

การศึกษาเชื้อ DASHEEN MOSAIC VIRUS บนไม้ประดับวงศ์ ARACEAE  
A STUDY OF DASHEEN MOSAIC VIRUS ON ORNAMENTAL  
POT-PLANTS IN THE ARACEAE FAMILY

นายชูศักดิ์ แขพิมาย  
MR. CHUSAK KAEPIMAI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช  
บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ท.ศ. 2540  
ISBN 974-622-006-3  
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การศึกษาเชื้อ DASHEEN MOSAIC VIRUS บนไม้ประดับวงศ์ ARACEAE  
A STUDY OF DASHEEN MOSAIC VIRUS ON ORNAMENTAL  
POT-PLANTS IN THE ARACEAE FAMILY

นายชูศักดิ์ แซ่พิมาย  
MR. CHUSAK KAEPIMAI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช  
บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2540  
ISBN 974-622-006-3  
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

A STUDY OF DASHEEN MOSAIC VIRUS ON ORNAMENTAL  
POT-PLANTS IN THE *ARACEAE* FAMILY

CHUSAK KAEPIMAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN PLANT PEST MANAGEMENT TECHNOLOGY  
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

1997

ISBN 97-622-006-3

**บัณฑิตวิทยาลัย**  
**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**  
**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**

**หัวข้อวิทยานิพนธ์** การศึกษาเชื้อ DASHEEN MOSAIC VIRUS บนไม้ประดับวงศ์ ARACEAE  
A STUDY OF DASHEEN MOSAIC VIRUS ON ORNAMENTAL POT-PLANTS IN THE ARACEAE FAMILY

**ชื่อนักศึกษา** นายชุตติ์ แซพิมาย รหัสประจำตัว 36065209

**หลักสูตร** วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

**ภาควิชา** เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

**อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์** ดร.นवलพรรณ งามยี่สุน

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ดร.นवलพรรณ	งามยี่สุน	น.นवलพรรณ งามยี่สุน
รศ.ดร.สุวรินทร์	บำรุงสุข	จ.สุวรินทร์ บำรุงสุข
รศ.ชวลา	บูรณศิริ	รศ.ชวลา บูรณศิริ

ค่าระดับคะแนนที่เป็นเอกฉันท์จากคณะกรรมการสอบ PASS

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 5 มิถุนายน 2540 เวลา 9.30 น. ถึงเวลา 12.30 น.

สถานที่สอบ ห้องประชุม คณะเทคโนโลยีการเกษตร ชั้น 1 ห้อง 1



วันที่ 4 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2540

**หมายเหตุ** การวัดผลวิทยานิพนธ์ให้ใช้ค่าระดับคะแนนดังนี้

ค่าระดับคะแนน	ผลการศึกษา
O	Outstanding (ดีเยี่ยม)
G	Good (ดี)
P	Pass (ผ่าน)
F	Fail (ตก)

Thesis Title	A Study of Dasheen Mosaic virus on Ornamental Pot-Plants in the <i>Araceae</i> family.
Student	Mr.Chusak kaepimai
Thesis Advisor	Dr.Nualphan Ngamyeesoon
Level of Study	Master of Science in Plant Pest Management Technology
Department	Agriculture Technology Faculty of Agricultural Technology King mongkut's institute of Technology Ladkrabang
Year	1997

### Abstract

A study of dasheen mosaic virus (DMV) on ornamental pot-plants in *Araceae* family, was performed. A survey for virus like symptom on *Araceae* plant was demonstrated in nurseries in and around Bangkok. The plants with symptom were detected for virus particles by Dip Technique and Derrick and Decorate Technique using crude sap and antiserum against DMV under electron microscope. The flexuous rod particles about 750 nm. in length were seen in crude extract and the particles also serologically related to antiserum against DMV.

Host range study was tested in 4 plant families *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae*, and *Solanaceae* by mechanical sap transmission. None of these plants developed symptom after inoculation by infected plant sap. As a result of this, *D.picta* and *Monstera oblique expilata* were selected to do further comparison study for the good source of virus purification. The scheme was demonstrated by using 15% chloroform and carbon tetrachloride (1:1/V:V ) as clarified solvent and 8% polyethylene glycol to concentrate the virus, before these purified virus suspension was spun down at 27,000 rpm for 2 hr., using centrifuge tubes with sucrose solution as 10 % and 20 % supported at the bottom of the tube to avoid and damage of virus particles during ultracentrifugation. The sample from purified virus suspension of *D.picta* gave cleaner virus suspension with 25-40 particles E.M field, where as purified preparation of *Monstera oblique expilata* gained only 10 -25 particles E.M field with

more impurity. Therefore, the sample purified from *D. picta* was used as an antigen to produce antiserum against DMV.

A two-month old, female, White Newzealand rabbit was injected by both intramuscular (I/M) and intrasubcutaneous (I/S) methods. The first bleed was done 10 days after the last injection, followed by at 7 day interval, until the tenth bleeding. The quality of antiserum produced was tested by Slide precipitation test, Ouchterlony double agar diffusion test and Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). The study shown that the ninth bleeding gave the best titre at 1:256, tested by Slide precipitation test with purified virus suspension and at 1:128 tested by Ouchterlony double agar diffusion test. While, ELISA test using infected sap extract from *D. picta*, the best concentration was at 1:1000.

## สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญภาพ.....	IX

### บทที่

1. บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
ขอบเขตและวิธีการศึกษา.....	3
การออกสำรวจโรคและเก็บตัวอย่างของไม้ประดับวงศ์ Araceae.....	3
การศึกษาพืชอาศัย.....	4
การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	5
ขั้นตอนการทำให้เชื้อไวรัสบริสุทธิ์.....	6
คุณสมบัติทางเซรัมวิทยา.....	8
การตรวจสอบคุณภาพของเซรัมวิทยา.....	15
- วิธี Slide precipitation test.....	15
- วิธี Ouchterlony double agar diffusion test.....	15
- การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเซรัมในการดักจับอนุภาคไวรัส ด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) แบบ indirect ELISA.....	15
2. การตรวจเอกสาร.....	17

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	23
ผลการสำรวจโรค.....	23
ผลการปลูกเชื้อบนพืชอาศัยในเรือนทดลอง.....	23
ผลการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในพืชอาศัยวงศ์ Araceae.....	30
ผลการศึกษาเปรียบเทียบการแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ระหว่างพืช <i>D. picta</i> และ พลูดุ ซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อ DMV.....	37
ผลการตรวจสอบคุณภาพของเชรุ่ม DMV.....	40
การตรวจสอบคุณภาพของเชรุ่มวิทยา.....	40
4. สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ.....	61
เอกสารอ้างอิง.....	63
ภาคผนวก.....	68
ประวัติผู้เขียน.....	72

## สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1. แสดงการตรวจสอบอนุภาคของไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	37
2. แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพแอนติซีรัมโดยวิธี Slide precipitation test ด้วย antigen จากสารแขวนลอยไวรัสที่ได้จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จาก <i>D.picta</i> ด้วย antigen จากการแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์.....	42
3. แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพแอนติซีรัมโดยวิธี Slide precipitation test ด้วย antigen จากพืชทดสอบ <i>D.picta</i> .....	43
4. แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพแอนติซีรัมโดยวิธี Slide precipitation test ด้วย antigen จากสารแขวนลอยไวรัสที่ได้จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากพลูณล.....	45
5. แสดงผลการตรวจสอบคุณภาพแอนติซีรัมโดยวิธี Slide precipitation test ด้วย antigen จากพืชอาศัยพลูณล.....	46
6. แสดงผลการตรวจสอบแอนติซีรัมโดยวิธี indirect ELISA ด้วย antigen จากพืชอาศัย <i>D. picta</i> .....	55
7. แสดงผลการตรวจสอบแอนติซีรัมโดยวิธี indirect ELISA ด้วย antigen จากพืชอาศัย พลูณล.....	57

สารบัญภาพ

หน้า

1. แสดงการเลี้ยงสัตว์ทดลองในห้องปรับอากาศ.....	10
2. แสดงอุปกรณ์ในการผลิตเซรัม.....	13
3. แสดงวิธีการจัดกระต่ายเข้า block เพื่อเตรียมการเจาะเลือด.....	14
4. แสดงถึงอาการผิดปกติของไม้ประดับ <i>Dieffenbachia</i> sp. จากแหล่งปลูก.....	24
5. แสดงถึงการเข้าทำลายของไวรัสบนใบอ่อนส่วนยอดของไม้ประดับ <i>D.picta</i> .....	25
6. แสดงถึงการเข้าทำลายของไวรัสบนใบของไม้ประดับ <i>D.picta</i> .....	26
7. แสดงตัวอย่างจากพุ่มที่ถูกไวรัสเข้าทำลาย.....	27
8. แสดงตัวอย่างไม้ประดับ <i>D.oerstedii</i> ถูกไวรัสเข้าทำลาย.....	28
9. แสดงถึงการศึกษาพีชออคัย.....	32
10. แสดงภาพภายในโรงเรือนปรับอากาศที่ใช้ปลูกและดูแลพืชทดสอบ.....	33
11. การศึกษาพืชทดสอบในโรงเรือนปรับอากาศ.....	34
12. แสดงถึงวิธีการเก็บตัวอย่างจากพืชทดสอบเพื่อนำไปแยกเชื้อไวรัสในบริสุทธ์.....	35
13. แสดงถึงอนุภาคของไวรัสเชื้อสาเหตุจากใบพีชออคัย <i>D.picta</i> .....	36
14. แสดงถึงอนุภาคของไวรัสเชื้อสาเหตุจากการแยกเชื้อให้บริสุทธ์.....	38
15. แสดงถึงวิธีการเจาะเลือดสัตว์ทดลองเพื่อการผลิตเซรัม.....	41
16. แสดงถึงปฏิกิริยาจากการตรวจสอบด้วยวิธี Slide precipitation test ระหว่าง antiserum กับ normal serum.....	47
17. แสดงถึงปฏิกิริยาของตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่าง antiserum กับ antigen จากการตรวจสอบด้วยวิธี Slide precipitation test .....	48
18. แสดงถึงผลการตรวจสอบคุณภาพของ antiserum ด้วยวิธี Ouchterlony double agar diffusion.....	51
19. แสดงการตรวจสอบคุณภาพ antiserum ด้วยวิธี indirect ELISA.....	56

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

มนุษย์เรียนรู้และมีการศึกษา เกี่ยวกับโรคของพืชที่มีเชื้อสาเหตุจากไวรัสกว่า 300 ปีมาแล้ว โดยเริ่มให้ความสนใจจากดอกทิวลิปต่างเป็นครั้งแรก เนื่องจากมีสีสรรสวยงาม แต่คนในยุคนั้นเริ่มแปลกใจเมื่ออาการต่าง ที่เป็นลวดลาย สวยงามเริ่มมีการเปลี่ยนแปลง ไม่ตรงสายพันธุ์และยังมีการเปลี่ยนแปลงของสีสรรและลวดลายของดอกอยู่ตลอดเวลา จนกระทั่งมีการค้นคว้าอย่างจริงจังเมื่อ 100 ปี ที่ผ่านมา โดยการศึกษาโรคใบด่างของยาสูบเป็นโรคแรก และต่อมามีผู้ศึกษาเชื้อสาเหตุของโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสมากขึ้นตามลำดับ

