะเป็นบวกเมื่อตะกอนของแต่ละหยดรวมกัน

Bercks (1972) ได้ศึกษาวิธีการทดสอบพืชด้วยวิธีการแพร่ในอาหารวุ้น ซึ่งสามารถทำได้ง่ายและมองเห็นด้วยตาเปล่ามีอยู่ 2 แบบคือ single diffusion และ double diffusion ใน single diffusion ตัวทำปฏิกิริยาจะเป็น antiserum ซึ่งจะรวมตัวกันในวุ้น ขณะที่เชื้อไวรัสจะแพร่เข้าไปหา ใน double diffusion ใช้ตัวทำปฏิกิริยา 2 ตัว โดยใส่แยกกันในวุ้นแล้วจะมีการแพร่เข้าหากัน วิธีการต่างๆ คิดค้นเพื่อลดขนาดของความยาวของอนุภาคของไวรัส ด้วยวิธี gel diffusion โดยใช้ pyrridine , pyrrolidine , ethanolamine และ quanine-HCl ผสม ทำให้เกิดปฏิกิริยาเร็วขึ้น เพื่อให้เกิดการแตกหักหรือตกตะกอนของโปรตีน ใน antiserum โดยใช้ผงซักฟอกหรือสารเคมีอื่นๆ วิธีต่างๆ จะบอกความแตกต่างของ non - specific precipitin line และถูกเลือกใช้กับเชื้อไวรัสแต่ละชนิด บางครั้งอาจใช้ antisera ในการลดขนาดของอนุภาค เพราะคุณสมบัติของ antigenic จะแตกต่าง

จากอนุภาคที่สมบูรณ์ สารที่ใช้ในการลดขนาดของอนุภาคไวรัสคือ sodium dodecyl sulphate(SDS) ซึ่งใช้SDS ในการลดขนาดของไวรัสในน้ำคั้นของพืช (crude sap extracts) ด้วยวิธี double diffusion วิธีมาตรฐานใช้ SDS 0.5 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร gel และ 1.5 % ในสารสกัดจากพืช เพราะ non - specific precipitin สามารถแสดงผลการทดสอบออกมาได้ เช่น SDS กับ antiserum ; antiserum กับน้ำคั้นจากพืช (plant sap) หรือ ระหว่างน้ำคั้นจากพืชที่ต่างชนิดกัน

Ball (1974) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธุ์ทางเซรุ่มวิทยา โดยทดสอบด้วยวิธี Ouchterlony agar-gel double diffusion tests โดยนำเชื้อไวรัสที่บริสุทธิ์มาทดสอบการแพร่ผ่านตัวกลาง ซึ่งประกอบด้วย ion agar ความเข้มข้น 0.8% SDS ความเข้มข้น 0.5% และ sodium azide ความเข้มข้น 1% Hartman (1974) ใช้หลุมของ antigen ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm.จะพอดีกับหลุมของ antiserum ขนาด 5 mm. หลังจากนั้นจะช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยา โดยนำ plate มาใส่ในตู้บ่มเชื้อที่มีความชื้น อุณหภูมิ 24 °C สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง และถ่ายรูปไว้หลังจาก 48 ชั่วโมง

Abo El-nil และคณะ (1977) ได้ศึกษาเทคนิคการทำ DMV ให้บริสุทธิ์จากใบ *Philodendron selloum* ที่เป็นโรคและยังมีการยืนยันคุณสมบัติทางด้านกายภาพ แอนตีเซรัมมีความเฉพาะเจาะจงในการทดสอบ โดยวิธี immunodiffusion test ความสัมพันธ์ของtitres DMV มีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยา กับเชื้อ blackeye cowpea mosaic และ tobacco etch virus แต่ไม่พบใน potato virus Y หรือ turnip mosaic virus

Zettler และคณะ (1970) รายงานว่า การใช้เทคนิค enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อตรวจสอบน้ำคั้นของพืชในตระกูล Araceae ที่มีเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ได้แก่ *Diefferenbachia picta* และ *Philodendron selloum* จากการอ่านผลที่เกิดขึ้นพบว่า *D. picta* มีค่าการดูดซับสูงกว่าใน *P. selloum*

Clark และ Adams (1977) ได้ทำการตรวจสอบไวรัสด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้เอนไซม์ alkaline , phosphatase และ polystyrene microtitre plates เคลือบด้วย Ig-G ที่สกัดจากแอนตีซีรัมของเชื้อที่ต้องการจะทดสอบ แล้วใส่น้ำคั้นของพืชลงไป บ่มที่ 4 °C และเทออก เติม เอนไซม์ conjugate ลงไป บ่มที่ 37 °C ประมาณ 3-4 ชั่วโมง เทออกแล้วใส่ substrate (p-nitriphenylphosphate) ลงไป จะสังเกตเห็นปฏิกิริยาเป็นสีเหลือง และแสดงความเห็นว่า การเติม polyvinylpyrrolidone (PVP) นั้นเพื่อยับยั้ง tannin และ polyphenolic compound

Chase และ Zettler (1982) รายงานว่า การผลิตพืชที่ปราศจากโรค ทำโดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งประสบผลสำเร็จและลดความสูญเสียลงได้ พืชที่ปราศจากโรคพวก *Dieffenbachia maculata* (Lodd.) G. Don 'Perfection' สามารถนำมาใช้ในการผลิตเมล็ดพันธุ์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลองแบ่งเป็น

