ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสในไม้ประดับบางชนิด โดยเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ

Detection of Virus Diseases on Some Ornamental Plants by Extraction of Double - Stranded RNA (ds RNA) Method

โดย

นายศราวุธ ทุบบาง

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ภาควิชาเทคโนโลยีการกำจัดศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2544

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ปริญญา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง
การตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสในไม้ประดับบางชนิด โดยเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ

Detection of Virus Diseases on Some Ornamental Plants by Extraction of Double - Stranded RNA (ds RNA) Method

โดย

นายศราวุธ ทุบบาง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

....
(ผศ.ดร.นวลพรรณ งามยี่สุ่น)
อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว
....
(รศ.ดร. วรเดช จันทรสร)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการกำจัดศัตรูพืช
วันที่.....21.....เดือน....พค.........................พ.ศ.2545

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสในไม้ประดับบางชนิด โดยเทคนิคการแยสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ

โดย : นาย ศราวุธ ทุบบาง

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา : นวลพรรณ งามยี่สุ่น 29 / พ.ค. / 2549

(ผศ.ดร. นวลพรรณ งามยี่สุ่น)

จากการสำรวจโรคไวรัสในไม้ประดับตามตลาดนัดต้นไม้ในกรุงเทพมหานคร พบกลุ่มอาการที่คล้ายกับการเข้าทำลายจากเชื้อไวรัสในพืชต่อไปนี้คือ กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum* (Pittieri)) สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* "Snowdrop") เดหลี (*Spathiphyllum wallisii*) ออมเงินออมทอง (*Syngonium podophyllum*) ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) หวายปอมปาดัวร์ (*Dendrobium pompadour*) และพริก (*Capsicum annuum* L.) อาการที่เกิดกับพืชเหล่านี้ ได้แก่ อาการด่าง หยิกงอและม้วนงอ อาการแคระแกรน ใบเปลี่ยนรูปร่าง โดยอาการมักจะเกิดกับใบอ่อน เมื่อนำใบอ่อนของพืชทั้ง 8 ชนิดมาทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสโดยเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ ปรากฏว่ามีเพียงกวักเงินเท่านั้นที่ pattern ปรากฏแถบของ dsRNA แยกตัวให้เห็น โดยวัดค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ $3.2x10^6$ $2.8x10^6$ $2.2x10^6$ $1.2x10^6$ และ $0.8x10^6$ dalton เมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลกับตัวมาตรฐาน Lambda DNA ซึ่งถูกย่อยสลายด้วย enzyme Hind III พบว่าเชื้อที่เข้าทำลายกวักเงิน คือ Cucumber mosaic virus (CMV) ส่วน pattern ของพืชอื่น ๆ ไม่ปรากฏแถบของ dsRNA แยกตัวให้เห็น

Abstract

Title : Detection of Virus Disease on Some Ornamental Plants by Extraction of Double-Strand RNA (dsRNA) Method

By : Mr. Sarawut Thupbang

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Major field : Plant Pest Management Technology

Advisor : ......N. Ngamyeesoon......... 29./5./2002

(Asst.Prof.Dr. Nualphan Ngamyeesoon)

Virus like-symptoms were found in eight ornamental plants by surveying at open market in Bangkok.These infected plants were *Dieffenbachia overstedii*, *Philodendron microstictum* (Pittitri), *Dieffenbachia picta* "Snowdrop", *Spathiphyllum wallisii*, *Syngonium podophyllum*, *Dracaena godseffiana*, *Dendrobium pompadour* and *Capsicum annuum* L..The symptoms showed among these infected plants were mosaic ,leaf distortion,leaf deformation and almost of these symptoms appeared on young leaf.The result of detection of virus on these plants by extraction of double-stranded RNA method showed dsRNA band only on *D. overstedii*.with molecular weight of $3.2x10^6$,$2.8x10^6$,$2.2x10^6$,$1.2x10^6$ and $0.8x10^6$ dalton. The comparison of dsRNA band from *D. overstedii*.with standand Lambda DNA Hind III digest concluded that cucumber mosaic virus (CMV) was the agent that infected *D. overstedii*.While no band pattern from other ornamental plants were detected on gel.

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์นวลพรรณ งามยิ่งสุ่น อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาแนะนำ ช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยและสมบูรณ์

ขอขอบคุณรุ่นพี่ปริญญาโทที่ทำงานเกี่ยวข้องกับปัญหาพิเศษเรื่องนี้ทุกท่าน ที่ทำให้ความช่วยเหลือและร่วมมือกัน ปรับปรุงวิธีการในระหว่างการทำปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยาที่ได้ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สจล. (ADB) ที่ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือ

ขอขอบคุณบิดามารดาที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านปัจจัยต่าง ๆ ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องช่วยเป็นกำลังใจและให้การช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

ศราวุธ ทุบบาง
พฤษภาคม 2545

สารบัญ

เนื้อเรื่อง	หน้า

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

คำนำ

ในปัจจุบันไม้ประดับ (ornamental plant) มีความจำเป็นในการใช้ชีวิตของสังคมปัจจุบัน มิใช่แต่ปัจจัย 4 เท่านั้นที่มีความจำเป็นโดยตรง แต่ความสวยงามและความสดชื่นสดใสทำให้ปัจจัย 4 นั้นมีความสำคัญมากขึ้น จะเห็นได้ว่าดอกไม้ประดับมีส่วนเข้ามาเกี่ยวข้องกับปัจจัย 4 มาก เช่น ที่อยู่อาศัยก็ต้องประกอบด้วยไม้ดอกไม้ประดับจึงจะทำให้ที่อยู่อาศัยนั้นสดใสน่าอยู่มากขึ้น ดังนั้นไม้ดอกไม้ประดับจึงเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจในปัจจุบัน ซึ่งความต้องการใช้ไม้ดอกไม้ประดับในตลาดโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ เฉลี่ยปีละ 11% โดยมีมูลค่าการจำหน่ายในตลาดโลกหลายหมื่นล้านบาท เช่นปี 2529 สูงถึง 85,629 ล้านบาท (บรรเจิด, 2534) สำหรับประเทศไทยไม้ดอกไม้ประดับ มีความสำคัญยิ่งต่อเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตและการส่งออกสูงมีความพร้อมทั้งด้านสภาพพื้นที่ปลูก ภูมิอากาศ แรงงานและการตลาด ทำให้ไม้ดอกไม้ประดับเป็นพืชกลุ่มหนึ่งที่ซึ่งถูกกำหนดให้แผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 6 ให้เป็นพืชส่งเสริมการผลิตเพื่อส่งออก เนื่องจากรัฐบาลเห็นว่าไม้ดอกไม้ประดับเป็นพืชที่ให้ค่าตอบแทนสูงและใช้พื้นที่น้อย ประกอบกับสภาพแวดล้อมของประเทศดังที่กล่าวมาแล้ว ในปัจจุบันประเทศไทยผลิตไม้ดอกไม้ประดับมากขึ้น โดยปี 2531 มีมูลค่าการส่งออกไม้ดอกไม้ประดับถึง 594.7 ล้านบาท เพิ่มขึ้นจากมูลค่าการส่งออกในปี 2530 ถึง 21 % (บรรเจิด 2534) จะเห็นได้ว่าไม้ดอกไม้ประดับจะเป็นสิ่งสำคัญต่อการพัฒนาประเทศแนวทางหนึ่ง แต่จากการที่ไม้ดอกไม้ประดับเป็นพืชทางเศรษฐกิจ จึงมีการเพิ่มพื้นที่มากขึ้น ทำให้เกิดปัญหาต่าง ๆ เช่น การเกิดโรคต่างๆรวมถึงโรคไวรัส เป็นโรคพืชอย่างหนึ่งที่ ทำให้ไม้ดอกไม้ประดับเป็นที่ต้องการน้อยลงทำให้เกิดความสูญเสียแก่เกษตรกรผู้ปลูกไม้ดอกไม้ประดับอย่างกว้างขวางเนื่องจากไม้ดอกไม้ประดับใช้วิธีการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศเป็นส่วนมาก ทำให้เชื้อไวรัสแพร่ระบาดได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ไม้ดอกไม้ประดับขายได้ในราคาต่ำ ดังนั้นการนำเทคนิคการตรวจสอบเชื้อไวรัสอย่างมีศักยภาพมาใช้ในการศึกษาโรค จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรที่ปลูกไม้ดอกไม้ประดับ รวมทั้งนำข้อมูลรายละเอียดเรื่องโรคไวรัสไปพัฒนาการผลิตไม้ดอกไม้ประดับเพื่อการค้าต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวินิจฉัยเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายไม้ประดับบางชนิด
2. เพื่อศึกษาถึง pattern ของ dsRNA band ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายไม้ประดับ

