ว. วิชาการ กษ. 2 : 20–25 (2527)

ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคและการถ่ายทอดเชื้อวิสาของเห็ดนางรม

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา และ วรลักษณ์ พฤฒิภิญโญ[1]

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเห็ดนางรมสามารถเพาะได้ตลอดปี ให้ผลตอบแทนแก่ผู้เพาะในระยะเวลาอันสั้นสูง วัสดุเหลือใช้ที่ใช้ในการเพาะหาง่าย การเพาะเห็ดนางรมเป็นได้ทั้งอาชีพหลักและอาชีพรอง ปัญหามีอยู่บ้างในด้านโรคและแมลงซึ่งมักพบกับเห็ดนางรม จากการตรวจและศึกษาเห็ดนางรมที่มีลักษณะอาการผิดปกติ กล่าวคือ เห็ดนางรมมีดอกม้วนขึ้นหรืองอลง ดอกแคระแกรน ช่อดอกสั้นเป็นกระจุก ดอกมีขนาดเล็ก ขอบดอกไม่เรียบและเมื่อถูกน้ำจะฉ่ำน้ำกว่าปกติ พบว่ามีอนุภาคของเชื้อวิสาที่มีรูปร่างทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 25 nm ซึ่งคล้ายคลึงกับลักษณะของ mushroom virus 1 จากการศึกษาทดลองเชื้อวิสาชนิดนี้พบว่าสามารถถ่ายทอดได้โดยวิธีการสัมผัส (mechanical) 3 วิธี คือ การราดเชื้อวิสาลงในถุงเชื้อเห็ดที่กำลังจะให้ดอกเห็ด การปลูกเชื้อด้วยกาว้ใช้ carborundum และการฉีดเข้าที่โคนก้านดอกเห็ด นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดได้ด้วยการเชื่อมติดต่อกันของเส้นใยเห็ด (anastomosis) การทำเชื้อวิสาบริสุทธิ์จากดอกเห็ดสดจะได้อนุภาควิสาที่มีความเข้มข้นถึง 9.03 มก./มล. ถ้าทำจากเส้นใยจะได้ความเข้มข้น 4.25 มก./มล. จากการฉีดเชื้อวิสาบริสุทธิ์เข้าไปในกระต่าย พบว่าเซรุ่ม (serum, As)ที่เกิดขึ้นในกระต่ายเมื่อนำไปตรวจสอบด้วยวิธี Ouchterlony's agar double diffusion test มีปฏิกริยาดี ถึงแม้ว่าเซรุ่มจะมีความเจือจางถึง 1 : 128 การผลิตเซรุ่มให้มีคุณภาพสูงจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบวิสาในเชื้อเห็ด เป็นวิธีการป้องกันกำจัดขั้นพื้นฐานก่อนนำเชื้อเห็ดไปใช้ในการขยายพันธุ์ คัดพันธุ์ หรือผสมพันธุ์ เพื่อให้ได้พันธุ์ดีที่ตลาดต้องการและปราศจากโรควิสา ไม่ควรเก็บเอาเชื้อเห็ดจากดอกเห็ดในฟาร์มไปทำพันธุ์โดยไม่ได้รับการตรวจสอบ และควรเก็บรักษาเชื้อเห็ดที่ปราศจากโรควิสา เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น

เห็ด เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่กำลังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทั้งนี้เพราะเห็ดมีคุณสมบัติดีหลายประการ เห็ดเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนสูงในระยะเวลาอันสั้น เพาะง่าย ไม่มีปัญหามากเหมือนพืชชนิดอื่น ๆ วัสดุที่ใช้เพาะเป็นวัสดุที่เหลือใช้จากการเกษตร เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด ขี้เลื่อย ไส้นุ่น ฯลฯ ซึ่งหาง่าย ในแง่ผู้บริโภคนั้นเห็ดมีรสอร่อย มีคุณค่าทางอาหารสูง ใช้ปรุงอาหารได้หลายชนิด จึงนิยมบริโภคกันทั่วไป อาชีพการเพาะเห็ดนี้สามารถยึดเป็นอาชีพหลักหรืออาชีพรองเพื่อเพิ่มพูนรายได้ก็ได้ นอกจากนี้ยังเพาะเพื่อใช้บริโภคในครัวเรือน มีความสำคัญยิ่งในการช่วยแก้ปัญหาโภชนาการของประชาชน เพราะเห็ดอุดมไปด้วยแร่ธาตุอาหารต่าง ๆ โดยเฉพาะมีโปรตีนอยู่ในระดับสูง การบริโภคเห็ดจึงอาจช่วยบรรเทาปัญหาการขาดอาหารในหมู่ประชาชนที่ยากจนได้เป็นอย่างดี