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส

เมล็ดพันธุ์ถั่วเขียว ถั่วเหลือง ถั่วแดง ถั่วฝักยาว ถั่วผี ถั่วลิสง แตงโม แตงกวา แตงไทย ฟักทอง ฟักเขียว บวบเหลี่ยม ต้นกล้ายาสูบใบใหญ่ และต้นกล้า *Chenopodium amaranticolor C. quinoa* ถุงพลาสติกสีดำ ดินผสม โกร่ง ปิเปต ใบพืชที่เป็นโรค บัวรดน้ำ กระดาษหนังสือพิมพ์

2. อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจดู inclusion bodies

สไลด์ cover slip กล้องจุลทรรศน์ เข็มเขี่ยเชื้อ ใบพืชปกติและใบพืชที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส (virus - like diseases)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Ouchterlony agar gel double diffusion test

จานเลี้ยงเชื้อ cork borer เบอร์ 1 มีดผ่าตัด บีกเกอร์ โกร่ง เครื่อง centrifuge ปากกา

4. สารเคมีที่ใช้ปลูกเชื้อไวรัส

phosphate buffer 0.1 Molar pH 7.5 (การเตรียม buffer อยู่ในภาคผนวก)

celite No. 545

5. สารเคมีที่ใช้ตรวจดู inclusion bodies

สารละลาย rose bengal ความเข้มข้น 0.5%

oil immersion

lactophenol

6. สารเคมีที่ใช้ทำ ouchterlony agar gel double diffusion test

(การเตรียม agar gel อยู่ในภาคผนวก)

สารละลาย formvar ความเข้มข้น 1% ละลายใน chloroform

สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1.8 % ใช้สำหรับบดใบพืช

7. antiserum ของเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร

วิธีการศึกษา

1. การศึกษาอาการบนไม้ประดับ

ในการศึกษาอาการบนไม้ประดับในครั้งนี้ เป็นการสำรวจในเขตกรุงเทพมหานคร โดยในระยะแรกจะทำการออกไปสำรวจอาการของพืชตามแหล่งที่มีการขยายพันธุ์พืช และแหล่งที่ทำการซื้อขายพันธุ์พืชทั่วไป โดยจะเน้นอาการด่างบนไม้ประดับ ซึ่งอาการที่พบนั้นยังไม่แน่ใจว่าเป็นอาการด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัสหรือไม่ ดังนั้นจึงนำพืชที่ได้จากการสำรวจมาปลูกไว้ในโรงเรือน และคอยสังเกตอาการที่เกิดขึ้นว่ามีการเปลี่ยนแปลง หรือไม่เปลี่ยนแปลงอย่างไร จดบันทึกลักษณะที่สังเกตเพื่อจะได้ทราบรายละเอียดและข้อแตกต่างของอาการ

2.การศึกษาพืชอาศัยชนิดต่าง ๆโดยการปลูกเชื้อจากน้ำคั้นพืช(sap transmission) ซึ่งมีอาการคล้ายไวรัส

การศึกษาแบ่งออกเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

ตอนที่ 1 การเตรียมปลูกพืชอาศัยชนิดต่างๆ (ตามตารางที่ 1)

1. นำดินผสมมาใส่ถุงพลาสติกสีดำ ประมาณ 3/4 ถุง และพับปากถุงลง
2. นำเมล็ดพันธุ์พืชแต่ละชนิด (ตามตารางที่ 1) ลงปลูกในถุงพลาสติก
3. เขียนชื่อชนิดของแต่ละพืช และติดลงบนถุงพลาสติก
4. ดูแลรดน้ำจนพืชงอกและเจริญเติบโตจนถึงระยะที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ

ตอนที่ 2 การปลูกเชื้อลงบนพืชอาศัย

1. นำพืชทดสอบจากตอนที่ 1 มา คลุมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ 24 ชั่วโมง เพื่อให้พืชอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ ก่อนที่จะทำการปลูกเชื้อ
2. นำใบพืชที่เป็นโรคมาทำการบดใน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 โมล่าร์ pH 7.5

และ phosphate buffer ผสม PVP ความเข้มข้น 2% และphosphate buffer ผสมPVP ความเข้มข้น 5% เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของ buffer ในการถ่ายทอดเชื้อ โดยใช้โกร่งที่แช่เย็นประมาณ 4°C (เพื่อรักษาสภาพของเชื้อ) โดยใช้ใบพืช : buffer ในอัตราส่วน น้ำหนัก : ปริมาตร = 1 : 4 และ 1 : 8

3. ใส่ผง celite ลงไปในโกร่งที่ทำการบดใบพืช
4. ก่อนทำการปลูกเชื้อ ล้างมือด้วยสบู่ เพื่อป้องกันการติดเชื้อของเชื้อไวรัสตัวอื่น
5. ใช้นิ้วมือจุ่มน้ำคั้นและทาบนใบพืชทดสอบจากโคนใบไปยังปลายใบ
6. ล้างส่วนที่ตกค้างบนใบพืชทันที
7. label ลงวันที่ ชนิดของพืชที่ใช้ปลูกเชื้อ
8. ใช้กระดาษหนังสือพิมพ์คลุมและพรมน้ำให้เปียก ทิ้งไว้ข้ามคืน
9. เปิดกระดาษหนังสือพิมพ์ออกและรดน้ำตามปกติ
10. สังเกตอาการที่เกิดขึ้นหลังจากการปลูกเชื้อ

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อพืชอาศัยชนิดต่างๆที่ใช้ทดสอบ