การตรวจเอกสาร

การตรวจสอบเชื้อไวรัสโรคพืชที่นิยมใช้ในปัจจุบันมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีการศึกษาลักษณะอาการบนพืชทดสอบ วิธีการถ่ายทอดโรค การศึกษารูปร่าง และขนาดอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน การศึกษาสมบัติทางกายภาพของเชื้อ การทดสอบทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ แต่ยังพบปัญหาอย่างมากในกรณีของการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชบางประเภท เช่น ไม้ดอกไม้ประดับบางชนิด ซึ่งในสภาพการเข้าทำลายในธรรมชาติพบว่าปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสจะอยู่ในระดับต่ำ และในการแยกเชื้อ (isolate) โดยวิธีการถ่ายทอดทางน้ำคั้น (sap transmission)จากพืชเหล่านี้น้ำคั้นที่ได้จะมีลักษณะเป็นยางเหนียว หรือมีองค์ประกอบของสาร tannin หรือสารประเภท phenolic compound ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ หรือทำให้เชื้อไวรัสเสื่อมสภาพลง เป็นปัญหาในการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นสู่พืชทดสอบ ซึ่งถือเป็นหลักปฏิบัติขั้นต้นในการวินิจฉัยชนิดของเชื้อไวรัส หรืออาจนำไปสู่ขั้นตอนการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (purification) เพื่อทำการผลิตเซรุ่มหรือการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเชื้อ ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาเทคนิคการสกัดกรดนิวคลิอิคแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction) มาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อไวรัสที่มีหน่วยพันธุกรรมเป็น RNA ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อไวรัสส่วนใหญ่ โดยอาศัยปรากฏการณ์ของขบวนการการเข้าทำลายพืชโดยเชื้อไวรัสในระหว่างการทวีจำนวนของเชื้อ (multiplication) จะมีการเกิด double stranded RNA (dsRNA) ซึ่งก็คือเส้นของ template RNA และ RNA สายใหม่ที่ยังจับคู่กันอยู่ ก่อนที่สาย RNA ใหม่จะแยกตัวออกเพื่อสร้างโปรตีนห่อหุ้มเกิดเป็นอนุภาคใหม่ขึ้น ซึ่งขนาดของ dsRNA ที่เกิดขึ้นจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $>0.1 \times 10^6$ dalton การวินิจฉัยชนิดของเชื้อจะพิจารณาจากลักษณะ จำนวนและระยะทางการเคลื่อนที่ของ dsRNA บนตัวกลาง (matrix) เช่น polyarylamide gel หรือ agarose (นวลพรรณ ,2538)

รายงานการตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อไวรัสโดยการนำเอาเทคนิคการสกัดกรดนิวคลิอิคแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction) โดย Copeland andMills(1986) ได้ทำการแยกเชื้อ Tobacco rattle virus (TRV) โดยวิธี dsRNA extraction ในหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการคล้ายไวรัส โดยพบว่า band ของ dsRNA ที่ได้คล้ายกับเชื้อ TRV ที่สกัดได้จากยาสูบ Martelli *et.al.*, (1995) ได้ทำการเก็บตัวอย่าง Olive พันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ พันธุ์ “Rasii” “ Sharmi” “ Khulli” “Grossa di Spagna” “ Kanabisi” “Souri” “Nasohi-Jaba-2” “Turkish” “St. Catharine” “Nabali B” และ “Nabali mohassan” ที่แสดงอาการ severe crakingและ mild craking มาตรวจสอบโดยวิธี mechanical tranmission สู่พืชทดสอบ และวิธี ds RNA extraction จาก Cortical ของยอดที่มีอายุ 1 ปี พบว่าสามารถแยกและวินิจฉัยเชื้อ Olive layeny 1 virus (OLV-1) ออกมาได้

Tzeng *et.al.*, (1996) ทำการศึกษาการใช้ phenol-sodium dodecyl sulfate(SDS) ในการสกัด dsRNA ของเชื้อ closterovirus จากโรคใบหงิกของต้น grapvines โดยบดเนื้อเยื่อ cortical ใน liquid nitrogen พบว่าการเติม 5 % SDS ใน extraction buffer จะเป็นการเพิ่มจำนวนของ viral dsRNA

Grieco *et.al.*, (2000) ได้รายงานการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี ds RNA extraction ในต้น Olive ที่เก็บมาจากพื้นที่ต่าง ๆ 6 พื้นที่ในประเทศอิตาลี พบว่ามี olive virus 210 จาก 286 ตัวอย่าง (73.4%) โดยพบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ผลิ การสกัดจะให้ผลดีกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ร่วง

นอกจากวิธีตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อแล้วยังมีรายงานการตรวจสอบวิธีอื่นๆโดย Ball (1974) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยา โดทดสอบด้วยวิธี Ouchterlony agar-gel double diffusion tests โดยนำเชื้อไวรัสที่บริสุทธิ์มาทดสอบการแพร่ผ่านตัวกลาง ซึ่งประกอบด้วย ion agar ความเข้มข้น 0.8% sodium dodecyl sulphate (SDS) และ1% sodium acide Hartman (1974) ใช้หลุมของ antigen ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จะพอดีกับหลุมของ antiserum ขนาด 5 มิลลิเมตร หลังจากนั้นจะช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยา โดยนำ plate มาใส่ในตู้บ่มเชื้อที่มีความชื้น อุณหภูมิ 24 °C สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง และถ่ายรูปไว้หลังจาก 24 ชั่วโมง

Albo El-nil *et.al.*, (1977) ได้ศึกษาเทคนิคการทำเชื้อ DMV ให้บริสุทธิ์จากใบ *Philodendron selloum* ที่เป็นโรคและยังมีการยืนยันคุณสมบัติทางกายภาพ แอนตีเซรัมมีความเฉพาะเจาะจงในการทดสอบ โดยวิธี immunodiffusion test ความสัมพันธ์ของ titres DMV มีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มวิทยากับเชื้อ blackeye cowpea mosaic และ tobacco etch virus แต่ไม่พบใน potato virus Y หรือ turnip mosaic virus

Zettler *et.al.*,(1970) รายงานว่า การใช้เทคนิค enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เพื่อตรวจสอบน้ำคั้นของพืชตระกูล Araceae ที่มีเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ได้แก่ *Dieffenbachia picta* แล*Philodendron selloum* จากการอ่านผลที่เกิดขึ้นพบว่า *D. picta* มีค่าการดูดซับสูงกว่าใน *P. selloum*

Clark and Adams (1977) ได้ทำการตรวจสอบไวรัสด้วยวิธี enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้เอนไซม์ alkaline phosphatase และ polystyrene plates เคลือบด้วย lg-G ที่สกัดจากแอนตีซีรัมของเชื้อที่ต้องการจะทดสอบ แล้วใส่น้ำคั้นของพืชลงไป บ่มที่ 4 ^{0}C และเทออก เติม เอนไซม์ conjugate ลงไป บ่มที่ 37 °C ประมาณ 3-4 ชั่วโมง เทออกแล้วใส่ substrate (pnitriphenylphosphate) ลงไป จะสังเกตเห็นปฏิกิริยาเป็นสีเหลือง และแสดงความเห็นว่า การเติม polyvinylpyrrolidone (PVP) นั้นเพื่อยับยั้ง tanin และ polyphenolic compound

ไม้ดอกไม้ประดับในวงศ์ Araceae เป็นพืชในกลุ่มไม้ประดับที่มีความสำคัญทางการค้า เนื่องจากพืชไม้ประดับในวงศ์นี้มีการผลิตเพื่อค้าขายกันอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นพืชที่มีราคาสูงเหมาะกับการผลิตเพื่อจำหน่าย ซึ่งประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิต และส่งออกสูง มีความพร้อมของสภาพพื้นที่ปลูก

