

คุณสมบัติบางประการของเชื้อไวรัส สาเหตุโรคใบด่างของว่านสี่ทิศ

Some Properties of a Virus Causing Mosaic Symptom of Amaryllis

พัฒนา ศรีฟ้า และ ชีระ สุตะบุตร¹

Pattana Srifah and Thira Sutabutra

ABSTRACT

The virus causing mosaic symptom on Amaryllis in Thailand resembles *Hippeastrum* mosaic virus. The virus is mechanically transmissible to few species of Amaryllidaceae, Chenopodiaceae, and Solanaceae. The virus has a dilution end point between 1:1,000 – 1:10,000, thermal inactivation point between 55 – 60°C and longevity in vitro between 1 – 2 days. It is a flexuous rod virus of 600 – 750 nm in length. Ultrathin sections of infected leaves reveal pinwheel inclusions. This virus is a member of Potyvirus group.

บทคัดย่อ

เชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างของว่านสี่ทิศที่พบในประเทศไทย มีคุณสมบัติคล้ายกับเชื้อ *Hippeastrum* mosaic virus โดยเชื้อสาเหตุสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีสัมผัสจากน้ำคั้นพืชเป็นโรคไปยังพืชบางชนิดในตระกูล Amaryllidaceae, Chenopodiaceae และ Solanaceae ไวรัสในน้ำคั้นพืชที่เป็นโรคมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเมื่อเจือจางสูงสุดระหว่าง 1 : 1,000 ถึง 1 : 10,000 หมดความสามารถในการทำให้เกิดโรคเมื่อได้รับความร้อนสูงสุดระหว่าง 55 ถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และมีความคงทนอยู่ในน้ำคั้นที่สภาพอุณหภูมิห้อง นาน 1 ถึง 2 วัน จาก dip preparation พบอนุภาคไวรัสท่อนยาว คด มีความยาวในช่วง 600 ถึง 750 นาโนมิเตอร์ ลักษณะโครงสร้างจุลภาคของเซลล์ในว่านสี่ทิศเป็นโรคพบ inclusion bodies แบบ pinwheel ไวรัสชนิดนี้จัดอยู่ใน Potyvirus group

คำนำ

ว่านสี่ทิศ (*Hippeastrum* sp. syn. *Amary-*

llis sp.) เป็นไม้ดอกประเภทหัวที่ควรได้รับการส่งเสริมให้มีการปลูกเป็นไม้ดอกประดับสถานที่ และไม้ตัดดอก เนื่องจากมีดอกที่สวยงาม การปลูกเลี้ยง ดูแลรักษา และการขยายพันธุ์ทำได้ง่าย

จากการสำรวจพบว่า ว่านสี่ทิศทั้งพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์ลูกผสมจากต่างประเทศส่วนใหญ่แสดงอาการใบด่าง คล้ายกับอาการผิดปกติที่เกิดจากไวรัสซึ่งเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคใบด่างของว่านสี่ทิศมีหลายชนิดด้วยกัน เช่น Tomato spotted wilt virus (Smith, 1935) Sunflower mosaic virus (Smith, 1957) Cucumber mosaic virus (Anonymous, 1958) *Hippeastrum* mosaic virus (Brants and van den Heuvel, 1965; Brunt, 1973) *Hippeastrum* streak virus (van Velsen, 1967) Tobacco mosaic virus (de Leeuw, 1972 a) *Hippeastrum* latent virus (Brolman – Hypkes, 1975) ดังนั้น การทดลองในครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของไวรัส เพื่อจัดจำแนกชนิดของไวรัส ตลอดจนแนวทางในการวางแผนการป้องกันการแพร่ระบาด และการป้องกันกำจัดโรคต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

แหล่งของเชื้อ

นำวุ้นสปีทิสพันธุ์พื้นเมืองที่แสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน (ภาพที่ 1 ก) จากแปลงปลูกพืชทดลองภาควิชาพืชสวน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มาถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธีกลบนวุ้นสปีทิสอายุ 1 เดือน เมื่อพืชแสดงอาการของโรค จึงขยายพันธุ์โดยการแบ่งหัว และเก็บพืชไว้ในงานทดลองต่อไป

การศึกษานิคมของพืชอาศัยและอาการที่เกิดขึ้น

ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนพืชชนิดต่าง ๆ ใน 8 วงศ์ จำนวน 29 ชนิด ตรวจสอบอาการหลังปลูกเชื้อ 7 ถึง 30 วัน สำหรับพืชที่ไม่แสดงอาการ ทำการปลูกเชื้อกลับ (back inoculation) บน *Chenopodium quinoa* Willd. และนำไปตรวจสอบภาวะไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษาคูสมบัติทางกายภาพ

การศึกษาคูสมบัติทางกายภาพของไวรัสในน้ำคั้นที่เตรียมได้จากวุ้นสปีทิสเป็นโรคหลังจากการ treat ปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนพืชทดสอบ *Hyocymus niger* โดยวิธี half leaf method

การทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรคเมื่อน้ำคั้นเจือจางจนถึงจุดสูงสุด (Dilution end point, DEP) โดยเจือจางน้ำคั้นในอัตรา 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1,000 และ 1 : 10,000 ด้วย phosphate buffer ความสามารถในการทำให้เกิดโรคเมื่อได้รับความร้อน (Thermal inactivation point, TIP) โดยใช้อุณหภูมิ 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส และความคงทนในน้ำคั้น (Longevity in vitro, LIV) ในสภาพอุณหภูมิห้อง ในช่วงเวลา 0, 6, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานของไวรัส

โดยการทำ dip preparation จากวุ้นสปีทิสที่แสดงอาการใบด่างย้อมด้วย uranyl acetate 2%,

pH 4.4 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Hitachi HU-12A

การศึกษาโครงสร้างจุลภาคของเซลล์ที่เป็นโรค

ตัดใบวุ้นสปีทิสที่แสดงอาการใบด่างและพืชปกติ ขนาด 1 × 2 มิลลิเมตร รักษาสภาพเซลล์ (fix) ด้วย glutaraldehyde 2.5% และ osmium tetroxide 2% dehydrate tissue ด้วย acetone series และ infiltrate tissue ใน spurr's resin (Spurr, 1969) ตัดชิ้นส่วนพืชด้วย LKB-8,800 Ultramicrotome ย้อม section ด้วย uranyl acetate 5% และ lead citrate 0.1% ตรวจสอบลักษณะโครงสร้างของเซลล์พืชด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน Hitachi HU-12A

การเตรียมไวรัสก่อนข้างบริสุทธ์

การเตรียมไวรัสบริสุทธ์ตัดแปลงจากวิธีของ Jones และ Diachun (1976) โดยนำใบวุ้นสปีทิสที่แสดงอาการใบด่างแช่แข็ง บดใบใน potassium phosphate buffer 0.5 M, pH 7 ที่มี urea 1 M, sodium diethyldithiocarbamate 0.01 M (DIECA), thioglycolic acid 0.5% และ ethyldiaminotetraacetate 0.1 M (EDTA) ผสมอยู่ กรองด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำคั้นมาผสมกับ chloroform ในอัตรา น้ำคั้น 2 ส่วนต่อ chloroform 1 ส่วน กวนให้เข้ากัน นาน 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำ 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปเติม polyethylene glycol 4% (PEG 6,000) และ sodium chloride 4% กวนนาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วย potassium phosphate buffer 0.5 M, pH 7 ที่มี urea 1 M ผสมอยู่ เติม chloroform ในอัตราส่วน สารละลายที่ได้ 2 ส่วนต่อ chloroform 1 ส่วน กวนนาน 30 นาที นำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำน้ำใสส่วนบนไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำน้ำใสที่ได้หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 30,000 รอบต่อนาที นาน 90 นาที ละลาย

ตะกอนที่ได้ แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำนาน 10 นาที นำสารละลายที่ได้ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยใช้ sucrose density gradient (SDG) ใช้ความเร็ว 27,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 90 นาที สารละลายไวรัสที่เตรียมได้นำไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกลบนพืชทดสอบ (*Hyocymus niger*) เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดโรค ตรวจสอบลักษณะอนุภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และใช้ในการเตรียม antiserum ต่อไป

การศึกษาคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา

ฉีดสารละลายไวรัสที่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant เข้ากล้ามเนื้อสะโพกกระต่าย ครั้งละ 2 มิลลิลิตร 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 5 วัน หลังจากฉีดครั้งสุดท้าย 7 วัน เจาะเลือด นำ antiserum มาทดสอบกับไวรัส โดยวิธี slide precipitin test และ Ouchterlony agar double diffusion test