Family	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ	ชื่อสามัญภาษาไทย
Solanaceae	*Nicotiana tabaccum* L.	Tobacco	ยาสูบใบใหญ่
Chenopodiaceae	*Chenopodium amaranticolor*	Goosefoot	–
	Chenopodium quinoa Willd	Quinoa	–
Leguminosae	*Phaseolus aureus* Roxb.	Mung bean	ถั่วเขียว
	Phaseolus calearatus Roxb.	Read bean	ถั่วแดง
	Glycine max (L.) Merr.	Soybean	ถั่วเหลือง
	Vigna sesquipedalis Fruw	Yard long bean	ถั่วฝักยาว
	Vigna sinensis	Cowpea	ถั่วผี
Cucurbitaceae	*Citrullus vulgaris* Schard.	Watermelon	แตงโม
	Cucumis sativus L.	Cucumber	แตงกวา
	Cucumis melo L.	Muskmelon	แตงไทย
	Cucurbita moshata (Duch.)	Pumpkin	ฟักทอง
	Benicase hispida Cogn.	Wax gourd	ฟักเขียว
	Luffa acutangula L. Roxb.	Angled loofah	บวบเหลี่ยม

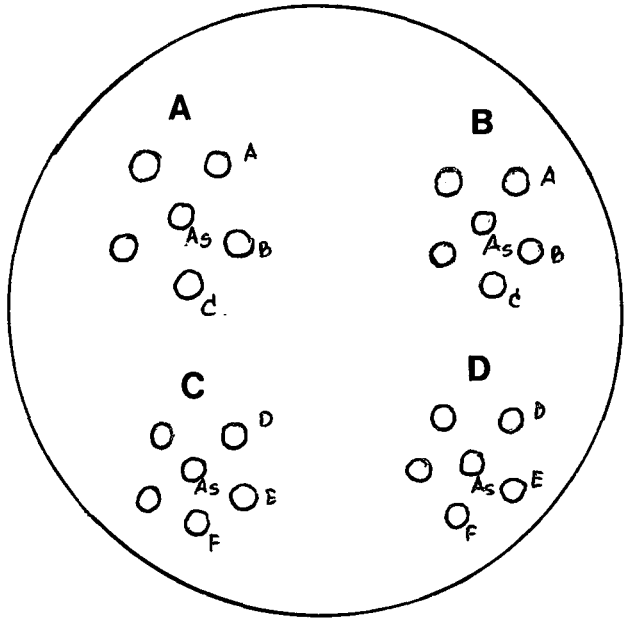
3. การตรวจดู inclusion bodies

1. นำเอาใบพืชที่เป็นโรคไวรัสมาทำการลอกเอาชั้น epidermis โดยใช้มีดโกนคมๆช่วย
2. ย้อมด้วยสารละลาย rose bengal ความเข้มข้น 0.5 % ประมาณ 1-2 นาที
3. ล้างด้วยน้ำกลั่น และวางชิ้นส่วนของ epidermis บนสไลด์ ที่มีหยดน้ำอยู่
4. ปิดด้วย cover slip
5. แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

4. การทำ Ouchterlony agar-gel double diffusion test

1. นำใบพืชที่เป็นโรคมาบดในโกร่งด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1.8 %
2. เข้าเครื่อง centrifuge รอบต่ำเพื่อให้เศษพืชตกตะกอน แยกส่วนที่เป็นน้ำใสด้านบนออก
3. เตรียม plate ที่สะอาด และเคลือบด้วยสารละลาย formvar 1% ละลายใน chloroform
4. เตรียม agar gel (วิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก) และเทบน plate ที่เคลือบด้วย formvar
5. รอให้ agar gel แข็งตัว แล้วใช้ cork borer No. 1 เจาะตามแบบมี 4 กลุ่ม/ plate
6. หยด antiserum ที่ตรงหลุมกลางของแต่ละกลุ่ม และหยด antigen (น้ำคั้นจากใบพืช) ลงในหลุมที่อยู่รอบๆ
7. หลังจากนั้นปิดฝา plate แล้วหุ้มด้วยพาราฟิล์ม เพื่อให้มีความชื้นอยู่ตลอดเวลา วางในกล่องที่มีฝาปิดทิ้งไว้ข้ามคืน
8. สังเกตปฏิกิริยาระหว่าง antiserum และ antigen ถ้าไม่ปรากฏปฏิกิริยาภายใน 24 ชั่วโมงแรก นำ plate ใส่ในตู้เย็นและสังเกตปฏิกิริยาต่อไป

แบบของ plate ที่เจาะด้วย cork borer



A = พลูฉุ

B = เดหลี

C = พุดด่าง

D = หนวดปลาหมึก

E = ไผ่ฟิลิปปินส์

การทำ Ouchterlony agar-gel double diffusion test

- ใช้ antiserum ดังนี้ dasheen mosaic virus (DMV) 1 : 20 dilution
  dasheen mosaic virus (DMV) 1 : 5 dilution
  cucumber mosaic virus (CMV) undiluted
  potato virus Y (PVY) undiluted
  tobacco mosaic virus (TMV) 1 : 4 dilution

5. การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนได้รับความอนุเคราะห์จากเจ้าหน้าที่ของกลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร บางเขน โดยการนำตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการด่างมาตรวจสอบอนุภาคของเชื้อ ด้วยวิธี leaf dip และการตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาด้วยวิธี immunosorbent electron microscopy (ISEM) กับ antiserum ของเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายไม้ประดับหลายชนิด

ผลการทดลอง

1. การศึกษาอาการบนไม้ดอกไม้ประดับ

พลูฉลุ (Window leaf)