ภูมิอากาศ แรงงานและการตลาด (บรรเจิด, 2534) แต่ปัจจุบันพบว่าพืชในวงศ์ Araceae ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายเป็นจำนวนมาก สร้างความเสียหายเป็นอย่างมากแก่พืชไม้ประดับหลายชนิดในวงศ์นี้ อย่างเช่น กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) พิโลเดนดรอน (*Philodendron microstietum* (Pitteiere)) และสาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta*) ที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย และมีรายงานว่าถูกเชื้อ dasheen mosaic virns (DMV) เข้าทำลาย โดยรายงานของ Abo El-nil *et.al.*, (1977) กล่าวว่าเชื้อ dasheen mosaic virns (DMV) เป็นไวรัสในกลุ่ม Potyvirns พบครั้งแรกในปี 1970 เข้าทำลายพืชในวงศ์ Araceae หลังจากนั้นก็มีการตรวจพบเป็นพืชเศรษฐกิจในพวก aroid ในหลาย ๆ ประเทศ เช่น ฟลอริดา ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์ Chase and Zetter (1982) รายงานว่าพืชในตระกูล *Dieffenbachia* sp. หลายชนิดซึ่งปลูกเป็นบริเวณกว้างในฟลอริดาเพื่อทำเป็นการค้าพบเชื้อ DMV เป็นเชื้อสาเหตุที่แสดงอาการ systemic ซึ่งทำให้เกิดปัญหากับพืชในวงศ์ Araceae เช่น พวก *Aglaonema Dieffenbachia Philodendron Caladium Xanthosoma Zantedeschia*

Verplancke (1930) รายงานว่าอาการของพืชที่พบใน *Sapronaria vaceria* จากเชื้อ DMV ทำให้พืชแสดงอาการแบบ systemic ที่เส้น veins และมี chlorotic spots Tompkinps and Gardner (1934) รายงานว่าอาการของโรคใน *Philodendron selloum* ซึ่งเป็นพืชทดสอบหลังจากการปลูกเชื้อ 2-3 สัปดาห์ อาการมีลักษณะเป็นขีด และใบแรกจะหด อัตราการเจริญเติบโตลดลง อาการ systemic ใน Araceae มีอาการที่แตกต่างกัน โดยเฉพาะอาการที่สามใบแรกจะไม่ชัดเจน ทำให้บอกความแตกต่างจากธรรมชาตินั้นได้ยาก

Tomkinps and Gardner (1934) ได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดไวรัส Flexous rod (จัดอยู่ในกลุ่ม potyvirus หรือที่เรียกว่า Flexible thread โดยวิธีกลพบอาการในพืช aroid ที่มีการขยายพันธุ์แบบปกติ เชื้อที่มีความสัมพันธ์กับพวก Araceous คือ tomato spotted wilt มีรายงานว่าพืชที่พบจะมีอาการใบด่างคล้ายกับพืชทดสอบตระกูลบอน (*Caladium hortnlanum* Bridsey) โดยอาการที่พบคือลักษณะแผลที่เป็นจุดวงแหวน (ring spots) อาการด่าง (mosaic) และอาการบิดเบี้ยว (distortion) (Alconero and Zettler, 1971 ; Chase and Zettler, 1982)

Bos (1970) รายงานว่าน้ำคั้นจากใบ *Philodendrom selloum* ของเชื้อ DMV มีจุดที่เป็น dilution end point อยู่ที่ 10^{-2} - 10^{-3} อุณหภูมิที่เชื้อยังคงสภาพอยู่ระหว่าง 60-65 ^{0}C และคงสภาพที่อุณหภูมิห้อง 75 ชั่วโมง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการสำรวจโรคคล้ายไวรัสในไม้ดอกไม้ประดับ

1.1 กล้องถ่ายรูปใช้สำหรับบันทึกภาพอาการ

1.2 ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการคล้ายอาการเนื่องจากเชื้อไวรัสเ

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสโดยการแยกสกัดกรดนิวคลิอิกสายคู่ (ds RNA) ของเชื้อ

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ (ds RNA extraction)

2.1.1 ชุดสกัด Rneasy Mini Protocol for Isolation of Total RNA จากบริษัท QIAGEN โดยมีบริษัทธีระเทรดดิ้ง จำกัด เป็นผู้แทนจำหน่ายในประเทศไทย (ภาพที่1)

2.1.2 ตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส 1 mg

2.1.3 โกร่งบดตัวอย่างใบพืช

2.1.4 liquid nitrogen

2.1.5 Vortex

2.1.6 Microcentrifuge

2.1.7 Ethanol 100%

2.1.8 เทอร์โมมิเตอร์

2.1.9 hot plate

2.1.10 บิกเกอร์ ขนาด 200 ml

2.1.11 ตู้เย็นสำหรับเก็บสารเคมี และสารสกัดตัวอย่างพืช

2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยก ds RNA ของเชื้อโดยการใช้กระแสไฟฟ้า (electrophoresis)

2.2.1 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับ run gel โดยกระแสไฟฟ้าที่ใช้ 100 voltage ประกอบด้วย เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า และ electrophoresis tank สำหรับ run gel (ภาพที่ 2)

2.2.2 Agaros

2.2.3 น้ำกลั่น

2.2.4 TAE buffer (50x)

2.2.5 Ethidium bromide 0.1 μg/ml

2.2.6 gel loading

2.2.7 สารสกัดตัวอย่างพืช 10 μl

2.2.8 กล่องสำหรับย้อมสีด้วยสารละลาย ethidium bromide

2.2.9 กล่องสำหรับล้างสารละลาย ethidium bromide

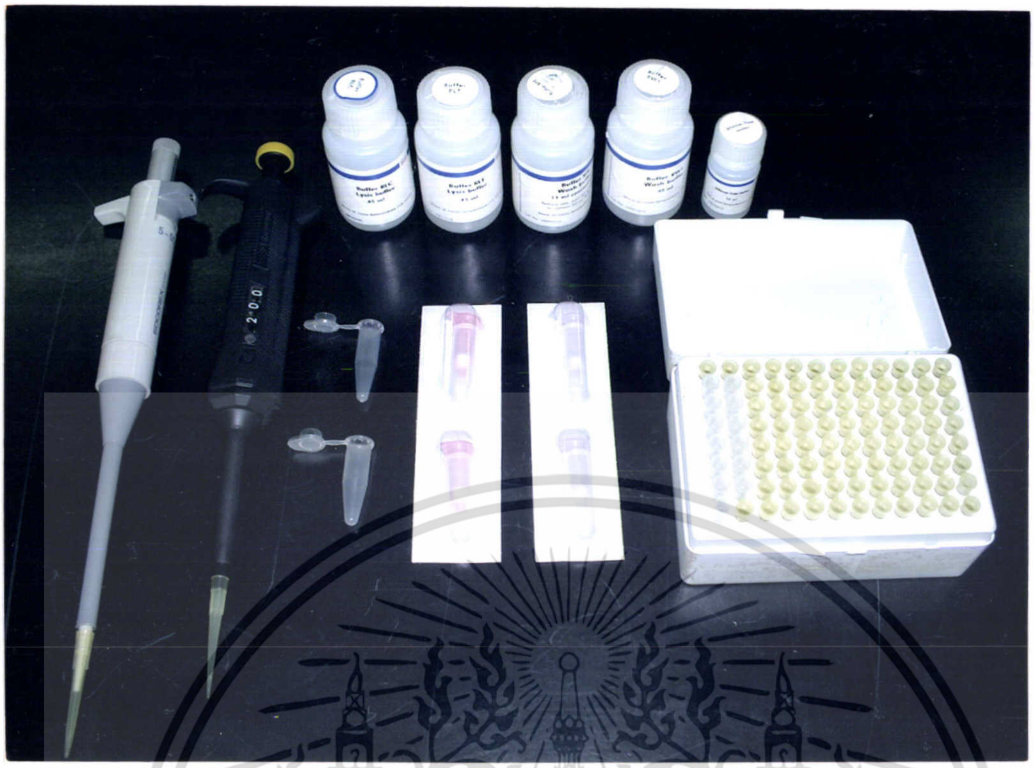
2.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลโดยสังเกตจากลักษณะจำนวนระยะทางการเคลื่อนที่ของ ds RNA

2.3.1 ตัวมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบ ได้แก่ Lambda DNA Hind III digest