[1]นักวิชาการโรคพืช สาขาวิสาวิทยา, นักวิชาการโรคพืช สาขาวิสาวิทยา, นักวิชาการโรคพืช สาขาวิสาวิทยา, และนักวิชาการโรคพืช สาขาจุลชีววิทยาประยุกต์ ตามลำดับ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร บางเขน กรุงเทพฯ 10900

โรคที่เกิดจากเชื้อวิสาที่พบในเห็ดนางรมที่มีลักษณะอาการดอกงอขึ้นหรือลงอย่างรุนแรง แคระแกรน ก้านดอกและขอบดอกไม่เรียบ เมื่อโดนน้ำจะฉ่ำน้ำกว่าปกติ ทำให้เห็ดนางรมคุณภาพลดลง ราคาตก หรือขายไม่ได้ จุดประสงค์ในการทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาสาเหตุของโรค การผลิตเซรุ่มเพื่อใช้ในการตรวจเชื้อ วิธีการตรวจเชื้อ ตลอดจนแนวทางในการป้องกันกำจัดเพื่อใช้ในการตรวจสอบสำหรับคัดพันธุ์และรวบรวมพันธุ์เห็ด

อุปกรณ์และวิธีการ

การดำเนินงานทดลองแบ่งออกเป็น 6 ขั้นตอน คือ

1. การศึกษาลักษณะอาการของโรค นำตัวอย่างเห็ดนางรมที่มีลักษณะอาการของดอกผิดปกติ แคระแกรน ดอกงอขึ้นหรือลง ก้านดอกและขอบดอกไม่เรียบ ดอกเล็กฉ่ำน้ำกว่าปกติ เอาดอกมาเขี่ยเนื้อเยื่อวางบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ในขวดซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 25–30°C เพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มขวด แล้วทำการเขี่ยเส้นใยลงในข้าวฟ่างที่อบฆ่าเชื้อแล้วเก็บไว้จนเส้นใยเจริญเต็มข้าวฟ่าง แล้วจึงเขี่ยเส้นใยลงในถุง

อาหารผสมขี้เลื่อยที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วให้อยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อ (aceptic condition) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25–30°C เพื่อให้เส้นใยเจริญเต็มถุง แล้วนำไปเปิดปากถุงอาหารผสมขี้เลื่อยให้ดอกเห็ดเจริญออกมา ในห้องควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25–30°C และมีแสงพอสมควร มีความชื้นพอเพียง ทำการสังเกตอาการของดอกเห็ดที่เป็นโรคเปรียบเทียบกับ control ซึ่งมีวิธีการปฏิบัติเช่นเดียวกัน แต่ใช้ดอกเห็ดปกติแทนดอกเห็ดที่ผิดปกติหรือเป็นโรค

2. การศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคของเชื้อวิสา (morphology) นำดอกเห็ดเป็นโรคมาบดหรือสับละเอียดใน 2% phosphotungstic acid, pH 6–7 แล้วแตะจับเชื้อวิสาด้วย grid ซึ่งมีความถี่ประมาณ 300 mesh ที่เคลือบด้วย 2% colloidion และผง carbon ที่ปรับประจุนำ grid ที่เตรียมได้ไปศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคของเชื้อวิสาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