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของพลูฉลุ

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Monstera oblique expilata*

เป็นไม้เลื้อย ลำต้นสีเขียว มีรากแตกออกตามข้อ ใบมีลักษณะรูปพาย โคนใบมน ปลายใบเรียวแหลม ก้านใบยาว โคนใบเป็นกาบหุ้มลำต้น แผ่นใบมีรูฉลุทั่วไป ขยายพันธุ์โดยการตัดยอด หรือตัดต้นปักชำ มีลักษณะใบที่แปลกสะดุดตา จึงนิยมปลูกเป็นไม้กระถางปักหลักให้ลำต้นเลื้อยขึ้นเกาะหรือปลูกใต้ร่มไม้ใหญ่เป็นแปลงใหญ่ๆ

อาการ

มีลักษณะใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม อาการใบด่างไม่ชัดเจนเป็นสีเขียวเข้มสลับสีเขียวปนเหลืองและใบหด ไม่เรียบ เสียรูปร่าง จะมีอาการบิดเบี้ยว ใบหยาบกระด้าง และจากการนำต้นพลูฉลุที่เป็นโรคมาเก็บไว้ในโรงเรือน พบว่าการเจริญเติบโตจะชะงักลงเมื่อเปรียบเทียบกับพลูฉลุปกติโดยสังเกตจากใบจะมีขนาดเล็กลงและมีจำนวนใบน้อยกว่าต้นปกติ

เดหลีเล็ก

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของเดหลี

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Spathiphyllum floribundum*

เป็นไม้ล้มลุกโคนใบโค้งมน ปลายใบเรียวแหลม ก้านใบยาว แผ่นใบมีลักษณะเป็นมัน ขอบใบโค้งงอเล็กน้อย

อาการ

มีลักษณะใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม อาการด่างจะเป็นแถบขนานไปตามเส้นใบ ใบจะมีขนาดเล็กลงกว่าปกติและอัตราการเจริญเติบโตช้า

พุดด่าง

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของพุดด่าง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Gardinia collinsae* Craib

เป็นไม้พุ่มยืนต้นอยู่ในวงศ์ Rubieae ลำต้นสีน้ำตาลปนดำ ใบลักษณะรูปทรงวีโคนและปลายใบแหลมมีใบแตกกิ่งตามลำต้น มีเส้นใบชัดเจน จากการที่มีลักษณอาการใบด่าง ทำให้นิยมใช้เป็นไม้ประดับ

อาการ

มีลักษณะอาการด่างสีเขียวสลับสีเขียวปนเหลืองใบที่เป็นโรคจะมีขนาดเล็กกว่าใบอื่นๆในต้นเดียวกัน ใบจะบิดเบี้ยวเสียรูปร่าง อัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ มีลักษณะแคระแกรน

ไผ่ฟิลิปปินส์

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของไผ่ฟิลิปปินส์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dracena* sp.

เป็นไม้ในวงศ์ Gramineae เป็นไม้ยืนต้น ใบมีลักษณะเหลียวแหลม ยาว ก้านใบสั้น ลำต้น และกิ่ง มีกาบหุ้ม

อาการ

ใบมีลักษณะด่างวงแหวน (Ring spotting) คือมีแผลจุดสีเหลืองชัดเจน มีวงแหวนรอบๆ กระจายบนใบไปทั่วต้น การเจริญเติบโตจะช้าลง

<u>หนวดปลาหมึก</u> (Octopus tree, Umbrella tree)

<u>ภาพที่ 5</u> แสดงลักษณะอาการภายนอกของโรคไวรัสของหนวดปลาหมึก

<u>ชื่อวิทยาศาสตร์</u> *Brassaia actinophylla* Endl.

เป็นไม้ยืนต้น ใบมีลักษณะโค้งมน หนา ใบแตกออกเป็นแฉกคล้ายหนวดปลาหมึก ลำต้นเป็นไม้เนื้อแข็ง

<u>อาการ</u>

รูปทรงของใบมีอาการผิดไปจากปกติ คือ ขนาดของใบจะเล็กลงกว่าขนาดปกติ ใบมีลักษณะบิดเบี้ยว และโค้งงอ