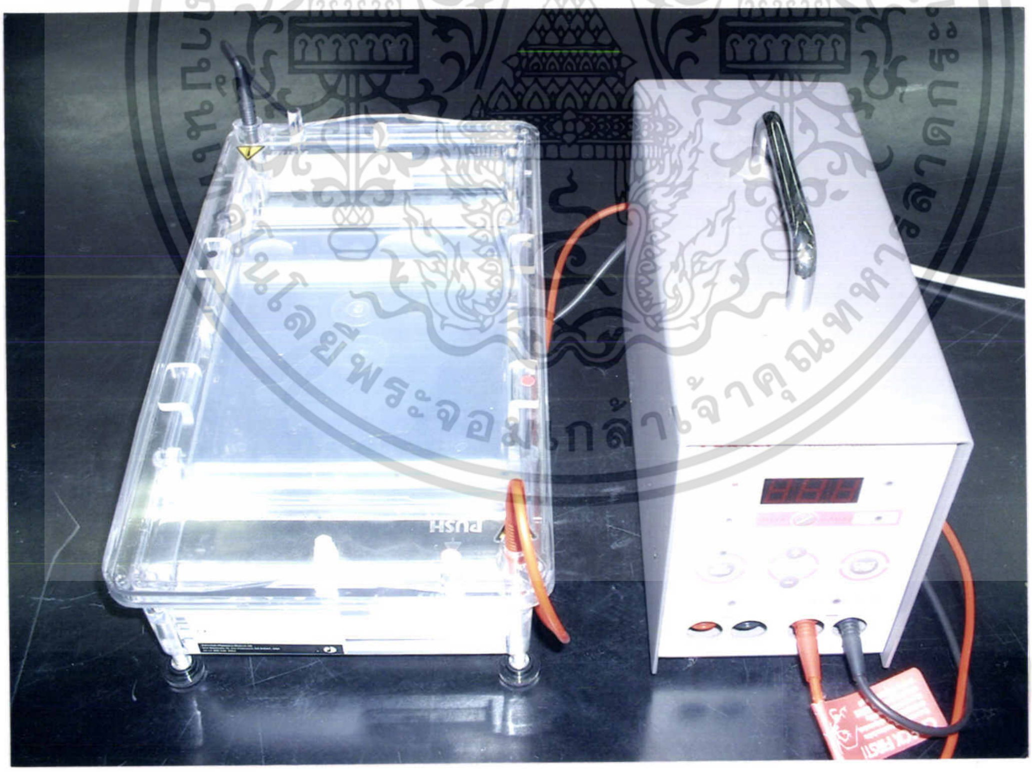
2.3.2 กล่อง UV block

2.3.3 ไม้บรรทัด

2.3.4 กล้องถ่ายรูปพร้อมฟิล์ม



ภาพที่ 1 แสดงชุดสกัด Rneasy Mini Kit และอุปกรณ์ที่ใช้แยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ



ภาพที่ 2 แสดงชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับ run gel ซ้ายมือ คือ electrophoresis tank /ขวามือ คือ เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า

วิธีการ

1. การสำรวจโรคคล้ายไวรัสในไม้ประดับ

การสำรวจพืชไม้ประดับโดยการสังเกตอาการพืชที่ผิดปกติ ซึ่งมีอาการคล้ายคลึงกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายเช่น ด่าง หยิกงอ รูปร่างใบผิดปกติจากแหล่งขายต้นไม้ในตลาดนัดสวนจตุจักรกรุงเทพมหานคร โดยการทำการบันทึกลักษณะอาการที่พบหลังจากนำมาเลี้ยงไว้ที่โรงเรือนพร้อมทั้งถ่ายภาพก่อนที่จะเก็บใบที่แสดงอาการของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายชัดเจนไปทำการตรวจสอบและ วิเคราะห์ชนิดของเชื้อไวรัสโดยการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ (ds RNA) ของเชื้อ

2. การตรวจสอบและวิเคราะห์ชนิดของเชื้อไวรัสโดยการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ ของเชื้อ

เทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อไวรัส เพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสในไม้ประดับ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

2.1 การแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ

วิธีการใช้แยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อ จะใช้วิธีการแยกสกัดตามขั้นตอน ดัดแปลงจากชุดสกัด RNeasy Mini kit จากบริษัท ธีระเทรดดิ้ง จำกัดซึ่งมีขั้นตอนในการแยกสกัดดังนี้

2.1.1 เก็บตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการซึ่งคาดว่าจะเป็นอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสชั่งมา 1 mg

2.1.2 นำใบพืชตัวอย่างใส่ในโกร่ง แล้วเติมไนโตรเจนเหลวจากนั้นทำการบดใบพืชให้ละเอียดเป็นผง นำผงที่ได้ใส่ใน eppendrof ขนาด 2 ml

2.1.3 เติม buffer RLT สำหรับการสกัดพืชที่มีเมือกหรือยางเหนียวเป็นองค์ประกอบของใบ หรือ buffer RLC สำหรับสกัดพืชที่ไม่มีเมือกหรือยางเหนียวลงไปในหลอด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 56 $^{\circ}$C เป็นเวลา 1-3 นาที แล้วนำไปปั่นบนเครื่อง vortex เป็นเวลาสั้น ๆ

2.1.4 ดูดน้ำใส จากหลอดหลังการปั่น มาใส่ใน QIA Shredder spin column (หลอดสีม่วง) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 2 นาที ที่ความเร็ว 13,000 rpm.

2.1.5 นำส่วนที่เป็นของเหลวมาใส่ใน tube อันใหม่จากนั้นเติม ethanol 100 % ลงไป 225 μl แล้วทำการผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipet ดูดของเหลวขึ้นลง

2.1.6 นำของเหลวที่ได้มาใส่ใน RNeasy column (สีชมพู) แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 15 วินาที ความเร็ว 13,000 rpm. ทิ้งน้ำส่วนล่างของ column

2.1.7 ทำการล้าง column ด้วย RW1 buffer จำนวน 700 μl โดยการนำไปหมุนเหวี่ยง 15 วินาที ที่ความเร็ว 13,000 rpm. ทิ้งน้ำส่วนล่างของ column

2.1.8 นำ column (สีชมพู) มาใส่ในหลอดขนาด 2 ml อันใหม่ แล้วล้าง column ด้วย RPE buffer 500 µl (RPE buffer 1 ส่วน ต่อ ethanol 100 % < 1 ส่วน) โดยนำไปหมุนเหวี่ยง 15 วินาที ที่ความเร็ว 13,000 rpm ทิ้งน้ำที่อยู่ส่วนข้างล่าง column

2.1.9 ทำการล้าง column อีกครั้งด้วย RPE buffer 500 ml แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 15 วินาที ที่ความเร็ว 13,000 rpm. จากนั้นเอาน้ำส่วนล่าง column ทิ้งแล้วผึ่ง membrane ให้ Ethanol ระเหย

2.1.10 นำ RNeasy column (สีชมพู) ไปใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml อันใหม่แล้วเติม RNase - free water 30ul ลงไป membrane ทำการหมุนเหวี่ยง 1 นาทีความเร็ว 13,000 rpm. จะได้สารสกัดกรดนิวคลิอิค ของเชื้อไวรัสผสมอยู่กับ Rnase - free water นำสารสกัดที่ได้นี้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อเตรียมพร้อมแล้วที่จะทำการแยก dsRNA ของเชื้อโดยใช้กระแสไฟฟ้า

2.2 การใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก ds RNA ของเชื้อ

ขั้นตอนในการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก dsRNA ของเชื้อ ตัวกลางที่ใช้คือ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 0.8 % ขนาดของ electrophoresis tank ที่ใช้ ยาว 19.5 กว้าง 8 สูง 4 เซนติเมตร โดยในการเตรียมตัวอย่างเพื่อแยกสกัด dsRNA ด้วยกระแสไฟฟ้า buffer ที่ใช้มี 2 ชนิดคือ

2.2.1 loading buffer ได้แก่ buffer ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างซึ่งประกอบไปด้วยสารละลายผสมของ bromidephenol blue 0.05 %, sucrose 40% , EDTA pH 8.0 0.1 M และ sodium lauryl sulfate (SDS) 0.5 %

2.2.2 Electrophoresis buffer ได้แก่ buffer ที่ใช้ขณะการใช้กระแสไฟฟ้าในการทดลองนี้ใช้ TAE buffer (50X) (Tris 242 g , glacial acetic acid 57.1 ml , 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 ml น้ำกลั่น 100 ml) โดยใช้ปริมาตร 24 ml

ตัวอย่างที่ใช้หยอดต่อหลุมจะใช้ปริมาตร 10 µl และloading buffer 3µ l กระแสไฟฟ้าที่ใช้คือ 100 voltage โดยใช้ระยะเวลา 3 ชั่วโมงครึ่ง หลังจากนั้นนำ gel มาทำการย้อมสีด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 ug/ml เพื่อสังเกตการเคลื่อนที่ของแถบ (band) ds RNA

2.3 การตรวจสอบและวิเคราะห์ผลโดยสังเกตจากลักษณจำนวนระยะทางการเคลื่อนที่ของ ds RNA

ตรวจสอบได้โดยนำมาเปรียบเทียบเกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานที่ใช้ คือ DNA Lambda ที่ย่อยสลายโดย enzyme Hind I I I แล้วถ่ายภาพ วัดระยะทางที่ band เคลื่อนที่ จากนั้นนำมาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างที่ตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบ linear curve

ผลการทดลอง

1. การสำรวจไม้ประดับที่แสดงอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส

