ว. วิชาการเกษตร กษ. 10 : 81-84 (2535) THAI AGRICULTURAL RESEARCH JOURNAL VOL.10, MAY - AUGUST 1992

การศึกษาเบื้องต้นโรคไวรัสของวนิลาในประเทศไทย

ประเสริฐ วงศ์วัฒนารัตน์* นวลจันทร์ ดีมา△
และปิยะนันท์ ไวมาลา△

บทคัดย่อ

ใบของวนิลาที่แสดงลักษณะอาการใบด่างและผิวใบขรุขระ ซึ่งได้จากการสุ่มเก็บในแปลงทดลอง บริเวณศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร ถูกนำมาตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอน โดยวิธี Leaf Dip Technique ผลการตรวจพบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวประมาณ 750-800 nm. ในเนื้อเยื่อของใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลา นอกจากนี้ได้ทำการตรวจสอบ Cymbidium Mosaic Virus (CyMV) และ Odontoglossum Ringspot Virus (ORSV) โดยใช้แอนติซีรั่มของไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ด้วยวิธี ELISA แต่ผลการตรวจ CyMV และ ORSV ในเนื้อเยื่อใบวนิลาที่เป็นโรคพบว่าไม่ใช่ CyMV และ ORSV และทดสอบการถ่ายทอดโรค โดยวิธี Sap Inoculation โดยใช้พืชทดสอบ 8 ชนิดไม่แสดงอาการใบด่างหรือผิดปกติแต่อย่างไร หลังจากการปลูกเชื้อ 30 วัน จากผลเบื้องต้นนี้ลักษณะอาการใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลา อาจจะมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย แต่เชื้อไวรัสชนิดที่พบนี้ไม่ใช่ชนิดเดียวกับ CyMV หรือ ORSV ฉะนั้นการศึกษาการถ่ายทอดโรค ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มจำนวนของอนุภาคในเนื้อเยื่อพืช ตลอดจนถึงการเกิดและพัฒนาการของโรค การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัส จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

คำหลัก : วนิลา โรคไวรัสของวนิลา

Preliminary Study on Virus Disease of Vanilla in Thailand

Prasert Wongwathanarat* Naulchun Deema△
and Piyanun Wimala△

Abstract

Samples of mosaic and blistering leaves of *Vanilla fragrans* Ames were collected at Chumphon Horticulture Research Centre. They were examined for virus particle by Leaf Dip Technique under electronmicroscope and checked for Cymbidium Mosaic Virus (CyMV) and Odontoglossum Ringspot Virus (ORSV) by ELISA Test. Disease transmission was also studied by sap inoculation. Eight species of test plants were used *(Gomphrena globosa* L., *Zinnia elegans* Jacq., *Jussiea repens* L., *Petunia* spp, *Callistephus chinensis* L., *Datura stramonium* L., *Cassia occidentalis* L.

* ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร อ.สวี จ.ชุมพร 86130
△ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร บางเขน จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

* Chumphon Horiculture Research Centre, Sawi, Chumphon 86130
△ Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

and *Physalis floridana* Rydb). The virus particles, 750 – 800 nm long were found in tissue of mosaic and blistering leaves. Detection of CyMV and ORSV in disease leaves were negative by ELISA. There was no any virus symptoms appeared on eight species of test plants by sap inoculation. Therefore, mosaic and blistering symptoms on vanilla leaves might be caused by the potyvirus. However, further study of disease transmission, factor involved on virus multiplication in leaf tissue and identification of virus particles need to be studied.

Keywords : vanilla, virus disease of vanilla

วนิลาเป็นพืชชนิดหนึ่งที่ถูกจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับกล้วยไม้ (Family Orchidaceae) และมีมากกว่า 110 ชนิด (species) วนิลาเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ทางบริเวณตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศเม็กซิโก ประเทศกัวเตมาลาและประเทศทางแถบอเมริกากลาง (Purseglove *et al.*, 1981) ปัจจุบันหมู่เกาะซึ่งอยู่บริเวณ South Pacific หรือบริเวณที่เรียกว่า โอเซียเนีย (Oceania) เช่น หมู่เกาะ Tonga และ French Polynesia นับว่าเป็นแหล่งปลูกและส่งออกวนิลาที่สำคัญแหล่งหนึ่งของโลก (Wisler *et al.*, 1987) สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีข้อมูลและแหล่งปลูกวนิลาที่แน่ชัด แต่ขณะนี้ทางศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพรได้มีการทดลองปลูกวนิลาบ้างแล้ว