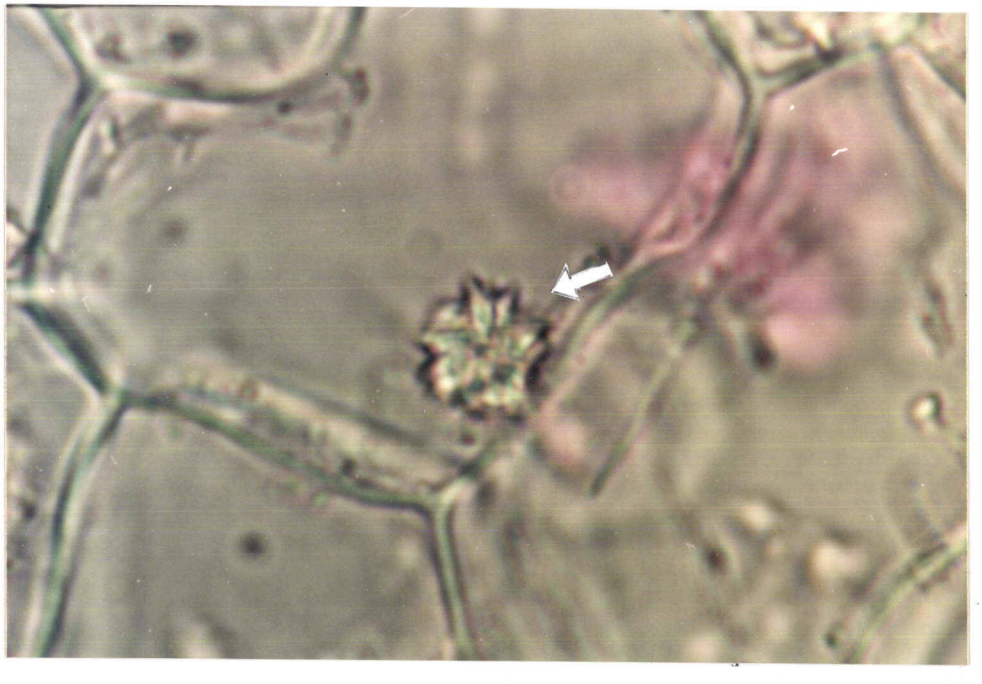
99024

2.การศึกษาพืชอาศัยชนิดต่าง ๆโดยการปลูกเชื้อ

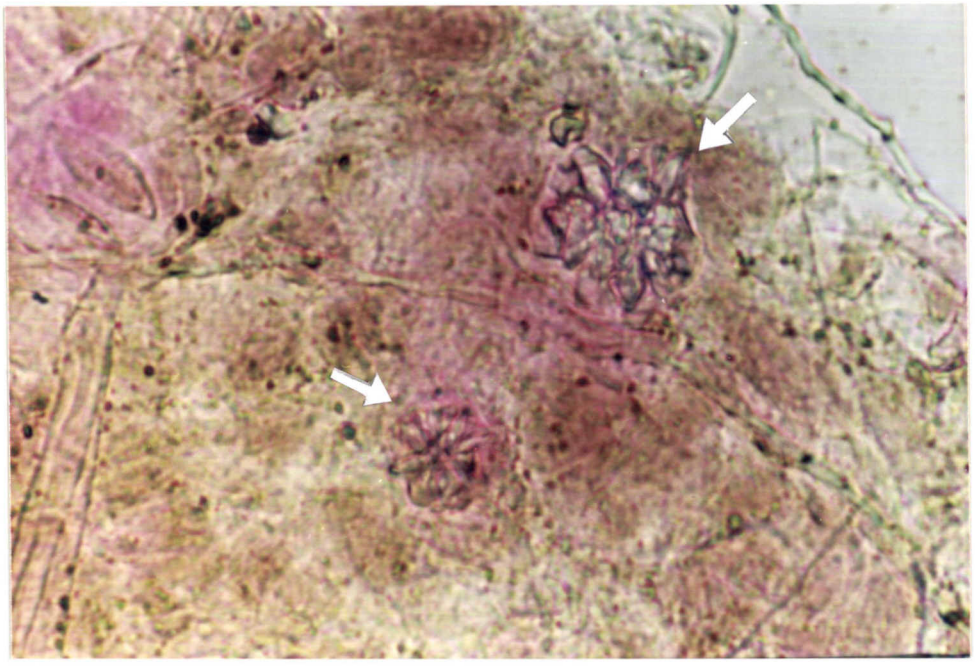
หลังจากการปลูกเชื้อประมาณ 1 - 3 อาทิตย์ ไม่ปรากฏอาการของการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสบนพืชทดสอบทุกชนิด (ตามตาราง) ที่ทำการศึกษา

3. การตรวจดู inclusion bodies

จากการส่องดูเซลพืชชั้น epidermis ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้สังเกตพบ inclusion bodies ในเซลพืชชั้น epidermis ของเดหลี และของหนวดปลาหมึก ซึ่งมีรูปร่างลักษณะคล้ายรูปดาว ส่วนพลูจลุ , พุดด่าง และไผ่ฟิลิปปินส์ ไม่พบ inclusion bodies



ภาพที่ 6 แสดงลักษณะของ inclusion bodies ใน epidermis ของใบเดหลี มีลักษณะคล้ายรูปดาว (ดูที่ลูกศรชี้)



ภาพที่ 7 แสดงลักษณะของ inclusion bodies ใน epidermis ของใบหนวดปลาหมึก มีลักษณะคล้ายรูปดาว (ดูที่ลูกศรชี้)

4. การทำ Ouchterlony agar-gel **double diffusion test**

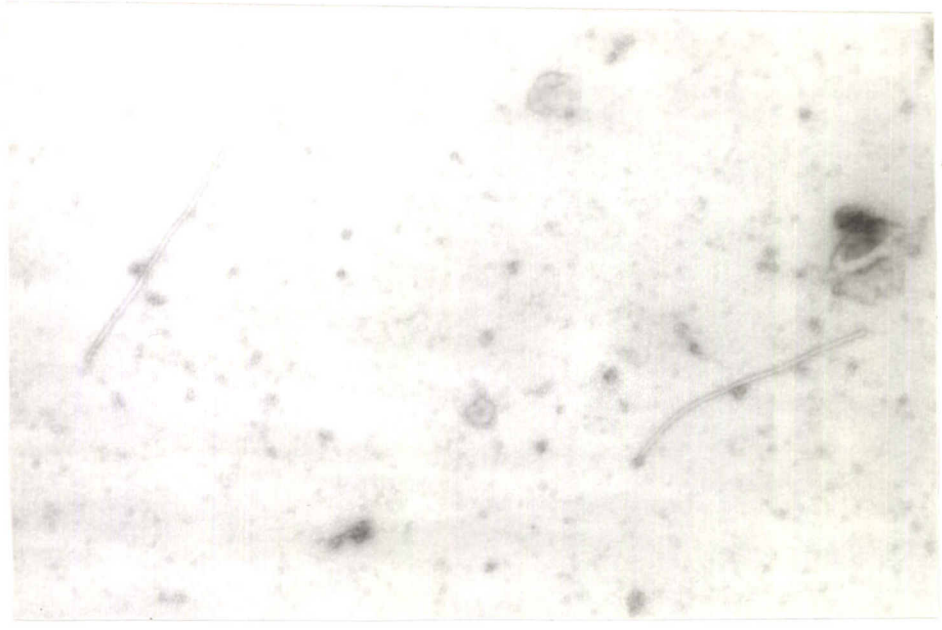
จากการสังเกตปฏิกิริยาที่จะเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงแรกและหลังจากที่นำตัวอย่างไปใส่ในตู้เย็น ผลคือไม่ปรากฏปฏิกิริยาระหว่าง antiserum และ antigen ในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา

5. การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การตรวจสอบน้ำคั้นจากใบพืชที่แสดงอาการด่าง 5 ชนิด ได้แก่ เดหลี (*Spathiphyllum floribundum*) พลูฉลุ (*Monstera oblique expilata*) พุดด่าง (*Gardinia collinsae* Craib) หนวดปลาหมึกด่าง (*Brassaia actinophylla* Endl.) และไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracena sp.*) โดยวิธี leaf dip พบอนุภาคเชื้อไวรัสลักษณะยาวคดงอ (flexous rod) ความยาวประมาณ 650 - 700 นาโนเมตร จากใบพลูฉลุและเดหลี (ภาพที่8) ส่วนตัวอย่างจากใบไผ่ฟิลิปปินส์ หนวดปลาหมึก และพุดด่าง ไม่พบอนุภาคของเชื้อ

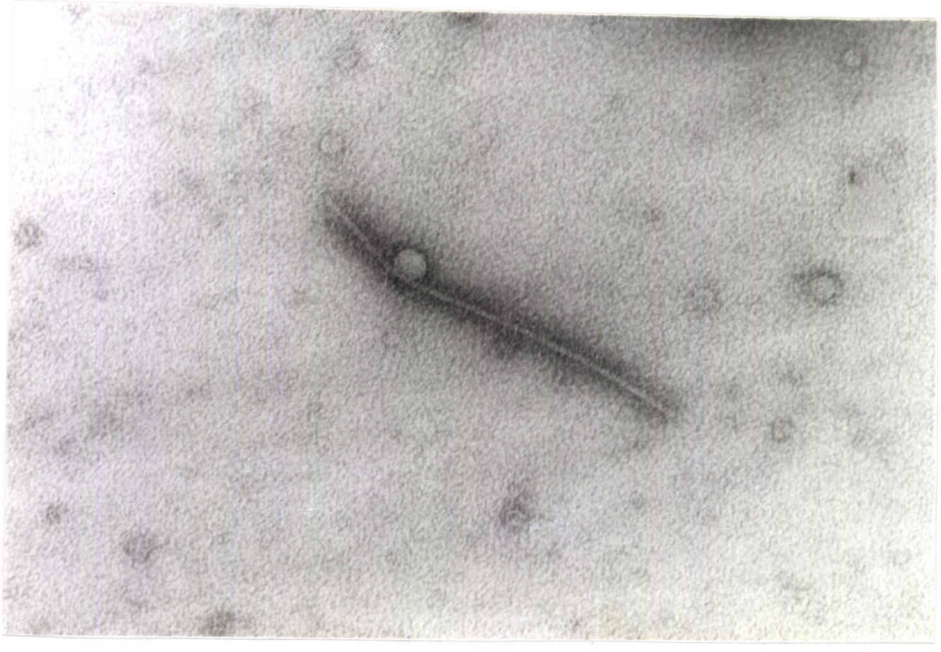
นอกจากนี้การตรวจสอบปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยาโดยวิธี ISEM กับ antiserum ของเชื้อ DMV พบว่า อนุภาคของเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นใบเดหลีเป็นตัวอย่างเดียวที่เกิดปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา ปรากฏเป็นตะกอนทึบรอบอนุภาคของเชื้อไวรัส (ภาพที่ 9)

14656



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นใบเดหลี ลักษณะยาวคดงอ (flexous rod) ความยาว 650 นาโนเมตร โดยวิธี leaf dip กำลังขยาย 25,000 เท่า

ห้องสมุดกลาง [illegible] การเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง



ภาพที่ 9 แสดงลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นใบเดหลี ถูกเคลือบด้วย antiserum ของเชื้อ DMV โดยวิธี ISEM กำลังขยาย 25,000 เท่า

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการสำรวจอาการโรคไวรัสบนไม้ประดับ พบว่าต้นเดหลี ต้นพลูฉลุ ต้นหนวดปลาหมึก ต้นไผ่ฟิลิปฟินส์ และต้นพุดด่าง มีลักษณะอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส (virus - like disease) โดยเฉพาะจะพบว่าไม้ประดับส่วนใหญ่ มีอาการใบด่าง (mosaic)และมีอาการแคระแกรน รวมทั้งอัตราการเจริญเติบโตก็ลดลงกว่าพืชที่ปกติ

การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อ โดยใช้น้ำคั้น (sap transmission) ในการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ ซึ่งหลังจากการปลูกเชื้อไม่พบอาการใดๆบนพืชทดสอบ และไม่มีความแตกต่างกันในกรณีที่ใช้ buffer ต่างชนิดกันในการทดสอบพืชทุกชนิด การที่พืชทดสอบไม่แสดงอาการของโรคให้เห็น อาจเนื่องมาจากพืชนั้นไม่จัดอยู่ในชนิดของพืชอาศัยของเชื้อ หรืออาจเนื่องมาจาก สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม คือ อุณหภูมิอาจสูงเกินไป และขั้นตอนในการปลูกเชื้อคือ ขณะที่ทาน้ำคั้นลงบนใบพืช ถ้าทำเบาเกินไปผงcelite จะไม่ทำให้เกิดบาดแผล หรืออาจจะเกิดบาดแผลน้อยเกินไป ทำให้เชื้อไวรัสเข้าสู่ใบพืชได้ยาก และควรเลือกปลูกเชื้อในพืชทดสอบที่เป็นต้นอ่อน เพราะพืชจะอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการแสดงอาการของโรคไวรัส คือ พันธุกรรม เชื้อจะเข้าทำลายพืชต่างกันขึ้นกับ โปรตีนของพืช อายุของพืชอาศัย พืชอาศัยที่มีอายุน้อยจะอ่อนแอต่อการเกิดโรค และอิทธิพลทางด้านสิ่งแวดล้อม ประกอบด้วย ความเข้มของแสง อุณหภูมิ ธาตุอาหาร และมีพืชอาศัยแคบ (Rona และคณะ, 1983)

การถ่ายทอดทางน้ำคั้นสำหรับไม้ยืนต้น หรือไม้เนื้อแข็ง อาจจะเป็นไปได้ยาก เนื่องจากมีความเข้มข้นของเชื้อไวรัสต่ำ และไม่ค่อยคงสภาพอยู่ในไม้ยืนต้นนานนัก ส่วนใหญ่จะมีสารที่มายับยั้งหรือทำให้เชื้อไวรัสเสื่อมสภาพ เช่น phenolic compound ที่ถูกปลดปล่อยออกจากเซลในขณะที่มีการบดใบพืช และมีการสูญเสียความสามารถในการก่อเชื้อไวรัสเนื่องจากสาร inhibitor และ inactivator จะยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ (Coaroll และคณะ, 1979)

ในการตรวจหา inclusion bodies พบในพืชเพียง 2 ชนิด คือ เดหลี และหนวดปลาหมึก ลักษณะของ inclusion bodies มีลักษณะคล้ายรูปดาว การตรวจดู inclusion bodies เราไม่สามารถทราบได้ว่าอนุภาคของเชื้อไวรัส เข้าไปอยู่ที่องค์ประกอบส่วนใดของพืช ก้าน ลำต้นอ่อน หรือว่าที่ใต้ใบ (Bawden, 1964)

การศึกษาโดยวิธี Ouchterlony agar-gel double diffusion test ไม่ปรากฏปฏิกิริยาระหว่าง antiserum และ antigen เนื่องจากการทำ Ouchterlony agar-gel double diffusion test ใช้ทดสอบกับพืชอาศัยในธรรมชาติได้ยาก เพราะมีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำ หรืออาจมีสิ่งรบกวนในปฏิกิริยาของน้ำคั้น โดยเฉพาะความเข้มข้นและอัตราการแพร่กระจายของน้ำคั้นจากใบพืช ขนาดช่องว่างใน

gel, pH, electrolyte concentration, และอุณหภูมิในการบ่ม ตลอดจนการใช้สาร reactants ตัวใดตัวหนึ่งมากเกินไป จะทำให้มองเห็นปฏิกิริยาไม่ชัดเจน ดังนั้นควรใช้ในปริมาณที่พอเหมาะ ปัญหาหลักในการทำ Ouchterlony agar-gel double diffusion test ส่วนใหญ่เกิดจากไวรัสที่มีอนุภาคที่ยาว ทำให้ไม่สามารถแพร่ได้ เพราะช่องว่างระหว่างอนุภาคมีขนาดเล็ก (Berks และคณะ, 1972)

และจากผลการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน จากกรมวิชาการเกษตร ตรวจพบอนุภาคไวรัสลักษณะยาวคดงอ (flexous rod) ขนาดความยาวประมาณ 650 - 700 นาโนเมตร ในพืช 2 ชนิด คือ พลูฉลุและเดหลี ซึ่งจากความยาวและลักษณะของอนุภาคคาดว่าเชื้อไวรัสที่ตรวจสอบจัดอยู่ในกลุ่ม potyvirus ในขณะที่ตัวอย่างพืชอีก 3 ชนิดไม่พบอนุภาคของเชื้อ ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณของเชื้อไวรัสต่ำ

สรุปว่า พืชที่มีอาการคล้ายไวรัสและสามารถตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อไวรัสได้ คือ ต้นเดหลี จากการตรวจพบ inclusion bodies และพบอนุภาคของเชื้อไวรัสโดยวิธี ISEM และวิธี leaf dip ต้นหนวดปลาหมึกตรวจพบ inclusion bodies และต้นพลูฉลุตรวจพบอนุภาคของเชื้อไวรัสโดยวิธี leaf dip ส่วนต้นไผ่ฟิลิปปินส์และพุดด่างไม่สามารถตรวจพบปฏิกิริยาใดๆในการตรวจสอบ

เอกสารอ้างอิง

สะอาด บุญเกิด, จเร สถากร และทิพย์พรรณ สถากร. 2525. ชื่อพรรณไม้ในเมืองไทย. กองทุนจัดพิมพ์ตำราปาไม้. คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 657 หน้า.

ธีระ สูตะบุตร. 2535. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 310 หน้า.