จากการสำรวจไม้ประดับโดยสังเกตุอาการของพืชที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส ในแหล่งขายต้นไม้ในตลาดนัดจตุจักรกรุงเทพมหานคร พบไม้ประดับที่แสดงอาการคล้ายโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในวงศ์ Araceae ได้แก่ กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) สาวน้อยประแป้ง (*D. picta* "Snowdrop") ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*) เดหลีใบมันใบมัน (*Spathiphyllum wallissii*) ออมเงินออมทอง (*Synganium phodophyllum*) วงศ์ Liliageae ได้แก่ ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godsefiana*) วงศ์ Orchidaceae ได้แก่ หวายปอมปาดัวร์ (*Dendrobium pompadour*) วงศ์ Solanaceae ได้แก่ พริก (*Capsicum annuum* L.) แต่ละชนิดมีการปลูกกันอย่างแพร่หลายและมีความสำคัญทางการค้า ดังนั้นจึงนำพืชไม้ประดับเหล่านี้มาทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัส โดยเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิกสายคู่ของเชื้อ (ds RNA) พืชแต่ละชนิดมีลักษณะและอาการดังนี้คือ

กวักเงิน

<u>ชื่อวิทยาศาสตร์</u> *Dieffenbachia overstedii*

จัดอยู่ในวงศ์ ARACEAE ลำต้นมีสีเขียวเข้มแต่จะมีกาบสีขาวติดกับลำต้น อาจสูงถึง 1 เมตร ใบมีสีเขียวเข้มปลายใบมนและแหลมเล็กน้อย โคนใบมนและแหลมเล็กน้อย โคนใบมนและมีเส้นสีขาวพาดยาวไปตามแนวเส้นกลางใบ แต่บางใบเส้นสีขาวนี้อาจสั้นหรือไม่มีเลย เป็นไม้ประดับไม่มีดอก เหมาะที่จะปลูกในกระถางวางประดับในลักษณะต้นเดี่ยวๆ ชอบความชื้นสูงอยู่ที่ๆมีแสงแดดรำไร ขยายพันธุ์ด้วยการตัดยอดหรือเอาส่วนของลำต้นไปปักชำ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในคอสตาริกา (วิทย์, 2536)

<u>อาการ</u>

ใบด่างเป็นวงสีเขียวอ่อนกระจายทั่วทั้งใบ (ลูกศรชี้) ผิวใบเป็นคลื่นไม่เรียบ อาจจะเกิดอาการอย่างรุนแรงในใบอ่อน และจะลดลงเมื่อเป็นใบแก่ (ภาพที่ 4)

ฟิโลเดนดรอน

<u>ชื่อวิทยาศาสตร์</u> *Philodendron microstictum* (pittieri)

จัดอยู่ในวงศ์ ARACEAE เป็นพันธุ์ไม้เลื้อย ที่มีเถาทอดเลื้อยไปตามหลักที่เตรียมไว้ ทรงเถาจะกลมและแบ่งออกเป็นข้อ ๆ ในแต่ละข้อจะมีรากยาวออกมาเพื่อเอาไว้ยึดเกาะและดูดอาหาร ใบเป็นรูป

หัวใจป้อมๆ ปลายแหลมโค้งมน เว้าเข้าหาก้านใบเล็กน้อย ขอบใบเรียบไม่มีหยัก พื้นใบเรียบมีสีเขียว แตกใบอ่อนตรงส่วนยอดของต้น ก้านใบจะมีลักษณะเป็นกาบ เป็นพืชที่ปลูกในที่ร่มและรำไร ต้องการน้ำปานกลาง แต่ชอบความชื้นมากหน่อย มีถิ่นกำเนิดอยู่ในคอสตาริกา (วิทย์,2536)

<u>อาการ</u>

ใบของพิโลเดนครอนที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย จะมีลักษณะหงิกงอ ม้วนงอและมีอาการด่างตามแนวเส้นใบ พืชมีลักษณะแคระแกรนมีการเจริญเติบโตช้า (ภาพที่ 6)

สาวน้อยประแป้ง

<u>ชื่อวิทยาศาสตร์</u> *Dieffenbachia picta* "Snowdrop"

อยู่ในวงศ์ ARACEAE เป็นพันธุ์ไม้ที่มีลำต้นกลม แข็งแรง ความสูงประมาณ 1.5 เมตรใบค่อนข้างใหญ่คล้ายใบพาย ผิวใบเรียบเป็นมัน มีสีเขียวแก่ มีลายด่างสีขาวเป็นเม็ดก้านของใบมีสีเขียวอมขาวมีลักษณะเป็นกาบต้องการแสงแดดแต่ก็สามารถเลี้ยงได้ทั้งในที่ร่มและที่แจ้ง เจริญได้ดีในดินที่เก็บความชื้น และต้องการการระบายน้ำได้ดีไม่มีน้ำขังมากเกินไป ขยายพันธุ์ด้วยการตัดชำแยกหน่อ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศ บราซิล ปัจจุบันเป็นพันธุ์ไม้ประดับที่นิยมมากในประเทศไทย (วิทย์ ,2536)

<u>อาการ</u>

ใบแสดงอาการด่างสีเขียวเข้มตามปลายของเส้นใบโดยเฉพาะบริเวณพื้นที่สีขียวของใบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะเกิดขึ้นกับใบอ่อน ลำต้นแคระแกรน และต้นมีการเจริญเติบโตช้า (ภาพที่ 8)

เดหลีใบมัน

<u>ชื่อวิทยาศาสตร์</u> *Spathiphyllum wallissii*

มีชื่อสามัญ Peace lily อยู่ในวงศ์ ARACEAE เป็นไม้ประดับที่มีใบสีเขียวเข้มและมันเป็นเงาวาว ดอกเป็นช่อสีขาวหรือขาวแกมเหลือง กาบหุ้มช่อดอกเป็นสีขาว ลักษณะคล้ายดอกหน้าวัว กาบห่อช่อดอกนี้จะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเขียวหลังจากดอกบานแล้วประมาณ 1 สัปดาห์ ตามธรรมชาติเดหลีใบมันชอบขึ้นอยู่ตามริมลำธารที่มีร่มเงาในป่าฝนเขตร้อนแต่เมื่อนำมาปลูกเป็นไม้ประดับภายในห้องหรือในอาคารสถานที่สามารถปรับตัวอยู่ได้ แม้จะมีความชื้นต่ำและรับแสงจากหลอดไฟฟ้าได้นานตราบเท่าที่ยังมีความชื้นอยู่และเป็นไม้ประดับที่สวยงาม (ปิฎฐะ,2534)

อาการ

มีลักษณะใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม อาการด่างจะเป็นแถบขนานไปตามเส้นใบ ใบจะมีขนาดเล็กลง และอัตราการเจริญเติบโตช้า (ภาพที่ 10)

ออมเงินออมทอง

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Synganium podophyllum*

มีชื่อสามัญ Albo-virens จัดอยู่ในวงศ์ ARACEAE เป็นพันธุ์ไม้เลื้อยที่มีลำต้นเป็นเถาเลื้อยยึดเกาะหลัก ลำต้นมีข้อแตกรากออกมา มีสีเขียว ใบเมื่อลำต้นยังเล็กจะมีลักษณะคล้าย ๆ กับใบบอน คือ โคนใบเว้าลึก หูใบยาว แต่เมื่อลำต้นโตลักษณะของใบจะเปลี่ยนใบ เช่น หูใบก็จะยาว ปลายใบก็จะเรียวแหลมผายออกกว่าเดิม พื้นผิวใบตรงส่วนโคนเส้นกลางใบโค้งเป็นลอนในจะเป็นสีขาวเหลือสีเขียวเฉพาะขอบ ๆ รอบใบเล็กน้อย เป็นพันธุ์ไม้กลางแจ้ง ชอบที่มีแสงสว่างเข้าถึง เจริญได้ดีในดินทุกประเภท ขยายพันธุ์ด้วยการปักชำ (วิทย์, 2536)

อาการ

ใบมีลักษณะรูปร่างผิดจากปกติโดยมีลักษณะม้วนงอ และลำต้นเจริญเติบโตช้า (ภาพที่ 12)

ไผ่ฟิลิปปินส์

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Dracaena godseffiana*

มีชื่อสามัญ Gold-dust dracaena อยู่ในวงศ์ LILIAGEAE เป็นพันธุ์ไม้พุ่มขนาดเล็ก เจริญเติบโตรวมกันอยู่เป็นกอคล้ายกับกอไผ่แตกกิ่งก้านสาขาตรงส่วนโคนของต้น ใบจะแตกตรงส่วนยอดของลำต้น ลักษณะของใบเป็นรูปไข่ ปลายใบแหลม และโคนใบสอบ พื้นใบสีเขียวเข้ม เป็นไม้ที่ชอบอยู่ในที่แสงแดดรำไร ชอบความชื้นปานกลาง ขยายพันธุ์ด้วยการแยกกอและปักชำ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในคองโก (วิทย์,2536)