Cymbidium Mosaic Virus (CyMV) และ Odontoglossum Ringspot Virus (ORSV) เป็นไวรัส 2 ชนิด ที่มักจะพบและสร้างความเสียหายให้แก่กล้วยไม้เป็นจำนวนมาก (Lawson and Ali, 1975; Wisler *et al.*, 1979; Zettler *et al.*, 1978) Wisler *et al.* (1986) ได้รายงานว่าพบ Cymbidium Mosaic Virus (CyMV) และไวรัสชนิด Potyvirus (ซึ่งยังไม่ได้จำแนกชนิด) กับ *Vanillia tahitensis* J.W. Moore ที่ Society island ซึ่งเป็นหมู่เกาะที่อยู่ในแหล่งผลิตวนิลาดังที่ได้กล่าวถึงแล้วข้างต้น

ในการสังเกตลักษณะอาการผิดปกติต่าง ๆ ของต้นวนิลาที่ปลูกอยู่ในแปลงทดลองของศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร พบลักษณะอาการบางอย่าง เช่น ใบด่างและผิวใบขรุขระ ซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายคลึงกับที่ Wisler *et al.* (1987) ได้รายงานไว้ ลักษณะอาการใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลาที่กล่าวถึงนี้พบว่ามีกระจัดกระจายทั่วไปในแปลงปลูก และมีแนวโน้มว่าจะพบมากขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาเบื้องต้นนี้เพื่อที่จะทราบว่าลักษณะอาการใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลา มีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสหรือไม่ และถ้าหากว่าลักษณะอาการผิดปกติดังกล่าวของใบวนิลามีสาเหตุเกิดจากเชื้อไวรัสจะเป็นไวรัสชนิด CyMV ที่พบบนกล้วยไม้ และบน *V. tahitensis* J.W. Moore หรือไม่ เพื่อที่จะได้เป็นข้อมูลเบื้องต้น นำไปใช้ในการศึกษาหาแนวทางป้องกันมิให้เชื้อไวรัสที่พบบนต้นวนิลานี้แพร่กระจายออกไป และติดไปกับท่อนพันธุ์อันจะเป็นอุปสรรคต่อการส่งเสริมการปลูกวนิลา เป็นการค้าต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลา (*Vanilla fraqrans* Ames.) จากแปลงทดลองวนิลา ณ ศูนย์วิจัยพืชสวนชุมพร บันทึกลักษณะอาการผิดปกติของใบวนิลาด้วยภาพถ่าย จากนั้นจึงนำตัวอย่างใบวนิลาที่แสดงอาการผิดปกติดังกล่าวนี้มาตรวจหาอนุภาคไวรัสในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี Leaf Dip โดยตัดเนื้อเยื่อใบวนิลาตรงบริเวณที่เป็นโรค นำเนื้อเยื่อที่ตัดมาบดในหยดของสารละลาย 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.1 นำกรดขนาด 300 mesh ซึ่งเคลือบด้วยคาร์บอนทับบนเยื่อฟอร์มวาร์ซึ่งทำลายประจุแล้วมาวางคว่ำบนหยดตัวอย่างนานประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นล้างกริดด้วยสารละลาย potassium phosphate buffer แล้วย้อมด้วย 2 % uranyl acetate นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบกับใบปกติแล้วบันทึกภาพไว้

2. การตรวจสอบ Cymbidium Mosaic Virus และ Odontoglossum Ringspot Virus จากใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลาด้วยวิธี ELISA

1. ทำการหยดแอนซีรั่มของ Cymbidium mosaic virus ซึ่งเจือจางเป็น 1 : 100 และ 1 : 1,000 ด้วย coating buffer หลุมละ 0.2 มล. ลงในภาชนะทดสอบ (microtitre

plate) จากนั้นนำ plate ไป incubate ที่ 37° C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง plate ด้วย phosphate buffer saline pH 7.4 ที่ผสมด้วย Tween 20 0.05% (PBS – T20) 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

2. เตรียมตัวอย่างน้ำคั้นจากใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลา โดยการบดเนื้อเยื่อพืชตรงบริเวณที่เป็นโรคในสารละลาย phosphate buffer saline ที่ผสมด้วย Tween 20 0.05% และ polyvinylpyrolidone 4000 2% (PBS – T20 + PVP) ประมาณ 1 : 10 (เนื้อเยื่อพืช : สารละลาย) แล้วเจือจางเป็น 1 : 100, 1 : 1,000 และ 1 : 10,000 ตามลำดับ จากนั้นหยดตัวอย่างน้ำคั้นที่เตรียมไว้จำนวน 0.2 มล. ลงในหลุม แล้วนำ plate ไป incubate ในตู้เย็น (ประมาณ 4–6°ซ) นานประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำ plate มาล้างด้วย PBS – T20 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

3. หยด enzyme conjugate IgG ที่เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว (เจือจาง 1 : 750 ด้วย PBS – T10) ที่มี PVP 2% และ oval albumin 0.2% หลุมละ 0.2 มล. นำ plate ตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 1 ชั่วโมงแล้วล้าง plate ด้วย PBS – T20 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