ผล

ชนิดของพืชอาศัยและอาการที่เกิดขึ้น

จากการทดลองปลูกเชื้อด้วยวิธีกล บนพืช 28 ชนิด ใน 8 วงศ์ พบว่ามีพืชเพียง 4 ชนิด ใน 3 วงศ์ คือ Amaryllidaceae, Chenopodiaceae และ Solanaceae เท่านั้นที่เป็นพืชอาศัยของไวรัสชนิดนี้ (ตารางที่ 1 ภาพที่ 1 ก-ง) ลักษณะอาการมีทั้งแบบรอยแผลเฉพาะแห่งและอาการแบบแพร่กระจาย ซึ่งว่านสี่ทิศบางต้นอาจไม่แสดงอาการให้เห็น

คุณสมบัติทางกายภาพ

ไวรัสสาเหตุโรคใบด่างของว่านสี่ทิศในน้ำคั้นที่เป็นโรคมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคเมื่อเจือจาง สูงสุด 1 : 1,000 ถึง 1 : 10,000 หมดความสามารถในการทำให้เกิดโรคเมื่อได้รับความร้อนสูงสุดระหว่าง 55-60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และมีความคงทนอยู่ในน้ำคั้นที่สภาพอุณหภูมิห้องนาน 1 ถึง 2 วัน

ลักษณะทางสัณฐาน

ไวรัสมีอนุภาคเป็นท่อนยาวคด (flexuous rod) (ภาพที่ 1 จ) มีความยาวอยู่ในช่วง 600 ถึง 750 นาโนเมตร จัดได้ว่าเป็นไวรัสในกลุ่ม Potyvirus

ลักษณะโครงสร้างจุลภาคของเซลล์ที่เป็นโรค

ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเซลล์เนื้อเยื่อใบที่เป็นโรคพบอนุภาคไวรัสอยู่รวมกันเป็นกลุ่มในส่วน of cytoplasm และ inclusion bodies แบบ pinwheel ซึ่งประกอบด้วย laminated aggregate เรียงตัวกันมีลักษณะคล้ายกังหัน (ภาพที่ 1 ฉ) เป็นจำนวนมากในส่วน cytoplasm เช่นกัน

การเตรียมไวรัสก่อนข้างบริสุทธิ์

การเตรียมเชื้อไวรัสก่อนข้างบริสุทธิ์จากใบว่านสี่ทิศที่เป็นโรค โดยวิธีของ Jones และ Diachun (1976) ได้สารละลายไวรัสก่อนข้างบริสุทธิ์สีขาวขุ่นเล็กน้อย มีค่า absorption spectrum สูงสุดที่ 258 นาโนเมตร ต่ำสุดที่ 242 นาโนเมตร ค่า O.D. 260/280 = 1.25 หลังการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วต่ำพบไวรัสตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด centrifuge ในปริมาณมาก จากการตรวจดูอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า อนุภาคไวรัสเป็นท่อนยาวคดขนาดประมาณ 700 นาโนเมตร ส่วนใหญ่มีการจับตัวกันเป็นกลุ่ม (aggregate) และเชื้อไม่สามารถทำให้เกิดโรคกับพืชทดสอบ (*Hyocymus niger*) หลังการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล อาจเนื่องมาจากการจับตัวกันของอนุภาคไวรัสทำให้ไวรัสเสีย biological function

การนำสารละลายไวรัสไปผ่าน sucrose density gradient พบว่า ไวรัสส่วนใหญ่ตกตะกอนที่ก้นหลอด centrifuge มีบางส่วนที่ค้างอยู่ใน gradient

คุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา

antiserum ที่ผลิตได้มีระดับ titer ต่ำเพียง 1 : 64 จากการทดสอบโดย slide precipitin test

ตารางที่ 1 ชนิดของพืชอาศัยและอาการที่เกิดขึ้นหลังจากการปลูกเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างของว่านสี่ทิศ