Abo El-nil, M. M., Zettler, F. W. and E. Hiebert. 1976. Natural Occurrence of Dasheen Mosaic Virus in Egyptian Taro Colocasia antiquorum. Plant Disease 60 : 281-285.

Abo El-nil, M. M., Zettler, F. W. and E. Hiebert. 1977. Purification, Serology, and Some Physical Properties of Dasheen Mosaic Virus. Phytophathology 67: 1445-1450.

Alconero , R. and F. W. Zettler. 1971. Virus Infections of Colocasia and Xanthosoma in Puerto Rico. Plant Disease 56 : 320-321.

Alconero , R. 1972. Hot Water Treatments of Corns of Xanthosoma spp. Infected with Dasheen Mosaic Virus. Plant Disease 56 : 320-321 .

Ball , E. M. 1974. Serological Tests for the Identification of Plants Viruses. Plant Virol. Committee , Phytophathol. Soc. St. Paul , Minnesota. 31 p.

Bawden, F.C. 1964 . Plant Viruses and Virus diseases. The Ronald Press Company. New York. 361p.

Bercks , R. Koenig , R. and G. Querfurth. 1972. Plant Virus Serology. In Torrance , L. and R. A. C. Jones. 1981. Recent Developments in Serological Methodfs Suited for Use in Routine Testing for Plant Viruses. Plant Pathology 30 : 1-24.

Brandes , J. and R. Bercks. 1965. Gross Morphology and Serology as a Basis for Classification of Elongate Plant Viruses. Advances Virus. Res. 11 : 1-24.

Bos, L. 1970. Symptoms of Virus Disease in Plants. Oxford and IBH Publishing Co. Delhi, India. 206p.

Caoroll , T. W., Gossel , P. L. and D. L. Batchelor. 1979. Use of Sodium Dodecyl Sulfate in Serology Diagnosis of Barley Stripe Mosaic Virus in Embryos and Leaves. Phytophathology 69 : 12-14.

Chase, A. R. and F. W. Zettler. 1982. Dasheen Mosaic Virus Infection of Dieffenbachia Cultivars. Plant Disease 66 : 891-893.

Christae R. G. 1967. Rapid Staining Procedures for Differentiating Plant virus Inclusions in Epidermal Strips. Virology 31 : 268-271.

Clark , M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristic of the Microplate Method of Enzyme - Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. Journal of General Virology 34 : 475-483.

Hartman , R. D. and F. W. Zettler. 1972. Dasheen Mosaic Virus Infections in Commercial Plantings of Aroids in Florida. Phytophathology 62 : 804.

Hartman , R. D. 1974. Dasheen Mosaic Virus of Cultivated Aroids and Its Control by Seed Propagation and Culture of Shoot Tips. Ph.D. Dissertation. University of Florida. Gainesville. 80 p.

Plumb, R. T. and J. M. Thresh. 1983. Plant Virus Epidemiology. Blackwell Scientific Publications. Great Britain. 377p.

Rana, G. L. ., Vovlas, C. , and F. W. Zettler. 1983. Manual Transmission of Dasheen Mosaic Virus from *Richardia* to Nonaraceous Hosts. Plant Disease 67 : 1121-1122.

Raychaudhuri, S. P. and B. Ganguly. 1965. Further Studies on Chirke Disease of Large Cardamon. Indian Phythopathology 18 : 373-377.

Raychaudhuri, S. P. , 1977. Virus and Mycoplasma Diseases of Plants in India. Oxford & IBH Publishing CO. New Delhi. 102p.

Sampson , P. J. and R. H. Taylor. 1968. A Comparison of the Electron Microscope , Microprecipitin Tests and Indicator Plants for the Detection of Potato Viruses S, X and Y. Phythopathology 58 : 489-493.

Tompkins , C. M. and M. W. Gardner. 1934. Spotted Wilt of Head Lettuce. Phythopathology 24 : 1135-1136.

Torrance , L. and R. A. C. Jones. 1981. Recent Developments in Serological Methodfs Suited for Use in Routine Testing for Plant Viruses. Plant Pathology 30 : 1-24.

Verplancke , G. 1930. Une Maladie " A Virus Filterant" des Anthurium. Compt. Rend. Soc. Biol. 103 : 524-526.

Zettler , F. W., Foxe , M. J., Hartman , R. D. Edwardson , J. R. and R. G. Christae. 1970. Filamentous Viruses Infecting Dasheen and Other Araceous Plants. Phytophathology 60 : 983-987

ภาคผนวก

ภาคผนวก

1. การเตรียมสารละลาย buffer ที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส

Potassium phosphate buffer 0.1 M pH 7.5

1. ละลาย K_2HPO_4 (di - potassium hydrogen orthophosphate)
   17.4 g ใน 1 lit of water
2. เติม KH_2PO_4 (Potassium di - hydrogen orthophosphate)
   3.4 g ใน 250 ml

Buffer มี 3 ชนิด คือ

1. Potassium phosphate buffer
2. Potassium phosphate buffer ผสมกับ PVP ความเข้มข้น 2%
3. Potassium phosphate buffer ผสมกับ PVP ความเข้มข้น 5%

2. สูตรการเตรียม agar gel สำหรับการทดสอบ Ouchterlony agar-gel double diffusion test

สูตรการเตรียม agar gel สูตรที่ 1

agar	0.8	g
SDS	0.5	g
NaCl	0.9	g
NaN_3	1	g

สูตรการเตรียม agar gel สูตรที่ 2

Ion agar	0.8	%
SDS	0.2	%
NaCl	0.7	%
NaN_3	0.1	%

คณะเทคโนโลยีการเกษตร ท้องสมุด สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า