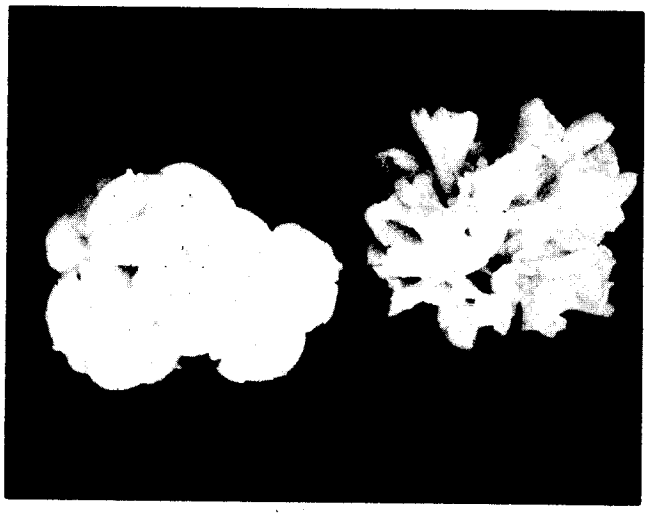
3. การทำเชื้อให้บริสุทธิ์ (purification) การทำเชื้อวิสาให้บริสุทธิ์จากดอกเห็ดสดและเส้นใยเห็ดที่เป็นโรคเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อวิสาบริสุทธิ์ในอาหาร PDA โดยใช้วิธีการทำเชื้อบริสุทธิ์ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Hollings (1962), Seayen (1967), Phatak (1974), และ Honda *et al.* (1982) มีขั้นตอนคือ นำดอกเห็ดหรือเส้นใยเห็ดมาบดละเอียดด้วย blender และ homogenizer กับส่วนผสมของ 0.3 sodium phosphate buffer, pH 7.2–7.6 กับ 0.1% thioglycollic acid ในอัตราส่วนของดอกเห็ดหรือเส้นใยต่อส่วนผสมเท่ากับ 1 : 1 หลังจากบดแล้วทำการกรอง เอาสารละลายที่ผ่านการกรองผสมกับ n-butanol ในปริมาณ 8.5% ของสารละลาย กวนให้เข้ากันนาน 30 นาที ด้วย magnetic stirrer จากนั้นนำไปปั่นด้วยความเร็วต่ำที่ 8,000 รอบ/ นาที นาน 10 นาที แล้วปั่นที่ความเร็วสูงที่ 30,000 รอบ/ นาที นาน 2 ชม. แล้วนำไปผ่านชั้นของน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 10, 20, 30 และ 40% โดยเรียงจากความเข้มข้นต่ำไปหาสูง ปั่นที่ความเร็ว 25,000 รอบ/ นาที นาน 2 ชม. เป็นการแยกเชื้อวิสาให้บริสุทธิ์จากสิ่งเจือปนอื่น เชื้อวิสาจะรวมตัวเกิดเป็นแถบสีขาวขุ่น (band) ในระหว่างชั้นของน้ำตาล ดึง band ออกด้วยเครื่อง fractionater นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 30,000 รอบ/ นาที นาน 2 ชม. เพื่อแยกตะกอนเชื้อวิสาออกจากน้ำตาล ละลายตะกอนเชื้อวิสาด้วย 0.05 phosphate buffer, pH 7.0 เก็บสารละลายที่มีเชื้อวิสาไว้ใช้ในการทดลองขั้นต่อไป การตรวจสอบความเข้มข้นและความบริสุทธิ์ของเชื้อวิสา สามารถตรวจสอบได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และวัดด้วยเครื่อง spectophotometer

4. การผลิตเซรุ่ม โดยการนำเชื้อวิสาบริสุทธิ์ที่ได้จากการทำเชื้อบริสุทธิ์ฉีดเข้ากล้ามเนื้อของกระต่าย (intramuscular) ทางขาหลังด้านซ้ายและขวาสลับกัน ส่วนผสมที่ใช้ฉีด มีเชื้อวิสาบริสุทธิ์ 1 มล. ผสมกับ incomplete adjuvant 1 มล. ฉีดเว้นระยะ 3 วันต่อครั้ง รวม 3 ครั้ง เมื่อครบ 10 วัน นับจากวันแรกที่เริ่มฉีดเข้าตัวกระต่าย ทำการเจาะเลือดที่ใบหูกระต่ายออกมาประมาณครั้งละ 20 มล. กระทำติดต่อกันสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เลือดที่เจาะได้แต่ละครั้งนำไปแยกเซรุ่มโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2–3 ชม. แล้วเก็บข้ามคืนในตู้เย็น นำเซรุ่มที่แยกตัวออกจากเม็ดเลือดแดงมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/ นาที นาน 10 นาที นำเซรุ่มที่ได้รับแต่ละครั้งมาทดสอบคุณภาพโดยการทดสอบ titer ถ้าเซรุ่มมีคุณภาพลดลง ก็ทำการฉีดเชื้อวิสาบริสุทธิ์เข้าไปอีก โดยเลือกเจาะช่วงระยะเวลาที่เซรุ่มมีคุณภาพสูงเพื่อเก็บไว้ใช้ในการตรวจสอบเชื้อวิสาในเชื้อเห็ดนางรมทางserology ต่อไป