4. หยด substrate (substrate ที่ใช้คือ para – nitrophenyl phosphate 1 mg/ml ใน diethanolamine buffer) หลุมละ 0.2 มล. แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อรอดูปฏิกิริยาการเกิดสี เมื่อปฏิกิริยาการเกิดสีเกิดขึ้นชัดเจนดีแล้ว จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยการหยดสารละลาย 3 M NaOH ลงในหลุม

5. การตรวจผล ตรวจโดยดูปฏิกิริยาการเกิดสีเหลืองของ para – nitrophenyl phosphate

3. การพิสูจน์โรคกับพืชทดสอบโดยวิธี Sap Inoculation

นำใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลามาบดในสารละลาย 0.1 M. Potassium phosphate buffer pH. 7.2 แล้วโรยผงคาร์โบรันดัม ขนาด 400 mesh ลงบนใบของพืชทดสอบ จากนั้นนำน้ำคั้นที่เตรียมไว้มาทาบนใบพืชทดสอบที่โรยผงคาร์โบรันดัมไว้ เปรียบเทียบกับ control ซึ่งใช้น้ำทาลงบนใบอีกชุดหนึ่งของพืชทดสอบ ทิ้งไว้ประมาณ 30 วัน จึงตรวจผล พืชทดสอบที่นำมาใช้ในการทดลองมี 8 ชนิด ดังนี้ บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa* L.) บานชื่น (*Zinnia elegans* Jacq.) แพงพวย (*Jussiaea repens* L.) พิทูเนีย (*Petunia* spp.) แอสเทอร์ (*Callistephus chinensis* L.) ลำโพง (*Datura stramonium* L.) ขี้เหล็กเทศ (*Cassia occidentalis* L.) และ โทงเทง (*Physalis floridana* Rydb.)

ผลการทดลอง

1. การตรวจหาอนุภาคไวรัสจากตัวอย่างใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

พบอนุภาคของเชื้อไวรัสชนิดท่อนยาวซึ่งมีขนาดยาวประมาณ 750 – 800 nm (Figure 1) จากอาการใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลา (Figure 2)

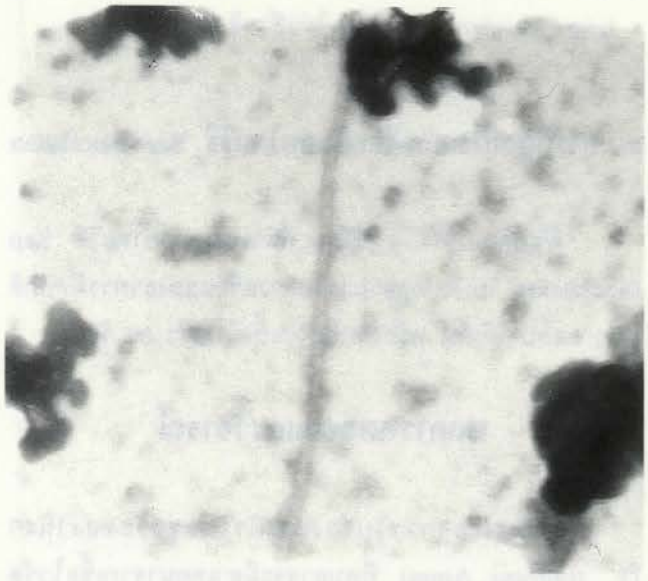

Figure 1. Virus particles found in mosaic and blistering leaf tissue of *V. fraqrans* Ames.

Figure 2. A leaf of *V. fraqrans* Ames. with mosaic and blistering symptoms.

2. การตรวจสอบ Cymbidium Mosaic Virus และ Odontoglossum Ringspot Virus ด้วยวิธี ELISA

ผลของปฏิกิริยาปรากฏออกมาเป็นลบ ไม่มีการเปลี่ยนสีของ para – nitrophenyl phosphate เป็นสีเหลืองในการทดสอบ (Table 1) แสดงว่าอนุภาคไวรัสที่อยู่ในเนื้อเยื่อของใบวนิลาที่เป็นโรคไม่ใช่ชนิด CyMV และ ORSV

Table 1. ELISA Test for CyMV and ORSV from Leaves of *V. fragrans* Ames.