นับวันประเทศไทยจะยิ่งมีการพัฒนามากขึ้น ทั้งด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม แต่พื้นที่ส่วนใหญ่ของประเทศ เหมาะต่อการทำอาชีพด้านการเกษตร และประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพด้านการเกษตร ฉะนั้นไม้ประดับจึงนับวันจะยิ่งมีผู้นิยมปลูกมากขึ้น เพื่อเป็นการพักผ่อนหย่อนใจ และธุรกิจการค้า มีรายงานว่ ไม้ประดับสกุล *Dieffenbachia picta* เป็นไม้ที่มีผู้นิยมใช้ในการประดับตามอาคารและตกแต่งสถานที่สูงสุด (วิทย์, 2536) ทั้งแบบปลูกใส่กระถาง (pot-plant) และเป็นไม้ตัดใบ (foliage plant) แต่ส่วนใหญ่ผู้ผลิตจะทำเพื่อเป็นอาชีพเสริม จึงไม่ค่อยมีผู้ศึกษาข้อมูลในด้านการพัฒนาอย่างจริงจัง เพียงแต่เรียนรู้จากบรรพบุรุษและปฏิบัติสืบต่อกันมา เมื่อทำต่อเนื่องกันเป็นเวลานานย่อมจะประสบปัญหาด้านโรคและแมลง หรือเมื่อสภาพแวดล้อมที่แปรปรวนย่อมสร้างความเสียหาย ซึ่งถือว่าเป็นโอกาสที่น่าเสียดาย

จากรายงานทราบว่า ไม้ประดับวงศ์ *Araceae* นอกจาก *Dieffenbachia picta* ที่มีผู้นิยมสูงสุดแล้วยังมี *Tropic Snow*, *Candida*, *Marianne* และ *Philodendron* กำลังได้รับความสนใจมากขึ้นตามลำดับ เนื่องจากมีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถอยู่ในร่มหรือห้องปรับอากาศ ได้ทนกว่าพันธุ์อื่นๆ เพราะมีใบที่หนามาก (วิทย์, 2536)

สำหรับพืชในวงศ์ *Araceae* ที่ปลูกเพื่อการค้าในประเทศไทย ได้แก่ *Alocasia*, *Caladium*, *Colocasia*, *Candina*, *Dieffenbachia amoena* 'Hybrid', *D.amoena* *Dumbacane*, *D.amoena* *Campesta*, *D. oerstedii*, *D.maculata* 'Rocher' *D.maculata* *Perfection*, *D.Exotica* *Arvida*, *D. Keywest*, *Jenmannii* *D. rex*, *D.memoria*, 'Corsii', *D.imperialis*, *D.founieri*, *D.res* 'Variegata' *D. delecta*, (สารานุกรมไม้ดอกไม้ประดับในประเทศไทย, 2525) *Cryptocoryne*, *Aglaonema*, *Aricaema*, *Philodendron*, *Xanthosoma*, *Zantedeschia*. (Hartman Zettler, 1972. Tooyama, 1975 a)

มีรายงานว่าไม้ประดับสกุล *D. picta* เป็นพันธุ์ไม้ป่าพื้นเมืองของประเทศเวเนซุเอลา คอสตาริกา บราซิล และบริเวณแถบลุ่มแม่น้ำอเมซอน (สารานุกรม ไม้ประดับในประเทศไทย, 2525) ไม้ชนิดนี้จะชอบอากาศอบอุ่นความชื้นในอากาศสูงสามารถปรับตัวให้อยู่ในที่ที่มีความชื้นอากาศปานกลางแสงแดดรำไร วัสดุปลูกควรระบายน้ำได้ดี (วิทย์, 2536) และยังมีรายงานต่ออีกว่า *D. picta* มีแนวโน้มที่จะเป็นไม้ประดับเพื่อการส่งออก ที่สดใสในอนาคต โดยเฉพาะเมื่อมีการกำหนดมาตรฐานในด้านการปลอดโรคไวรัส ซึ่งเป็นปัญหาอย่างหนึ่งของพืชสกุลนี้ เพราะการขยายพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ คือการแตกหน่อ และใช้ส่วนของต้นปักชำ (ณรงค์, 2525) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมปฏิบัติกับพืชในสกุลนี้

ดังนั้นการศึกษาเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุที่สำคัญที่สุดในไม้ประดับวงศ์ *Araceae* และการตรวจสอบเชื้อ จึงถือว่ามีผลสำคัญและเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง โดยประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิคการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา (serology) เป็นวิธีการตรวจสอบไวรัสเชื้อสาเหตุโรคที่ได้ผล สะดวกรวดเร็ว เช่นวิธีการตกตะกอนในของเหลวบนแผ่นสไลด์ (Slide precipitation test) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาระหว่างเซรุ่ม ที่มีคุณสมบัติจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติบอดี (antibody) กับแอนติเจน (antigen) เป็นการตกตะกอนผ่านตัวกลางกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Ouchterlony double agar diffusion) (Chegdi and Girasimosa, 1979) เพื่อผลในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อรวมทั้งการผลิตท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรค เพื่อการขยายพันธุ์ในเชิงการค้าสำหรับตลาดทั้งในและต่างประเทศ

วิธีอิมมูโนอิเล็กตรอนไมโครสโคป (Immunolectron microscope, IEM) เป็นการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาที่มีประสิทธิภาพสูง ในการดักจับอนุภาคของไวรัสเชื้อสาเหตุโรคพืชร่วมกับเทคนิคการใช้กล้องจุลทรรศน์ (Derrick, 1972)

และวิธีสุดท้ายการตรวจสอบโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) เป็นวิธีการที่ตรวจหาอนุภาคไวรัสที่มีประสิทธิภาพสูง แม้ในพืชทดสอบจะมีอนุภาคไวรัสเพียง

เล็กน้อยก็สามารถตรวจพบ จึงถือว่าเป็นวิธีการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในปัจจุบัน เพื่อเป็นประโยชน์ในการควบคุม การแพร่ระบาดของเชื้อ รวมทั้งการผลิตท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรคเพื่อการขยายพันธุ์ในเชิงการค้า สำหรับตลาดทั้งในและต่างประเทศ

### วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. เพื่อศึกษาเชื้อไวรัส Dasheen mosaic virus (DMV) ในไม้ประดับวงศ์ Araceae
2. เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัส เพื่อประโยชน์ในการจัดจำแนกชนิดของไวรัสเชื้อสาเหตุโรค
3. เพื่อผลิตเซรัมของเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) เพื่อใช้ในการตรวจสอบอนุภาคของไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพ

### ขอบเขตและวิธีการศึกษา

1. การสำรวจโรคของไม้ประดับวงศ์ Araceae ที่แสดงอาการของไวรัสและอาการคล้ายโรคจากไวรัส ในเขตกรุงเทพฯ และ ปริมณฑล ดังต่อไปนี้
 

อ. บางขุนนนท์	กรุงเทพฯ
อ. ดลิ่งชัน	กรุงเทพฯ
ตลาดนัดไม้ดอกไม้ประดับ สวนจตุจักร	อ. จตุจักร กรุงเทพฯ
อ. บางกรวย	ในเขต จ. นนทบุรี
อ. บางใหญ่	ในเขต จ. นนทบุรี

### วิธีการทดลอง

โดยวิธีการเก็บส่วนของใบพืชที่แสดงอาการผิดปกติ ซึ่งคล้ายคลึงกับอาการของไวรัส โดยเลือกส่วนที่แสดงอาการชัดเจนที่สุด ประมาณใบที่ 2 และ 3 จากส่วนยอด ทุกครั้งผู้ปฏิบัติจะต้องสวมถุงมือที่ใหม่และสะอาดหรือถ้ามือเปล่าจำเป็นต้องล้างมือให้สะอาดด้วยสบู่และเช็ดให้แห้งก่อนเสมอ ใบมีดที่ใช้ต้องใหม่และสะอาดจุ่มในแอลกอฮอล์ 70% ตัดส่วนของตัวอย่างให้สมบูรณ์และบอบช้ำน้อยที่สุด เนื่องจากการวินิจฉัยโรคเบื้องต้นในสภาพแปลงธรรมชาติต้อง

สังเกตจากอาการผิดปกติภายนอกเมื่อเทียบกับพืชปกติสิ่งที่ควรคำนึง (ก่อนการออกสำรวจโรค และเก็บตัวอย่าง พืชที่เป็นโรคต้องมีการศึกษาถึงลักษณะอาการของโรคให้ชัดเจน แหล่งปลูกที่แน่นอน ศึกษาแมลงพาหะบนพืชอาศัย และช่วงเวลาของการระบาดที่รุนแรง เพื่อการวินิจฉัยที่ถูกต้องในภาคสนาม ก่อนการนำเข้าสู่ศึกษาในห้องปฏิบัติการต่อไป) เก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก แยกกันตัวอย่างละ 1 ถุงเพื่อป้องกันการปนเปื้อน ซึ่งกันและกันมัดปากถุงบันทึกแหล่งเก็บ วัน เดือน ปี ให้ชัดเจน ใส่ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งเพื่อรักษาตัวอย่างให้คงสภาพสดอยู่เสมอ สุ่มสำรวจเช่นนี้ ประมาณแหล่งละ 5-10 ตัวอย่างต่อพื้นที่แล้วรีบนำไปเข้าตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

เมื่อได้ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคจึงเพิ่มปริมาณโดยการตัดชำ เพื่อศึกษาอาการในโรงเรือน โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 จะเลี้ยงในโรงเรือนกันแมลงที่อุณหภูมิปกติ กลุ่มที่ 2 เลี้ยงในโรงเรือนปรับอุณหภูมิที่ 26-28°C จากนั้นคอยสังเกตอาการ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของพืชทดสอบและอาการของโรคที่ปรากฏบนพืชทดสอบ ในช่วงของการดูแลจะใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ในระยะเวลา 10 วันต่อครั้ง กับพืชทดสอบทั้ง 2 กลุ่มและคอยฉีดยาฆ่าแมลงทุกอาทิตย์หรือเมื่อพบแมลงระบาด

## 2. การศึกษาพืชอาศัย โดยใช้พืชทดสอบ 4 วงศ์ คือ

Family Chenopodiaceae ได้แก่

*Chenopodium quinoa*

*C. amaranticolor*

Family Leguminosae ได้แก่

*Arachis hypogaea*

*Glycine max*

*Phaseolus aureus*

*Phaseolus vulgaris*

*Pisum sativum*

*Vicia faba*

*Vigna sesquipedalis*

*V. sinensis*

ถั่วลิสง

ถั่วเหลือง

ถั่วเขียว

ถั่วแขก

ถั่วลันเตา

ถั่วปากอ้า

ถั่วฝักยาว

ถั่วพุ่ม

Family Cucurbitaceae ได้แก่	
<i>Cucumis sativus</i>	แตงกวา
<i>Cucurbita pepo</i>	ฟักทอง
<i>Cucumis melo</i>	แตงไทย
Family Solanaceae ได้แก่	
<i>Nicotiana tabacum</i> “White Burley”	ยาสูบใบใหญ่
<i>N. tabacum</i> “Xanthi”	ยาสูบใบใหญ่
<i>N. glutinosa</i>	ยาสูบใบเล็ก
<i>Petunia hybrida</i> Vilm	พิกุเนีย

การถ่ายทอดเชื้อโดยวิธีกล mechanical transmission ใช้น้ำคั้นจากพืชที่เป็นโรคบดให้ละเอียดในสารละลาย phosphate buffer 0.1 M pH 7.0 อัตราส่วน 1:4 ผสมผง celite ในน้ำคั้นเพื่อทำให้พืชทดสอบเกิดแผลในอัตรา 2% ต่อปริมาตร นำน้ำคั้นทาลงบนใบพืชทดสอบล้างด้วยน้ำสะอาดอย่างรวดเร็วเพื่อกำจัดเศษพืชบนใบที่ทำการปลูกเชื้อแล้วจึงนำกระดาษหนังสือพิมพ์ชุมน้ำคลุมต้นพืชเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมงย้ายพืชทดสอบที่ทำการปลูกเชื้อนี้เข้าในโรงเรือนกันแมลง หลังจากนั้นคอยสังเกตจากอาการภายนอกของพืชอาศัย โดยการตรวจสอบเป็นระยะๆ หลังปลูกเชื้อ 10 วัน และสังเกตการเจริญเติบโตของพืช และความรุนแรงของเชื้อสาเหตุ