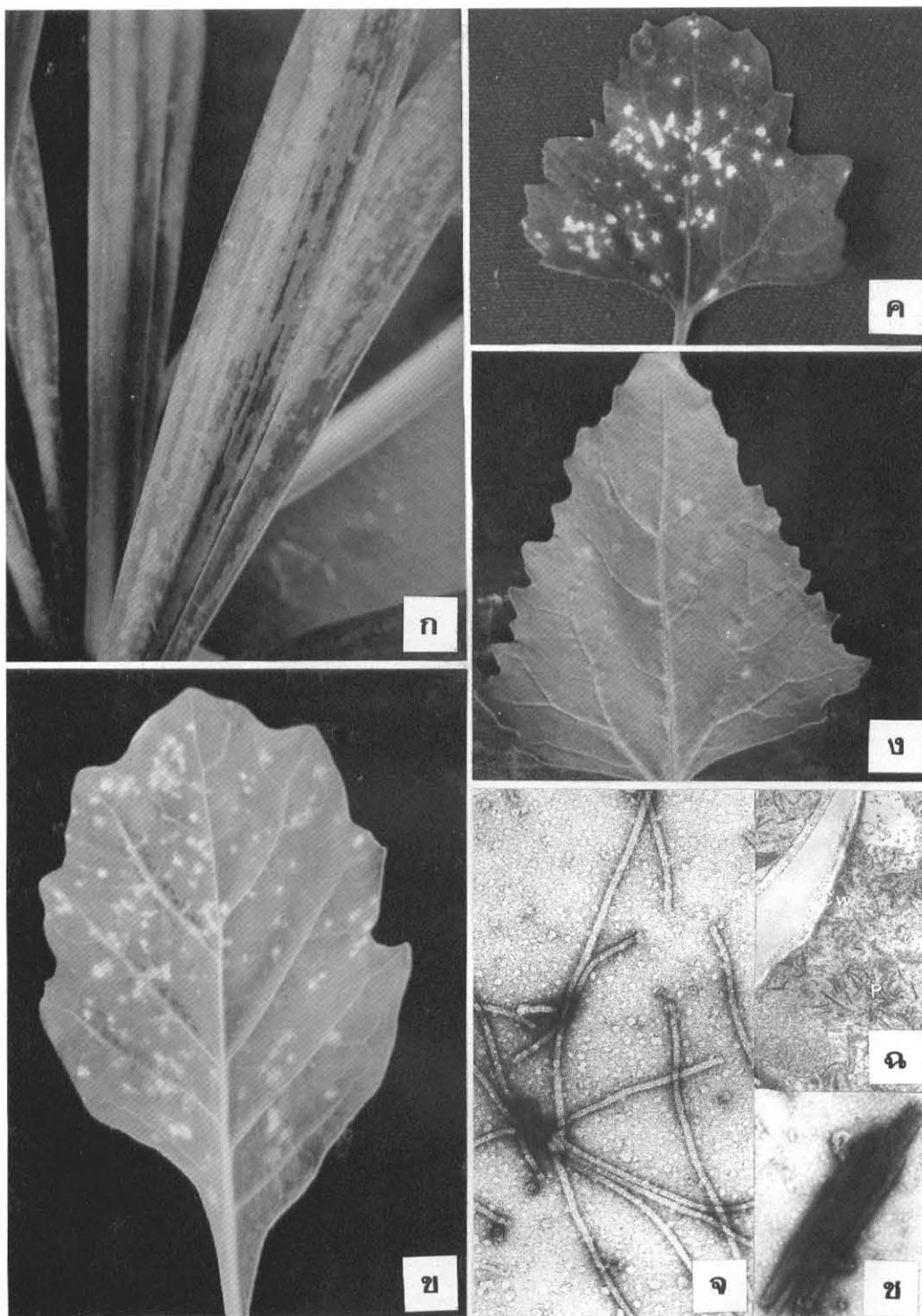
พืชทดลอง	ชื่อสามัญ	อาการ
Amaranthaceae		
<i>Gomphrena globosa</i> L.	บานไม่รู้โรย	n
Amaryllidaceae		
<i>Amaryllis</i> sp.	ว่านสี่ทิศ	s, (s)
Chenopodiaceae		
<i>Chenopodium amaranticolor</i> Coste and Reyn.	goose foot	n
<i>C. murale</i> L.	-	l
<i>C. quinoa</i> Willd.	-	l
Compositae		
<i>Zinnia elegans</i> Jacq.	บานชื่น	n
Cruciferae		
<i>Brassica albogabra</i> Bail.	คะน้า	n
<i>B. chinensis</i> Jusl. var. <i>parachinensis</i> (Bailey) Tsen and Lee	ผักกาดกวางตุ้ง	n
<i>Raphanus sativus</i> L.	ผักกาดหัว	n
Cucurbitaceae		
<i>Benincasa hispida</i> Coqn.	ฟักเขียว	n
<i>Citrullus vulgaris</i> Schrad.	แตงโม	n
<i>Luffa acutangula</i> (L.) Roxb.	บวบเหลี่ยม	n
<i>Momordica charantia</i> L.	มะระ	n
Leguminosae		
<i>Arachis hypogaea</i> L.	ถั่วลิสง	n
<i>Crotalaria juncea</i> L.	ปอเทือง	n
<i>Glycine max</i> (L.) Merr.	ถั่วเหลือง	n
<i>Pisum sativum</i> L.	ถั่วลันเตา	n
<i>Vigna sesquipedalis</i> Wight.	ถั่วฝักยาว	n
<i>V. sinensis</i> (L.) Endl ex Hassk.	ถั่วพุ่ม	n
Solanaceae		
<i>Capsicum annuum</i> L.	พริกชี้ฟ้า	n
<i>Datura stramonium</i> L.	ลำโพง	n
<i>Hyocymus niger</i> L.	-	l
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	มะเขือเทศ	n
<i>Nicotiana elevelandii</i> Gray	ยาสูบ	n
<i>N. glutinosa</i> L.	ยาสูบใบเล็ก	n
<i>N. tobacum</i> L.	ยาสูบใบใหญ่	n
<i>Petunia hybride</i> Vilm.	พืทูเนีย	n
<i>Solanum melongena</i> L.	มะเขือยาว	n