การตรวจสอบคุณภาพของเซรุ่ม โดยการทดสอบ titer ด้วยวิธี precipitin test คือนำเซรุ่มที่ผลิตได้แต่ละครั้ง ทำให้เจือจางด้วย saline 0.85% เป็น 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024 และ 1:2048 แล้วนำเซรุ่มที่เจือจางเหล่านี้ผสมกับเชื้อวิสาบริสุทธิ์ (antigen, Ag) ซึ่งได้จากข้อ 3 ที่มีความเจือจาง 1:10 และ 1:100 ด้วย sodium phosphate buffer ทำการผสมในอัตราที่เท่ากัน ตรวจปฏิกิริยาการตกตะกอนด้วยกล้องจุลทรรศน์หรือด้วยวิธี Ouchterlony's agar double diffusion test

5. การตรวจสอบเชื้อวิสาทาง serology กระทำ 2 วิธี คือ วิธีแรกใช้ precipitin test ดังรายละเอียดที่กล่าวมาแล้วในข้อ 4 อีกวิธีหนึ่งคือ Ouchterlony's agar double diffusion test โดยใช้วุ้นที่เรียกว่า Noble agar หรือ ION agar No. 2 อย่างใดอย่างหนึ่ง ปริมาณ 0.8% ผสมกับ NaCl 0.85% ในน้ำกลั่น ต้มให้ร้อนจนวุ้นละลายหมดทิ้งให้เย็นที่ 45–50°C ใส่ NaN_3 0.2% เขย่าให้เข้ากันเทลงใน plastic plate ที่แห้งสะอาด เมื่อวุ้นเย็นลงนำไปเจาะหลุม หยดเซรุ่มที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เช่นเดียวกับในวิธี precipitin test ลงในหลุมที่ล้อมรอบหลุมกลาง แล้วหยดเชื้อวิสาบริสุทธิ์ลงหลุมกลาง เซรุ่มและเชื้อวิสาบริสุทธิ์จะเคลื่อนผ่านวุ้นมาตกตะกอนเกิดเป็นแถบสีขาว โดยเปรียบเทียบกับ control ซึ่งใช้ normal serum (Ns) แทนเซรุ่มที่กระต่ายผลิตจากการรับเชื้อวิสา (Ns คือเซรุ่มของกระต่ายตัวเดียวกันกับที่ยังไม่ได้รับเชื้อวิสาเข้าไป)

6. การถ่ายทอดเชื้อวิสา มีวิธีการทดสอบ 4 วิธี คือ



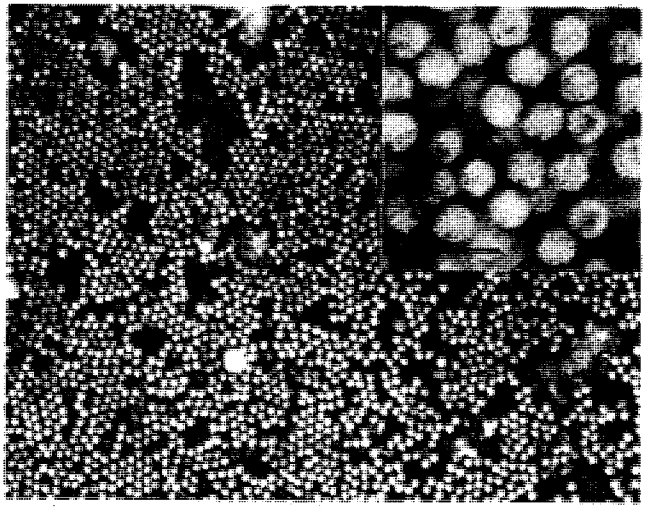
ภาพที่ 1 ลักษณะอาการของดอกเห็ดนางรมที่เป็นโรค (ขวา) เปรียบเทียบกับดอกเห็ดปกติ (ซ้าย)