### 3. การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในพืชอาศัยวงศ์ Araceae

3.1 การตรวจสอบจากตัวอย่างของพืชที่เป็นโรค โดยใช้ น้ำคั้นด้วยวิธี leaf dip technique (Brandes, 1975) บดตัวอย่างในสารละลาย phosphate buffer 0.1M (KPB) pH 7.0 ที่แช่เย็น ในอัตราส่วนใบพืช 1:10 (น้ำหนัก:ปริมาตร) ก่อนนำไปเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเศษพืชออก แล้วหยดน้ำคั้นลงบน parafilm นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh ที่เคลือบด้วย membrane (Formvar ความเข้มข้น 2% ทำลายประจุบนผิวหน้ากริด) คว่ำลงบนน้ำคั้นประมาณ 15 นาที ใส่ในกล่องความชื้น (moist chamber) ที่อุณหภูมิห้องหลังจากนั้นล้างกริดด้วย 0.1M (KPB) pH 7.0 ประมาณ 2 cc ซับด้วยกระดาษกรองให้แห้ง ย้อมสี PTA (phosphotungstic acid) ประมาณ 0.75 cc (8หยด) ซับให้แห้ง

อีกครั้งก่อนนำไปดูด้วยกล้อง electron microscope(EM) เพื่อตรวจหาอนุภาคของไวรัสและศึกษาชนิดของเชื้อสาเหตุโรค

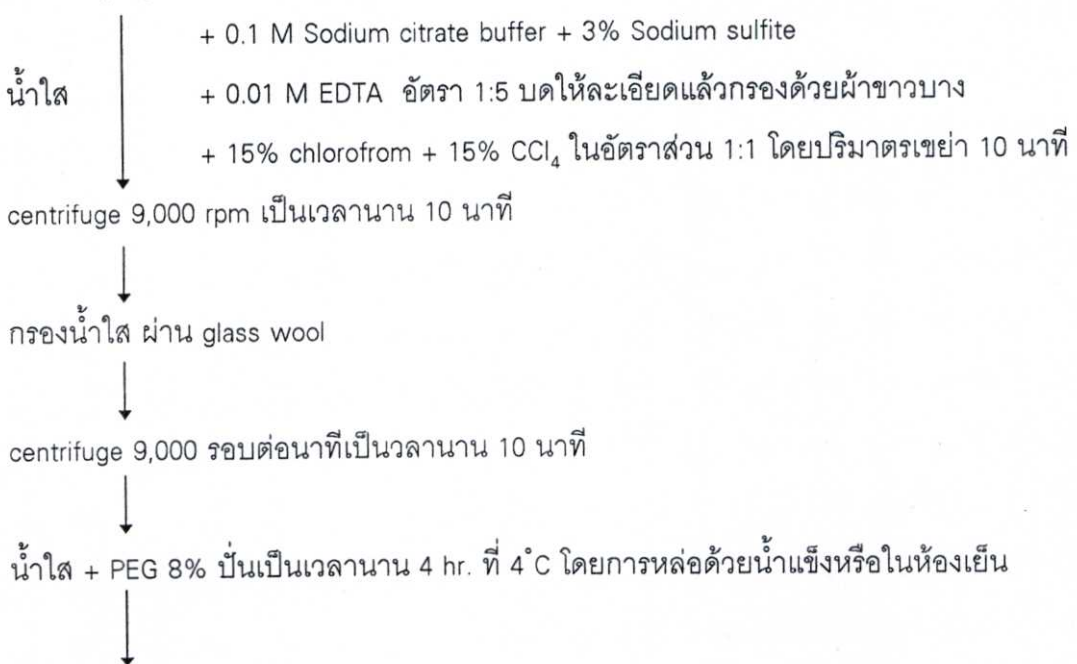
3.2 การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติของสารแขวนลอยไวรัส และปริมาณอนุภาคไวรัสที่ได้จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ วิธีการเตรียม grid จาก purified virus suspension นำกริดที่ได้ทำการเคลือบ Formvar 2% และคาร์บอน แล้วนำไปทำลายประจุบนผิวหน้ากริด (iondischarged) ด้วยเครื่องก่อนนำไปเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีลอยกริดบนสารแขวนลอยไวรัสที่บริสุทธิ์ โดยใช้ด้านมันของกริดสัมผัสกับตัวอย่างเป็นเวลานาน 15 นาทีเก็บไว้ในกล่องความชื้น จากนั้นจึงล้างออกด้วยน้ำกลั่นแล้วซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองย้อมสีด้วยยูเรเนียมอะซิเตต (uranyl acetate-UA) 2% ละลายในน้ำกลั่นจะได้ pH ประมาณ 5.6 (ปราณี, 2530) โดยวิธีหยดผ่านประมาณ 1 cc (10 หยด) ซับให้แห้งด้วยกระดาษกรองอีกครั้งก่อนนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพื่อหาอนุภาคของไวรัสและศึกษาถึงชนิดของเชื้อสาเหตุโรคพืช

#### 4. ขั้นตอนการทำให้เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ (purification) เพื่อเปรียบเทียบชนิดของพืชอาศัยระหว่าง *D. picta* และ พลุฉลุ