l = local infection

n = no infection

s = systemic infection

(s) = symptomless systemic infection



ภาพที่ 1 (ก) ว่านสีทึบแสดงอาการใบด่างสีเขียวยาวอ่อนสลบสีเขียวยเข้ม ใช้เป็นแหล่งของเชื้อ (ข) *Hyocymus niger* (ค) *Chenopodium quinou* (ง) *C. murale* แสดงอาการแผลจุดสีน้ำตาลหลังจากการปลูกเชื้อ (จ) ลักษณะอนุภาคไวรัสเชื้อสาเหตุมีลักษณะเป็นท่อนยาวคดขนาด 600—750 นาโนเมตร (ฉ) และ (ช) ลักษณะ pinwheel inclusion body พบใน cytoplasm ของเซลล์ว่านสีทึบเป็นโรค

และจากการทดสอบโดย Ouchterlony agar double diffusion test ไม่เกิดปฏิกิริยา การใช้ sodium lauryl sulfate 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตัดอนุภาคไวรัสให้เป็นท่อนสั้น ๆ เพื่อให้ผ่านวุ้นได้ง่ายขึ้นก็ไม่เกิดปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน

วิจารณ์

จากลักษณะการถ่ายทอดโรค ลักษณะอาการบนพืชชนิดต่าง ๆ คุณสมบัติทางกายภาพ และลักษณะทางสัณฐานของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างของว่านสี่ทิศที่พบในประเทศไทยสรุปได้ว่า มีลักษณะคล้ายกับ *Hippeastrum* mosaic virus ซึ่งรายงานโดย Brunt (1973) ถึงแม้ว่าพืชอาศัยของไวรัสชนิดนี้จะมียูน้อยชนิด และไม่สามารถเข้าทำลายพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยก็ตาม จากการสำรวจพบว่าว่านสี่ทิศพันธุ์ลูกผสมที่มีการนำเข้ามาจากต่างประเทศได้นำเชื้อไวรัสสาเหตุโรคใบด่างเข้ามาด้วย ดังนั้น จึงควรมีวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ติดมากับหัวว่านสี่ทิศซึ่งมีจำนวนมากต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Anonymous. 1958. Veral. Meded. plziektenk. Dienst Wageningen 132 (Jaarboek 1958) : 43.
- Brants, D.H. and J. van den Heuvel. 1965. Investigation of *Hippeastrum* mosaic virus in *Hippeastrum hybridum*. Neth. J. Pl. Path. 78 : 107—109.
- Brolman-Hypkes, J.E. 1975. Tentative description of *Hippeastrum* latent virus in *Hippeastrum hybridum* plants and differentiation from *Hippeastrum* mosaic virus. Neth. J. Pl. Path. 81 : 226—236.
- Brunt, A.A. 1973. *Hippeastrum* mosaic virus. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No. 177.
- Jones, R.T. and Diachun. 1976. Identification and prevalence of viruses in red clover in control Kentucky. Pl. Dis. Repr. 60 : 690—694.
- de Leeuw, G.T.N. 1972 a. Tobacco mosaic virus in *Hippeastrum hybrida*. Neth. J.Pl. Path. 78 : 69—71.
- Smith, K.M. 1935. Some diseases of ornamental plants caused by the virus of tomato spotted wilt. Jl R. Hort. Soc. 60 : 304—310.
- Smith, K.M. 1957. A Textbook of Plant Viruses. 2 nd ed., London.
- Spurr, A.R. 1969. A Low-viscosity epoxy resin embedding medium for electronmicroscopy. J. Ultrastructure Research. 26 : 31—43.
- van Velsen, R.J. 1967. *Hippeastrum* streak, a virus disease of *Hippeastrum vittatum* in Papua and New Guines. Papua New Guin. Agric. J. 19 : 13—16.