อาการ

ใบมีจุดเป็นวงสีเหลืองเล็ก ๆ กระจายทั่วทั้งใบ (ภาพที่ 14)

หวายปอมปาดัวร์

<u>ชื่อวิทยาศาสตร์</u> *Dendrobium pompadour*

จัดอยู่ในวงศ์ Orchidaceae เป็นกล้วยไม้สกุลหวายลูกผสม ต้นตั้งสูงประมาณ 50 เซนติเมตร ก้านชูดอกยาว ดอกออกเรียงกัน แต่ละดอกมีขนาดค่อนข้างใหญ่ กลีบดอกสีม่วงแดง ชอบแสงแดดรำไร ออกดอกเกือบตลอดปี เป็นที่นิยมปลูกเพื่อตัดออกกันอย่างแพร่หลาย (สมสุข, 2533)

<u>อาการ</u>

ใบมีลักษณะอาการด่างสีเหลืองเป็นปื้นกระจายเกือบทั่วทั้งใบ (ภาพที่ 16)

พริก

<u>ชื่อวิทยาศาสตร์</u> *Capsicum annum* L.

จัดอยู่ในวงศ์ Solanaceaeเป็นพืชกึ่งไม้เนื้อแข็ง ใบมีขนาดเล็กปลายเรียว ผักเล็ก รูปร่างกลมรีหรือค่อนข้างกลมแบน เปลือกหนา สีเขียว และแดง (วิทย์,2536)

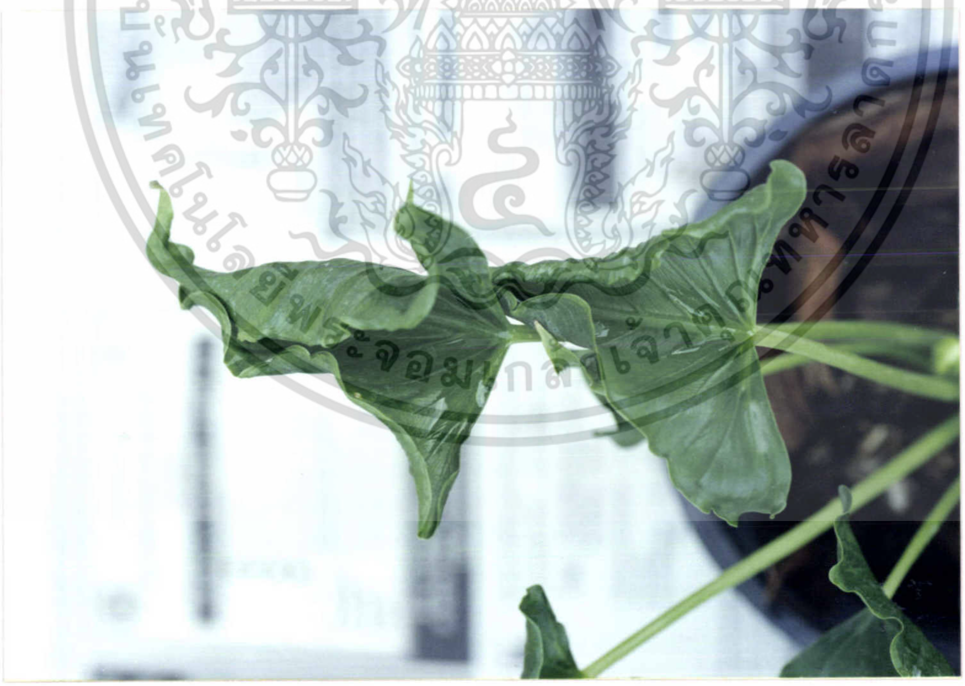
<u>อาการ</u>

ใบด่าง ใบลดขนาดเรียวเล็ก บางใบหงิกงอ โดยเฉพาะอย่างยิ่งกับใบอ่อน ต้นเตี้ยแคระแกร็น (ภาพที่ 18)

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะอาการใบด่างและผิวใบเป็นคลื่นของต้นกวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ที่ถูกเชื้อไวรัสทำลาย

ภาพที่ 4 อาการใบด่างและผิวใบเป็นคลื่นของใบกวักเงิน จากการถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ภาพที่ 5 แสดงลักษณะอาการหงิกงอ ม้วนงอและอาการด่างตามแนวเส้นใบของต้นฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum* (Pittieri))ที่ถูกเชื้อไวรัส เข้าทำลาย

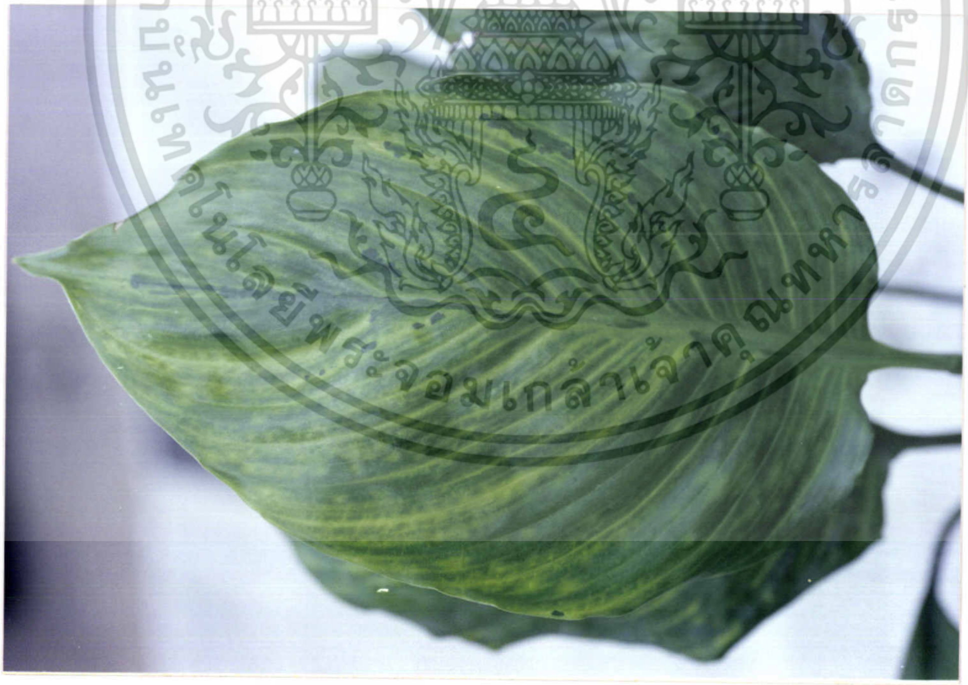


ภาพที่ 6 อาการหงิกงอ ม้วนงอ และอาการด่างตามแนวเส้นใบของใบฟิโลเดนดรอนจากการถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ภาพที่ 7 แสดงลักษณะอาการด่างสีเขียวเข้มตามปลายของเส้นใบ โดยเฉพาะบริเวณพื้นที่สีเขียวของใบสาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* “Snowdrop”) ที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ภาพที่ 8 อาการด่างเขียวเข้มตามปลายของเส้นใบ โดยเฉพาะบริเวณพื้นที่สีเขียวของใบสาวน้อยประแป้ง จากการถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้มขนาน ไปตามเส้นใบของต้นเดหลีใบมัน (*Spathiphyllum wallissii*)



ภาพที่ 10 อาการใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม ขนาดใบตามเส้นใบของใบเดหลีใบมัน เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะอาการใบผิดปกติของต้นออมเงินออมทอง (*Syngonium podophyllum*)

ภาพที่ 12 อาการใบม้วนงอผิดปกติของต้นออมเงินออมทองเนื่องจากถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ภาพที่ 13 แสดงลักษณะใบเป็นจุดสีเหลืองเล็กๆกระจายทั่วไปของต้น ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godsefiana*) ที่ถูกเชื้อ ไวรัสเข้าทำลาย

ภาพที่ 14 อาการแผลจุดเหลืองกระจายอยู่บนใบไผ่ฟิลปปินส์ที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ภาพที่ 15 แสดงลักษณะอาการด่างสีเหลืองเป็นปื้นของต้นหวายปอมปาดัวร์ (*Dendrobium pompadour*) ที่ถูกเชื้อไวรัสทำลาย

ภาพที่ 16 อาการด่างสีเหลืองเป็นปื้นบนใบหวายปอมปาดัวร์ที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