เก็บส่วนใบของพืชทดสอบที่แสดงอาการของโรคชัดเจน จากต้นที่ทำการเพิ่มปริมาณโดยวิธีปักชำในโรงเรือนปรับอุณหภูมิใส่ถุงพลาสติก นำเข้าห้องปฏิบัติการหั่นเป็นชิ้นประมาณชิ้นละ 1 นิ้ว จำนวน 500 กรัม ลงบันทึกให้ชัดเจน แล้วแช่แข็งที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  เพื่อให้ตัวอย่างกรอบเป็นเวลานาน 15 ชั่วโมง จากนั้นปั่นโดยใช้เครื่องผสมอาหารให้ละเอียดในสารละลายเคมี (phosphate buffer) ซึ่งมีส่วนประกอบของ 0.1M sodium citrate และ 3% sodium sulfite และ 0.01M EDTA pH 7.0 ในอัตราส่วน 1:5 (น้ำหนัก : ปริมาตร) จากนั้นกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 ชั้น (ควรใช้ผ้าที่ใหม่เสมอ) เพื่อแยกส่วนของพืชที่ไม่ต้องการทิ้ง วัดปริมาตรสุทธิของน้ำคั้นบันทึกไว้ นำ chloroform และ carbon tetrachloride อัตราส่วน 1:1 โดยผสมรวมกันแล้วจึงเติมลงในน้ำคั้นที่กรองได้ในปริมาณ 15% ของปริมาตรน้ำคั้น จากนั้นนำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาที จึงนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง centrifuge ที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที กรองน้ำใสผ่านใยแก้ว (glass wool) เก็บน้ำใสทิ้งตะกอน วัดปริมาตรแล้วเติม polyethylene glycol (PEG) 8% ของปริมาตรทั้งหมดจากนั้นจึงปั่นด้วย magnetic stirrer เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตลอดเวลาที่ปั่นภาชนะจะต้องหล่อด้วยน้ำแข็งเสมอ เมื่อครบกำหนดจึงนำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) อีกครั้งที่ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที (PEG มีคุณสมบัติทำให้

อนุภาคของไวรัสตกตะกอน) จากนั้นทิ้งน้ำใส่เก็บตะกอน ละลายตะกอน ใน 0.02 M tris-HCl pH 7.0 ที่มีส่วนผสม 0.1% 2-mercapto ethanol และ 0.01M EDTA บั่นด้วย magnetic stirrer เพื่อการละลายตะกอนข้ามคืน ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง centrifuge ที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที ทิ้งตะกอนเก็บน้ำใส่ วัดปริมาตร เตรียมสารละลายน้ำตาลความเข้มข้น 10% และ 20% ใน tris-HCl pH 7.0 ที่มีส่วนผสมของ 0.1% 2-mercapto ethanol และ 0.01M EDTA ใส่หลอด (centrifuge tube) 5 cc ต่อหลอด (เป็นการรองกันหลอดเพื่อรองรับอนุภาคของไวรัสไม่ให้แตกหัก และยังช่วยทำให้อนุภาคของไวรัสสะอาด) โดยให้ส่วนของสารละลายเชื้อไวรัสอยู่ข้างบนของสารละลายน้ำตาลภายในหลอดอัตรา 3 ใน 4 ส่วนของหลอด ใน 1 หลอดจะบรรจุได้ 25 cc นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง (ultra centrifuge) อีกครั้งที่ 27,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตะกอนทิ้งน้ำใส่ ละลายตะกอนใน 0.02M Tris-HCl buffer ที่มี 0.1% 2-mercapto ethanol เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที เก็บน้ำใส่ใส่หลอด (ependrof) 1cc ต่อหลอดเพราะส่วนนี้คือสารแขวนลอยของไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์สำหรับเป็น antigen เพื่อการผลิตเซรุ่ม ทุกขั้นตอนของการแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์จะต้องรักษาอุณหภูมิที่ 4 °C โดยการล่อน้ำแข็งไว้เสมอ จากนั้นไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope - EM) ที่กำลังขยาย 27,000 เท่า

**ขั้นตอนการแยกเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ให้บริสุทธิ์จากพืชทดสอบ *D. picta* และ พลุฉลุ (ตัวอย่างละ 500 กรัม)**



centrifuge 9,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

↓  
ละลายตะกอนใน 0.02M Tris-HCl pH 7.2 + 0.1 % 2 mercapto ethanol + 0.01 M EDTA

↓  
Over night magnetic stirrer ที่ 4°C (ละลายตะกอนทิ้งไว้ 1 คืน)

↓  
centrifuge 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

↓  
นำน้ำใสปั่น (centrifuge) ที่ 27,000 rpm เป็นเวลา 2 hr. (รองกันหลอดด้วยสารละลายน้ำตาล 10% และ 20% ใน tris-HCl pH 7.2 + 0.1% 2 mercapto ethanol + 0.01M EDTA)

↓  
ละลายตะกอนใน 0.02 M tris-HCl buffer+0.1% 2 mercapto ethanol

↓  
centrifuge 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

↓  
สารแขวนลอยอนุภาคไวรัส

↓  
ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

## 5. คุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา

### 5.1 การผลิตแอนติบอดี (antibody-Ab)

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ กระจ่าง เพราะสะดวก และมีความเหมาะสม ต่องานวิจัย สัตว์จะต้องมีร่างกายที่แข็งแรง ตรงตามสายพันธุ์ ใช้กระจ่างพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ (New Zealand White) ลักษณะสีขาวตาแดง เพศเมียอายุ 2 เดือน เลี้ยงในห้องปรับอากาศที่มี 26-28°C (ภาพที่ 1) เพื่อให้สัตว์ทดลองเกิดความเครียดน้อยที่สุด การกินอาหารจะสม่ำเสมอ และมีการให้อาหารเสริมคือ หัวแครอท นอกจากอาหารเม็ดสำเร็จรูปซึ่งเป็นอาหารหลัก ก่อนผลิตเซรุ่มผู้ทำการวิจัยได้เจาะ normal serum (Ns) ก่อนเพื่อใช้เป็น control หลังการผลิต serum และเพื่อใช้เป็นตัว

control นอกจากการใช้พีชปกติ ขณะทำการตรวจสอบคุณสมบัติของเซรุ่ม (การหาค่า titer ของ serum)