6.1 ราดเชื้อวิสาบริสุทธิ์ในเส้นใยปกติที่เจริญอยู่เต็มถุงอาหารผสมขี้เลื่อยที่พร้อมจะเจริญเป็นดอก โดยใช้เชื้อวิสาที่มีความเข้มข้น 4.25 มก./ มล. ทำให้เจือจางเป็น 10 เท่า ใช้ 1 มล./ ถุง จำนวน 20 ถุง และมี control อีก 10 ถุง ที่ราดด้วยน้ำกลั่น เก็บถุงอาหารทั้งหมดไว้ในห้องทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ แสง และมีความชื้นเพียงพอเช่นเดียวกับข้อ 1 เมื่อเห็ดออกดอก เก็บดอกเห็ดแต่ละถุงมาตรวจสอบเชื้อวิสา

6.2 การปลูกเชื้อโดยการใช้ carborundum (ผงถ่าน) เพื่อทำแผลที่ดอก ทำการเลือกถุงเห็ดนางรมปกติที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของดอกยาวประมาณ 1.5—2 ซม. จำนวน 20 ถุง ใช้สำลีจุ่มวิสาบริสุทธิ์ทาลงบนดอกเห็ดทุกดอกที่โรยผง carborundum แล้วล้าง carborundum ออกด้วยน้ำกลั่น ส่วน control ปลูกเชื้อด้วยน้ำกลั่นแทนวิสาบริสุทธิ์จำนวน 10 ถุงเช่นเดียวกัน เมื่อดอกเห็ดบานเต็มที่ นำมาตรวจสอบเชื้อวิสา

6.3 การฉีดเชื้อวิสาที่ก้านดอกเห็ด ใช้ถุงเห็ดปกติที่มีขนาดของดอกยาวเท่ากับดอกเห็ดในข้อ 6.2 ฉีดเชื้อวิสาที่มีความเข้มข้น 4.25 มก./ มล. ที่ทำให้เจือจาง 10 เท่า ใช้ 0.5 มล./ ถุง จำนวน 20 ถุง ทำการฉีดด้วยเข็มฉีดยา ส่วน control ฉีดน้ำกลั่นเข้าแทนเชื้อวิสา หลังจากดอกบานเต็มที่เก็บมาตรวจสอบเชื้อวิสา

6.4 การถ่ายทอดโดยการผสมเส้นใย (anastomosis) ทำการเขี่ยเส้นใยที่เป็นโรคและไม่เป็นโรควิสาใส่ในวุ้น PDA รวมไว้ในขวดเดียวกัน ตรวจสอบการเจริญเข้าหากันของเส้นใยทั้งสองชนิด แล้วนำมาตรวจสอบเปรียบเทียบ control ซึ่งมีเส้นใยที่เป็นโรคเพียงอย่างเดียว ตรวจสอบปริมาณเชื้อวิสาที่เกิดขึ้นหลังจากทำให้เชื้อวิสาบริสุทธิ์แล้ว



ภาพที่ 2 อนุภาคของเชื้อวิสาที่พบในเห็ดนางรมที่เป็นโรค ขีดดำมีความยาวเท่ากับ 50 nm

วิธีการตรวจสอบเชื้อวิสาจากวิธีการถ่ายทอดทั้ง 4 ดังกล่าว โดยการนำดอกเห็ดและเส้นใยเห็ดในแต่ละวิธีการถ่ายทอดมาทำให้ได้เชื้อวิสาบริสุทธิ์ เช่นเดียวกับวิธีการทำเชื้อบริสุทธิ์ในข้อ 3 แล้วจึงตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และทดสอบด้วยวิธี Ouchterlony's agar double diffusion test