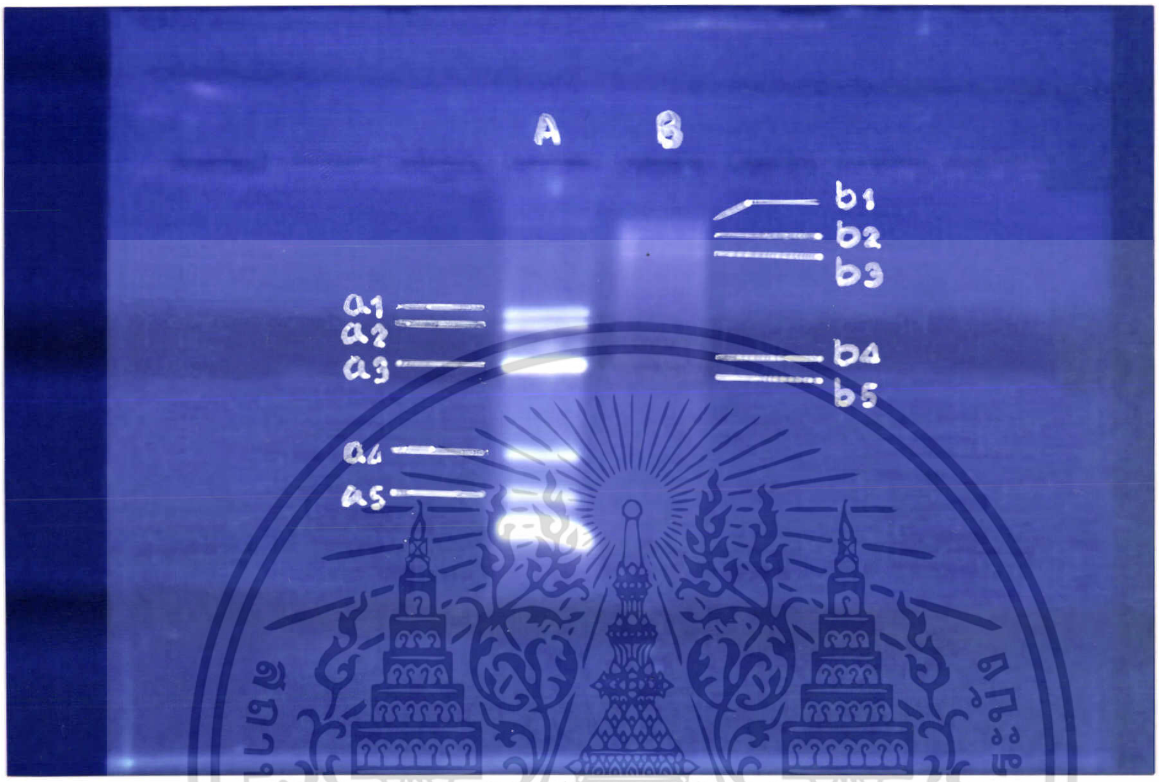
ภาพที่ 17 แสดงลักษณะอาการใบด่างเหลืองตามแนวเส้นใบ และใบลดขนาดผิดรูปร่างโดยเฉพาะใบอ่อนของพริก (*Capsicum annuam* L.) ที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ภาพที่ 18 ลักษณะใบด่างเหลืองตามแนวเส้นใบ และใบลดขนาดผิดรูปร่างโดยเฉพาะใบอ่อนของพริกที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

2. การตรวจสอบและการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสโดยการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ (dsRNA) ของเชื้อ

จากการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ (dsRNA) จากใบของพืชไม้ประดับทั้ง 3 วงศ์ 8 ชนิด อันได้แก่ กวักเงิน ฟิโลเดนดรอน สาวน้อยประแป้ง เดหลีใบมัน ออมเงินออมทอง ไผ่ฟิลิปปินส์ หวายปอมปาดัวร์ และพริก หลังจากนั้นนำdsRNA extractionที่ได้จากการสกัด มาผ่านขั้นตอนการทำ electrophoresis แล้วตรวจสอบผลโดยการย้อมสี gel ด้วยสารละลาย ethidium bromide เพื่อดูลักษณะ pattern ที่ปรากฏขึ้นบน gel บนกล่องแสง ultraviolet ก่อนที่จะทำการเปรียบเทียบ pattern ด้วยตัวตรวจมาตรฐาน คือ Lambda DNA ซึ่งถูกย่อยสลายโดย Enzyme Hind III ผลปรากฏว่า pattern ของกวักเงินเท่านั้นที่ปรากฏแถบของ dsRNA แยกตัวให้เห็น และจะปรากฏให้เห็นแถบของ dsRNA เฉพาะเมื่อใช้ buffer RLT ในการสกัด ขณะที่การสกัดโดยใช้ buffer RLC pattern ที่ปรากฏจะเป็นลักษณะของ dsRNA เกาะกันเป็นกลุ่มขาวขุ่นบน gel โดยไม่มีการแยกตัว สำหรับ pattern ของกวักเงินที่ปรากฏแถบของ dsRNA แต่ปริมาณค่อนข้างเจือจางโดยแถบที่สามารถมองเห็นได้คือแถบที่ 1 แถบที่ 2 แถบที่ 3 แถบที่ 4 แถบที่ 5 จากด้านบน โดยแถบเคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นเป็นระยะทาง 1.8 1.9 2.1 2.9 และ 4.1 เซนติเมตรตามลำดับ และเมื่อนำระยะทางที่แถบเคลื่อนที่มาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุล โดยการ plot กราฟเปรียบเทียบระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานกับน้ำหนักโมเลกุลของตัวมาตรฐาน โดยแกนนอนเป็นระยะทางที่แถวเคลื่อนที่ได้เป็นเซนติเมตร แกนตั้งเป็นน้ำหนักโมเลกุล ปรากฏว่าสามารถวัดน้ำหนักโมเลกุลได้ 3.2×10^6 2.8×10^6 2.4×10^6 1.2×10^6 และ0.8×10^6 dalton ซึ่งค่าน้ำหนักโมเลกุลวัดได้มีค่าใกล้เคียงกับเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ที่รายงานโดย Gould *et.al.*,(1977)

สำหรับพืชที่เหลืออันได้แก่ ฟิโลเกนดรอน สาวน้อยประแป้ง เดหลีใบมัน ออมเงินออมทอง ไผ่ฟิลิปปินส์ หวายปอมปาดัวร์ และพริก pattern ที่ปรากฏจะเป็นลักษณะของ dsRNA เกาะกันเป็นกลุ่มขาวขุ่นบน gel โดยไม่มีการแยกตัว แม้จะมีการเปลี่ยนการใช้ buffer ในการสกัดจาก buffer RLC เป็น RLT เพื่อขจัดปัญหาพืชที่มียางเหนียวแล้วก็ตาม



ภาพที่ 19 (A) แสดง pattern band ของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ที่สกัดได้จากกวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) , (B) แสดง pattern band ของ lambda DNA

หมายเหตุ

a1 หมายถึง RNA1 ของเชื้อ CMV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3.2 x 10^6 dalton

a2 หมายถึง RNA1 ของเชื้อ CMV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2.8 x 10^6 dalton

a3 หมายถึง RNA1 ของเชื้อ CMV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2.2 x 10^6 dalton

a4 หมายถึง RNA1 ของเชื้อ CMV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.2 x 10^6 dalton

a5 หมายถึง RNA1 ของเชื้อ CMV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 0.8 x 10^6 dalton