5.1.1 การเจาะ normal serum (Ns) จากสัตว์ทดลองซึ่งยังไม่เคยใช้ในงานทดลองมาก่อน โดยใช้ใบมีดโกนกรีดตามความยาวของเส้นเลือดให้ได้เลือดประมาณ 1cc ใส่ในหลอดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตั้งทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องปกติ 1 ชม. จากนั้นใช้ loop เเผาไฟทิ้งให้เย็น แซะให้ก้อนเลือดล่อนจากหลอด เพื่อให้ plasma (น้ำเหลือง) ออกจากเม็ดเลือดให้มากที่สุดจากนั้นนำเข้าสู่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งไว้ข้ามคืนจากนั้นเทเอาเฉพาะ plasma (น้ำเหลือง) ส่วนเม็ดเลือดที่รวมตัวเป็นก้อนทิ้งโดยใส่ถุงพลาสติกและทำลายด้วยการเผาไฟจากนั้นนำเข้าสู่เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อแยก plasma (น้ำเหลือง) จากเศษของเม็ดเลือดเพื่อให้ Ns บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นใส่หลอด (ependrof) 1 cc ต่อหลอดเติมโซเดียมไฮไดรไรด์ (Sodium azide-NaN<sub>3</sub>) ปริมาณ 0.01% ต่อหลอด ซึ่งมีคุณสมบัติในการป้องกันแบคทีเรียลงไปปนเปื้อนใน normal serum ซึ่งจะทำให้เสียคุณสมบัติไป แล้วเก็บใน Freezer ที่ -20 °C

5.1.2 วิธีการฉีด antigen เข้าสู่สัตว์ทดลองเพื่อผลิตเซรุ่ม อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตเซรุ่ม(ภาพที่ 2)

5.1.2.1 Intramuscular (I/M) คือ การฉีด antigen เข้ากล้ามเนื้อครั้งที่ 1 โดยใช้แอนติเจน 1 cc ต่อ Complete Freund's adjuvant 1 cc รวมกันใน flask ขนาด 5 ml โดยใช้ syringe ขนาด 5 cc ดูดเข้าออก (เพื่อทำการผสมสาร 2 ตัวเข้าด้วยกัน) จนสารประกอบน้ำมัน Complete freund's adjuvant ผสมกับ antigen มีลักษณะคล้ายแป้งเปียก ทดสอบโดยหยดลงน้ำ ถ้าไม่แตกตัวถือว่าเพียงพอพร้อมที่จะฉีดได้ แต่ถ้าหยดลงน้ำแล้ว antigen แตกตัวถือว่ายังใช้ไม่ได้ถ้าฉีดเข้าไปในสัตว์ทดลอง อาจจะไม่มีการสร้าง antibody

5.1.2.2 Intramuscular (I/M) การฉีดครั้งที่ 2 เข้ากล้ามเนื้อบริเวณ สะโพกด้านขวาอัตราส่วนผสม antigen 1 cc ต่อ Incomplete freund's adjuvant 1 cc คุณสมบัติ Complete freund's adjuvant หลังการฉีดเข้าสู่สัตว์ทดลอง จะเป็นตัวเร่งให้ร่างกายสร้าง antibody เพื่อขับสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายโดยวิธีธรรมชาติ เช่น ปัสสาวะ อุจจาระและเหงื่อ คุณสมบัติของ incomplete freund's adjuvant เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะช่วยส่งเสริม complete freund 's adjuvant คือเป็นตัวกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง antibody เพิ่มขึ้นเพื่อที่จะขับสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายได้ช้าลง ฉะนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องสร้าง antibody ในเลือดให้เพิ่มมากขึ้น

ภาพที่ 1



แสดงวิธีการเลี้ยงสัตว์ทดลองในห้องปรับอุณหภูมิ

5.1.2.3 Intrascutaneous (I/S) การฉีดครั้งที่ 3 ส่วนผสม antigen 1 cc ต่อ Incomplete freund's 1 cc วิธีการฉีดเข้าใต้ผิวหนังใน 1 เข็ม จะฉีด 3 จุด ด้านหลัง บริเวณช่วงไหล่ การฉีด Ag แต่ละครั้งจะห่างกัน 7 วัน และ ครั้งที่ 4 ฉีดแบบ I/S เหมือนครั้งที่ 3 แต่เปลี่ยนจุดเป็นบริเวณช่วงคอด้านหลัง 3 จุดเหมือนเดิม หลังฉีดครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 10 วัน จึงเริ่มเจาะเลือด ครั้งที่ 1

5.1.3 วิธีการเจาะเลือด จะงดการให้น้ำและอาหารในช่วงเช้าจนถึงเวลา 15.00 น. จับสัตว์ทดลองเข้า block เพื่อเตรียมการเจาะเลือด (ภาพที่ 3) วิธีการเจาะเลือด ที่ไปหูโดยใช้ ไบมัดโกน โคนขนที่บริเวณหูตรงส่วนที่จะทำการเจาะเลือด แล้วทำความสะอาดด้วย แอลกอฮอล์ 70% แล้วใช้นิ้วมือคีบที่บริเวณใบหูกระต่ายด้านหลังเบาๆ เพื่อให้เส้นเลือดโป่ง จากนั้นจึงกรีดไบมัดโกนลงบนเส้นเลือดตามความยาว ซึ่งอยู่ด้านล่างของใบหูให้หลุดแก้วที่ ผ่านการฆ่าเชื้อและปิดปากหลอดด้วยอลูมิเนียมฟลอร์ยเก็บเลือดครั้งละ ประมาณ 20 cc เมื่อ เพียงพอปิดบาดแผลด้วย Vaseline ทำความสะอาดบาดแผลด้วย แอลกอฮอล์ 70% อีกครั้ง ทั้ง ให้เลือดในหลอดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องปกติ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นใช้ Loop เมาไฟเพื่อฆ่า เชื้อ ทั้งไว้ให้เย็นและกั้นเลือดที่เกาะข้างหลอดให้หลุดออก เพื่อให้ plasma (น้ำเหลือง) ออก จากเม็ดเลือดแล้วนำเข้าสู่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงเทเอาเฉพาะ plasma เพราะส่วนนี้คือ antibody นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยกตะกอนของเม็ด เลือดทิ้ง ที่ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จึงจะได้เซรุ่มที่บริสุทธิ์ จากนั้นจึงนำไปตรวจสอบคุณภาพเซรุ่ม โดยการเช็คค่า titer