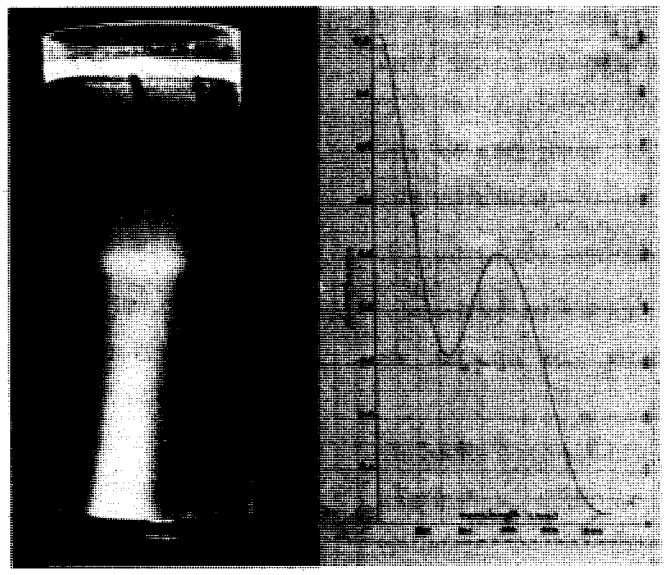
ผลการทดลอง

จากผลการทดลองสามารถรวบรวมได้ดังต่อไปนี้

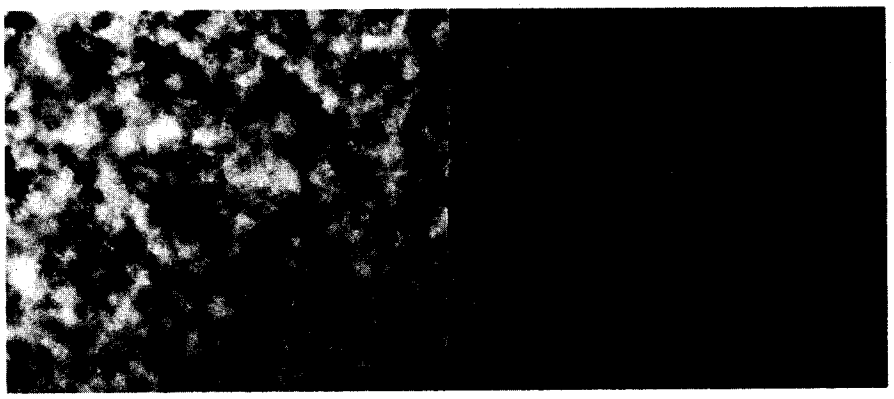
1. การศึกษาลักษณะอาการของโรค จากถุงอาหารผสมขี้เลื่อยจำนวน 20 ถุง ที่มีเชื้อเห็ดที่เป็นโรควิสา เมื่อตรวจดูลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่าพบว่าในถุงอาหารผสมขี้เลื่อยแต่ละถุงมีทั้งดอกที่เป็นโรควิสาและดอกปกติปนกันอยู่ แต่เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ามีเชื้อวิสาขึ้นอยู่กับการเจริญของดอกเห็ด แต่เมื่อดอกเห็ดแสดงอาการเป็นโรค ดอกจะเสื่อมคุณภาพและเสียลักษณะที่ดี ดอกเห็ดมีอาการหงิกงอ ขอบดอกไม่เรียบและแคระแกรน ดังภาพที่ 1.

2. การศึกษาโครงสร้างทางจุลภาคของเชื้อวิสา เมื่อตรวจเชื้อวิสาบริสุทธิ์ที่ได้จากดอกเห็ดนางรมด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคของเชื้อวิสามีลักษณะกลม เส้นผ่าศูนย์กลางยาวประมาณ 25 nm ซึ่งเท่ากับเชื้อวิสาที่พบใน apothecia ของเห็ดที่มีชื่อว่า *Plicaria fulva* (Zeayen, 1967) และเท่ากับขนาดของเชื้อวิสาที่มีชื่อว่า mushroom virus 1 (Kitano *et al.*, 1961) ดังภาพที่ 2.

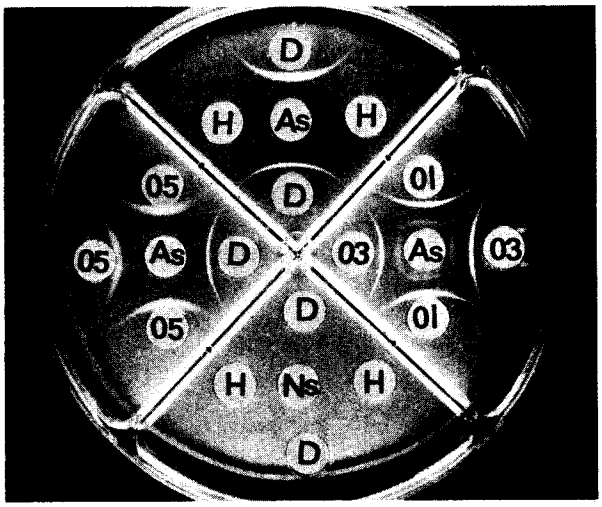
3. การทำเชื้อบริสุทธิ์ หลังจากปั่นด้วยความเร็ว 25,000 รอบ/ นาที นาน 2 ชม. จะได้เชื้อวิสารวมตัวกันอยู่ในชั้นของ