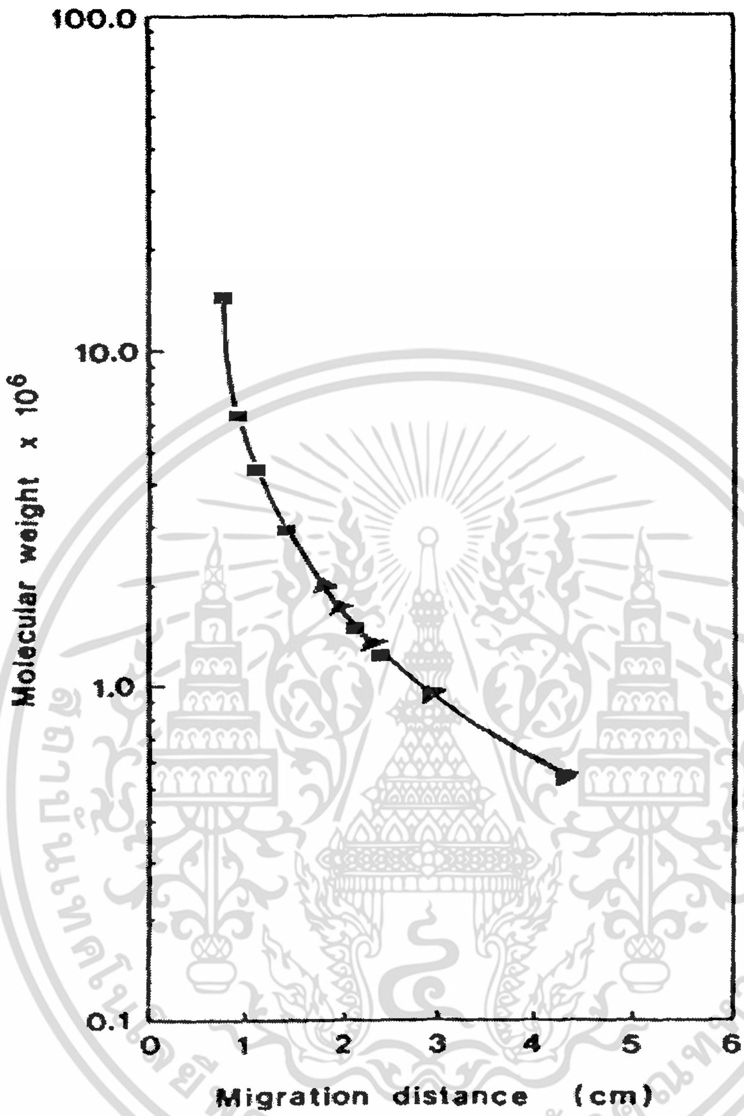
b1 หมายถึง Lambda DNA1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 15.0 x 10^6 dalton

b2 หมายถึง Lambda DNA1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 6.12 x 10^6 dalton

b3 หมายถึง Lambda DNA1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 4.26 x 10^6 dalton

b4 หมายถึง Lambda DNA1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 2.83 x 10^6 dalton

b5 หมายถึง Lambda DNA1 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.51 x 10^6 dalton



ภาพที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของ dsRNA ของกวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) บน gel กับน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA ที่ได้โดยการ plot กราฟ ■ ------- ■ lambda DNA และ ▲ ----- ▲ cucumber mosaic virus (CMV)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การสำรวจโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสในไม้ดอกไม้ประดับตามตลาดนัดขายดอกไม้สวนจตุจักร กรุงเทพมหานคร พบกลุ่มอาการที่ปรากฏบนไม้ประดับ ดังนี้ คือ อาการด่าง (mosaic) อาการหงิกงอบิดเบี้ยว (leaf distortion) และแคระแกร็น (dwarf) ใบเปลี่ยนรูปร่าง (leaf deformation) จุดเหลืองเป็นปื้น (chlorotic patches) ซึ่งอาการเหล่านี้มักเกิดกับใบอ่อน และอาการจะค่อยๆลดลงเมื่อใบกลายเป็นใบแก่

เมื่อนำใบอ่อนที่แสดงอาการเนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายของพืชไม้ประดับทั้ง 8 ชนิดมาทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ของเชื้อ แล้วตรวจสอบ dsRNA บน gel ภายหลังการทำ electrophoresis พบว่าการตรวจสอบโรคเนื่องจากเชื้อไวรัสในครั้งนี้ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจาก dsRNA ที่ปรากฏบน gel ไม่มีการแยกตัวอย่างชัดเจน นอกจาก pattern ของต้นกวักเงินที่ปรากฏแถบของ dsRNA ให้เห็น แต่จะปรากฏให้เห็นแถบของ dsRNA เฉพาะในกรณีที่ใช้ buffer RLT ในขั้นตอนของการสกัด จึงสรุปได้ว่า buffer RLT เหมาะสมกับการแยกสกัด dsRNA สายคู่ของเชื้อจากพืชที่มีเมือก หรือยางเหนียวอย่าง เช่น กวักเงินมากกว่า buffer RLC และเมื่อเปรียบเทียบค่าน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA ที่สกัดได้จากกวักเงิน กับตัวมาตรฐาน Lambda DNA Hind III digest สรุปได้ว่าเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายกวักเงินคือเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV)

สำหรับพืชที่เป็นไม้เนื้ออ่อนอื่นๆ ที่มีลักษณะมีเมือกหรือยางเหนียวเป็นองค์ประกอบของใบเช่นเดียวกับกวักเงิน อันได้แก่ ฟิโลเดนดรอน สาวน้อยประแป้ง เดหลีใบมัน และออมเงินออมทอง pattern ที่ได้ไม่ปรากฏแถบของ dsRNA ให้เห็นแม้จะใช้ buffer RLT ที่ใช้สำหรับการสกัดพืชที่มีเมือกหรือยางเหนียวเหมือนกวักเงินแล้วก็ตาม ซึ่งผลเป็นเช่นเดียวกันกับพืชพวกไม้เนื้อแข็ง คือ ไผ่ฟิลิปปินส์ หวายปอมปาดัวร์ และพริก

จากความล้มเหลวที่เกิดขึ้นในการทดลองในครั้งนี้ สามารถอธิบายถึงสาเหตุ 2 ปัจจัยหลัก คือ 1) ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในต้นพืชที่เป็นโรคในช่วงที่ทำการสำรวจและตรวจสอบมีปริมาณต่ำ 2) ปัญหาการเกาะตัวระหว่าง dsRNA และ celluloseในสภาพที่การแยกสกัดที่มีเมือกหรือยางของพืชเป็นองค์ประกอบในใบพืช (Hicks *et.al.*,1988) ซึ่งปัญหาความเข้มข้นของเชื้อไวรัสมีปริมาณต่ำ อาจเกิดจากความผิดพลาดของผู้ทดลองเอง เนื่องจากช่วงทำการตรวจสอบได้มีการเก็บตัวอย่างพืชไว้ในโรงเรือนเพาะชำเป็นเวลานานก่อนจะนำพืชมาตรวจสอบ ซึ่งในช่วงการตรวจสอบนั้น สภาพอากาศค่อนข้างที่จะแปรปรวน มีทั้งฝนตก อากาศร้อนจัด ซึ่งอาจทำให้เชื้อไวรัสที่อยู่ในต้นพืชลดปริมาณลงประกอบกับตัวพืชเอง ในกรณีที่เป็นไม้เนื้อแข็ง ที่สภาพการเข้าทำลายในธรรมชาติพบว่า ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสจะอยู่ในระดับต่ำอยู่แล้ว (นวลพรรณ, 2538) นอกจากนี้แล้วการที่น้ำคั้นของพืชมียางเหนียวหรือองค์ประกอบของสาร tannin หรือ สารประเภท phenolic compound จะมีผลทำให้เชื้อ

ไวรัสเสื่อมสภาพลง (นวลพรรณ, 2540) ซึ่งจากปัญหาดังที่กล่าวมาข้างต้น เป็นอุปสรรคของความสำเร็จในการตรวจสอบเชื้อโดยการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อ ดังนั้นเพื่อให้การตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อพัฒนาไปสู่การวินิจฉัยการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติม อย่างเช่นศึกษาเรื่องเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างหรือการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมเพื่อให้เชื้อเพิ่มจำนวนในพืช เพราะบางครั้งช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างก็สำคัญในการตรวจสอบ อย่างเช่น ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสในต้น Olive ที่พบว่าตัวอย่างที่เก็บใบฤดูใบไม้ผลิการสกัดจะให้ผลดีกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ร่วง (Grieco *et.al.*, 2000) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไป

Grieco,F.Saponari,M.Alkowni,R.Savino,V.Martellu,G.P.and R.Garau. 2000.Advances in diagnosis of virus.Informatore Fitopatologico.50:11,49-52.

Hartman,R.D. 1974. Dasheen Mosaic Virus of Cultivated Aroid and Its Control by Seed Propagation and Culture of Shoot Tips. Ph.D. Dissertation University of Florida.Gainesville.5op.

Martelli,G.P.Sabanadzovic,S.Savino,V.Abu Zurayk.A.R. and M.Masannat.1995.Virus-like disease and viruses of olive in Jordan.Phytopathologia – Mediterranea.34:2,133-136.

Tompkins , C.M. and M.W. Gradner. 1934 . Spotted wilt of Head Lettnce. Phythopathology : 1135 -1136.

Tzeng,H.L.C.Chen,M.J.andD.D.S.Tzeng.1996.An improved method for isolating closteroviral dsRNAs from leafroll affectec grapevines.Plant Pathology Bulletin. 5 : 1,47 - 54.

Verplancke , A. 1930. Une Maladia "A Virus Fillterand " des Anthuriun. Compt . Fend.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 Arceous Plants. Phytophathology 60 : 983 – 987.