Symptom	Reaction	
	CyMV	ORSV
Healthy leaves	–	–
Mosaic and blistering leaves	–	–

\+ para – nitrophenyl phosphate เปลี่ยนเป็นสีเหลือง

– para – nitrophenyl phosphate ไม่เปลี่ยนสี (ใส)

3. การพิสูจน์โรคกับพืชทดสอบโดยวิธี Sap Inoculation

พืชทดสอบทั้ง 8 ชนิด ที่นำมาทดสอบโดยวิธี Sap Inoculation ไม่ปรากฏอาการใบด่างหรือแสดงอาการผิดปกติใด ๆ ออกมาให้เห็น หลังจากที่ปลูกเชื้อไปแล้ว 30 วัน

ผลการทดลองและวิจารณ์

ลักษณะอาการใบด่างและผิวใบขรุขระของวนิลา (*V. fraqrans* Ames) ที่พบอาจจะมีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย เนื่องจากการตรวจเนื้อเยื่อที่เป็นโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัสชนิดยาว อยู่ในเนื้อเยื่อและอนุภาคไวรัสที่ตรวจพบมีลักษณะทางสัณฐานที่แตกต่างจากเชื้อไวรัส ชนิด CyMV และ ORSV ที่พบบนกล้วยไม้ เพราะอนุภาคไวรัสที่พบบนใบด่างวนิลามีขนาดของอนุภาคยาวกว่า นอกจากนั้นแล้วผลการตรวจ CyMV และ ORSV โดยใช้แอนทิซีรั่มของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดนี้ ด้วยวิธี ELISA ปรากฏผลว่าไม่เกิดปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของ para – nitrophenyl phosphate ไปเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อไวรัสที่พบในเนื้อเยื่อของใบวนิลาที่เป็นโรคไม่ใช้อนุภาคไวรัสชนิด CyMV อย่างที่ Wisler *et al.* (1986) ได้รายงานไว้ แต่ถึงอย่างไรก็ตาม การตรวจด้วยวิธี EIISA ก็ให้ความถูกต้องและแม่นยำในระดับหนึ่งเท่านั้น

พืชทดสอบทั้ง 8 ชนิดที่นำมาใช้ตรวจสอบปรากฏว่าไม่มีพืชชนิดใดเลยแสดงอาการใบด่าง หรือผิดปกติแต่อย่างใด หลังจากปลูกเชื้อนาน 30 วัน ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณอนุภาคไวรัสในน้ำคั้น จากใบวนิลาที่เป็นโรคที่นำมาปลูกเชื้อลงบนใบของพืชที่ทดสอบมีปริมาณน้อย หรือไวรัสชนิดนี้ไม่ใช่ชนิดที่รุนแรง ที่สามารถทำให้เกิดอาการด่างได้อย่างรวดเร็ว หรือเชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่สามารถถ่ายทอดโรคได้โดยทางน้ำคั้นพืช หรือพืชทดสอบทั้ง 8 ชนิด ที่นำมาใช้ทดสอบนี้ไม่ใช่พืชอาศัยของเชื้อไวรัสชนิดนี้ เหตุที่นำเอาพืชทั้ง 8 ชนิดมาใช้เป็นพืชทดสอบในการศึกษาเบื้องต้นนี้เพราะว่าพืชทดสอบทั้ง 8 ชนิด เป็นพืชทดสอบที่หาได้ง่าย และเป็นพืชทดสอบที่มักจะใช้กันทั่ว ๆ ไป ในการทดสอบกับเชื้อไวรัสที่พบครั้งแรกโดยที่ยังไม่ทราบชนิดของเชื้อไวรัสนั้น ๆ ฉะนั้นจึงสมควรที่จะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเกิดและพัฒนาการของอาการของโรคนี้ ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของอนุภาคไวรัสในใบที่เป็นโรคการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ ตลอดจนถึงการถ่ายทอดโรคไวรัสของวนิลา การพิสูจน์โรคและพืชอาศัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารอ้างอิง

Lawson, R.H. and S. Ali 1975. Orchid Viruses and their detection by Bioassay, Serology and Electron Microscopy. The Handbook on Orchid Pests and Diseases. AM. Orchid Soc., Inc., Cambridge, MA. 112 p.

Purseglove, J.W. E.G. Brown, C.L. Green, and S.R.J. Robbins. 1981. Vanilla : Spices Vol. 2, Longman New York. 813 p.

Wisler, G.C., F.W. Aettler, and T.J. Sheehan 1979. Relative incidence of cymbidium mosaic and odontoglossum ringspot viruses in several genera of wild and cultivated orchids. Proc. Fla. State Hortic. Soc. 92 : 339 – 340.

Wisler, G.Z., F.W. Aettler, and L. Mu. 1986. Two viruses of Vanilla : in Society Islands. (Abstr.) Phytopathology 76 : 1091.

Wisler, G.C., F.W. Lettler and L. Mu. 1987. Virus infections of Vanilla and other orchids in French Polynesia. Plant Disease 71 : 1125 – 1129.

Zettler, F.W., G.R. Hennen, W.K. Bodnaruk, H.T. Clifford, and T.J. Sheehan. 1978. Wild and cultivated orchids surveyed in Florida for the cymbidium and odontoglossum ringspot viruses. Plant Dis. Rep. 62 : 949 – 952.