ภาพที่ 3 แถบสีขาวที่เกิดจากเชื้อวิสารวมตัวกันในชั้นของน้ำตาล (ซ้าย) และค่า absorbance จากแสง UV ของเชื้อวิสาเห็ดนางรม (ขวา)



ภาพที่ 4 เปรียบเทียบการตกตะกอนของเซรุ่มที่เป็นโรคกับเชื้อวิสาบริสุทธิ์ (ซ้าย) กับการตกตะกอนของเซรุ่มปกติกับเชื้อวิสาบริสุทธิ์ (ขวา)



ภาพที่ 5 ลักษณะแถบสีขาวที่เกิดจากปฏิกิริยาของเซรุ่ม กับเชื้อวิสาบริสุทธิ์ในวุ้นโดยวิธี Ouchterlony's agar double diffusion test D = น้ำคั้นของเห็ดนางรมเป็นโรค, H = น้ำคั้นของเห็ดนางรมปกติ, As = เซรุ่มของเห็ดนางรมเป็นโรควิสา, Ns = เซรุ่มของเห็ดนางรมปกติ และ 01, 03, 05 = เชื้อวิสาของเห็ดนางรม)

น้ำตาล เกิดเป็นแถบสีขาว ดังภาพที่ 3 เมื่อแยกเชื้อวิสาออกจากน้ำตาลแล้วจะได้เชื้อวิสาบริสุทธิ์ ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคของเชื้อวิสาปริมาณหนาแน่น (ภาพที่ 2) เมื่อวัดด้วย spectophotometer ได้ค่า absorption 260/280 เท่ากับ 1.75 (ภาพที่ 3) ความเข้มข้นที่คำนวณได้จากสูตร $C = \frac{OD\ 260}{E}$ (เมื่อ C คือความเข้มข้นของเชื้อวิสานั้น, OD 260 คือค่า optical density และ E คือค่าคงที่ของวิสาแต่ละตัว) จะได้ความเข้มข้นของเชื้อวิสาประมาณ 9.03 มก./มล. ต่อน้ำหนักดอกเห็ดนางรม 250 กรัม

4. การผลิตเซรุ่ม จากการเจาะเลือดกระต่ายติดต่อกันทุกอาทิตย์ ครั้งละ 20 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และเก็บข้ามคืนในตู้เย็น เมื่อเทเซรุ่มซึ่งแยกตัวออกจากเม็ดเลือดแดง และผ่านการหมุนเหวี่ยงแล้ว จะได้เซรุ่มมาทดสอบคุณภาพ titer ด้วยวิธีการ precipitin test พบว่าเซรุ่มที่เจาะได้ในอาทิตย์ที่ 3 และ 4 หลังจากฉีดเชื้อวิสาบริสุทธิ์เข้าไปในกระต่ายจะมีคุณภาพสูงสุด โดยมี titer สูงถึง 1:1024 ดังภาพที่ 4

5. การตรวจสอบเชื้อวิสาทาง serology ได้รับผลดีทั้งวิธีการ precipitin test และ Ouchterlony's agar double diffusion test วิธีหลังให้ปฏิกิริยาเป็นแถบสีขาวในวุ้น ถึงแม้เซรุ่มจะเจือจางถึง 1:128 แต่แถบสีขาวจะชัดเจนดีขึ้นเมื่อใช้เซรุ่มเจือจางน้อยลง 1:32 (ภาพที่ 5)

6. การถ่ายทอดเชื้อวิสา โดยวิธีการต่าง ๆ ได้แก่ การราดเชื้อวิสาลงในเส้นใยปกติที่เจริญเต็มถุงบนอาหารผสมขี้เลื่อย การปลูกเชื้อโดยการใช้ carborundum การฉีดเชื้อวิสาเข้าที่ก้านดอกเห็ด และการถ่ายทอดโดยการผสมเส้นใย รวม 4 วิธี จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และ Ouchterlony's agar double diffusion test พบว่าดอกเห็ดที่เกิดขึ้นจากถุงเห็ดนางรมมีอนุภาคของเชื้อวิสาที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเป็นแถบสีขาวระหว่างเซรุ่มและเชื้อวิสาทั้ง 4 วิธีการ จึงสรุปได้ว่าเชื้อวิสาสามารถถ่ายทอดได้ด้วยวิธีการดังกล่าวข้างต้น

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถเข้าใจและอาจช่วยแก้ปัญหาการเกิดโรควิสาของเห็ดนางรมซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อวิสาได้มากขึ้น เพราะเมื่อตรวจพบว่าเชื้อเห็ดที่นำมาขยายพันธุ์หรือผสมพันธุ์เป็นโรควิสาก็ควรงดการใช้เชื้อเห็ดนั้นมาทำพันธุ์ นับว่าเป็นการป้องกันโรควิสาได้วิธีหนึ่ง เนื่องจากในปัจจุบันมีการผลิตหัวเชื้อเพื่อจำหน่ายเป็นจำนวนมาก ถ้าหัวเชื้อเห็ดได้รับการตรวจสอบก่อนจำหน่ายจะเป็นผลดียิ่ง โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่คัดเลือกแล้ว อย่างไรก็ตามการเปิดของดอกเห็ดใช้ระยะเวลาสั้น ถึงแม้ภายหลังจะมีการถ่ายทอดโรควิสาขึ้นในธรรมชาติ ความเสียหายที่เกิดขึ้นก็ไม่มากเท่ากับการใช้หัวเชื้อเห็ดที่เป็นโรคไปขยายพันธุ์ การตรวจสอบด้วยวิธี Ouchterlony's agar double diffusion เป็นวิธีการที่ใช้ได้ผลดีในกรณีที่ตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบมีไม่มาก แต่ถ้ามีตัวอย่างเป็นจำนวนมากควรใช้วิธีของ Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) เพราะ ELISA เป็นวิธีการที่สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้อย่างรวดเร็ว แม้ว่าตัวอย่างจะมีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อวิสาเพียงเล็กน้อย

เอกสารอ้างอิง

Gugerli, P. 1979. Potato virus A and potato leaf-roll virus: Purification, antiserum production and serological detection in potato and test plants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Phytopath. Z., 96: 97 - 107.

Hollings, M. 1962. Virus associated with a die-back disease of cultivated mushroom. Nature. 196:962 - 965.

Honda, Y., M. Iwaki, P. Thongmeearkom, N. Deema, and W. Sri-Thongchai. 1982. Blackgram mottle virus occurring of mungbean and soybean in Thailand. JARO. 16(1):72 - 77.

Kitano, T., I. Haruna, and I. Watanabe. 1961. Purification and concentration of viruses by an organic solvent system. Virology. 15:503 p.

Phatak, H.C. 1974. Seed-borne plant viruses : Identification and diagnosis in seed healthy testing. Seed Science Technology. 2:3 - 155.

Seayen, A.D. 1967. Virus-like particles in a weed mould growing on mushroom trays. Nature. 216:595 - 596.

Morphology and Transmission of the Oyster Mushroom Virus

By

Surapee Kiratiya-angkul, Nuakchan Deema, Kittisak Kiratiya-angkul and Voraluck Perntipinyo

Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture, Bangkhen, Bangkok 10900

ABSTRACT

An oyster mushroom viral disease was identified under farming conditions in Nakonpathom Province in Thailand. Symptoms of diseased mushrooms included curling and tearing of the pileus and gill structures. It was also sometimes observed to cause stunting and abnormally high water uptake when mushrooms with symptoms of the disease were immersed in water. Purified preparations of the causal agent (PA) when observed under electron microscope revealed isometric particles about 25 mm in diameter. No such virus-like particles were observed in preparations from healthy mushrooms.

The causal agent for the disease was able to be transmitted by anastomosis and by inoculation. Inoculation of the disease could be achieved by pouring the PA into healthy hyphae in packages of compost fertilizer; by the carborundum-gauze technique to the pileus of healthy mushrooms; and by the injection of PA into healthy stipe.

Antiserum for the virus had a maximum titer of 1:1, 024 based on the micro-precipitin test. The agargel double diffusion test was able to be used for diagnosis of this viral disease of the oyster mushroom.