5.1.4 วิธีการเก็บเซรุ่มแบ่งเซรุ่มใส่หลอด (ependrof) 1 cc ต่อหลอด หยด โซเดียมเอไซด์ (sodium azide -  $\text{NaN}_3$ ) ปริมาณ 0.01% เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย เก็บในตู้แช่แข็งที่ -20°C รอการตรวจสอบความเข้มข้นของเซรุ่มโดยการเช็คค่า titer

### ตารางและวิธีการผลิตเซรุ่ม DMV จากพืชอาศัย *D. picta*

เจาะ normal serum จากสัตว์ทดลองที่ยังไม่เคยใช้ในงานทดลองมาก่อนวิธีการฉีด antigen DMV ในสัตว์ทดลอง

ครั้งที่ 1 วิธี Intramuscular (I/M) antigen(Ag) + Complete freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณสะโพกข้างขวา

ครั้งที่ 2 วิธี Intramuscular (I/M) Ag + Incomplete freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณสะโพกข้างซ้าย

ครั้งที่ 3 วิธี Intrascutaneous (I/S) Ag + Incomplete freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนังช่วงไหล่ 3 จุด ในครั้งเดียวกัน

ครั้งที่ 4 วิธี Intrascutaneous (I/S) Ag + Incomplete freund's adjuvant อัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณต้นคอ 3 จุด ในครั้งเดียวกัน

เจาะเลือด ครั้งที่ 1 (As<sub>1</sub>) จำนวน 20 cc

เจาะเลือด ครั้งที่ 2 (As<sub>2</sub>) จำนวน 20 cc

เจาะเลือด ครั้งที่ 3 (As<sub>3</sub>) จำนวน 20 cc

Booster ครั้งที่ 1 โดยวิธี (I/S) Ag + Incomplete freund's adjuvant ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง บริเวณด้านหลัง

เจาะเลือด ครั้งที่ 4 (As<sub>4</sub>) จำนวน 20 cc

เจาะเลือด ครั้งที่ 5 (As<sub>5</sub>) จำนวน 20 cc

เจาะเลือด ครั้งที่ 6 (As<sub>6</sub>) จำนวน 20 cc

เจาะเลือด ครั้งที่ 7 (As<sub>7</sub>) จำนวน 20 cc

เจาะเลือด ครั้งที่ 8 (As<sub>8</sub>) จำนวน 20 cc

Booster ครั้งที่ 2 โดยวิธี (I/S) Ag + Incomplete freund's adjuvant ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

บริเวณด้านหลัง

เจาะเลือด ครั้งที่ 9 (As<sub>9</sub>) จำนวน 20 cc

เจาะเลือด ครั้งที่ 10 (As<sub>10</sub>) จำนวน 20 cc

## ภาพที่ 2



แสดงถึงอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตเซรุ่ม

1. Freund's adjuvant (Complete และ Incomplete)
2. Syringe
3. Beaker ขนาด 10 ml.
4. เข็มฉีดยา เบอร์ 19-21
5. แอลกอฮอล์ 70 %
6. ไบมีดีโกน
7. สำลี

ภาพที่ 3



แสดงวิธีการจัดกระด้ายเข้า block เพื่อเตรียมการเจาะเลือด

## 5.2 การตรวจสอบคุณภาพของเซรัมวิทยา

5.2.1 วิธี Slide precipitation test คือการทำปฏิกิริยากันระหว่าง antibody กับ antigen โดยการหยดลงบนแผ่นสไลด์แล้วสังเกตตะกอนที่เกิดขึ้น ภายหลังที่เก็บไว้ในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยการนำ antibody ที่ต้องการตรวจสอบมาเจือจางด้วยสารละลาย PBS (phosphate buffer saline) pH 7.0 ตามลำดับ ส่วน antigen ที่ใช้ได้จากสารแขวนลอยไวรัสที่ผ่านการแยกให้บริสุทธิ์ และจากพีชอคัยที่ทำการเจือจางที่ 1:4 (พีชอคัย:สารละลาย) ด้วยสารละลาย PBS ก่อนเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลานาน 10 นาที แล้วจึงดูดน้ำใสที่ได้ไปทดสอบปฏิกิริยา

5.2.2 วิธี Ouchterlony double agar diffusion test คือ การซึมผ่านของ antigen และ antibody ผ่านตัวกลางกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยการหลอมวุ้น (Noble agar) ด้วยความร้อนประมาณ 90 °C พอละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วผสมสาร SDS (sodium dodecyl sulfate) ในปริมาณ 0.5% เพื่อให้อนุภาคของไวรัสแตกหัก ง่ายต่อการซึมผ่าน เทวุ้น plate ละ 10 cc (plate พลาสติกใช้งานโดยเฉพาะ) ทิ้งให้เย็นในอุณหภูมิห้องเก็บเข้ากล่องความชื้น 12 ชั่วโมง จากนั้นเจาะวุ้นด้วย Corkborer ตามแผนผัง (pattern) ที่เตรียมไว้ นำ antigen ที่เจือจางด้วย PBS (phosphate buffer saline) ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.0 อัตราส่วน 1:4 (antigen:buffer) กับ antiserum ที่เจือจางด้วย PBS ตั้งแต่ 1:2, 1:4, ... 1:512 ตามลำดับของความเข้มข้น หยดลงหลุมวุ้น จากนั้นจึงนำ antigen จากการเจือจางด้วยสารละลายมาหยดลงหลุมวุ้นด้านตรงข้าม เพื่อให้เกิดการซึมผ่านทั้งไว้ข้ามคืนในกล่องความชื้น เมื่อ antigen กับ antibody มาทำปฏิกิริยากันจะเกิดเป็นเส้นขาวขุ่น (band) เห็นได้ชัดเจนด้วยตาเปล่าที่เข้มข้นต่างๆ ตามลำดับ จนถึงความเข้มข้นต่ำสุด ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาเป็นเส้นขาวขุ่น (band) ปรากฏพอสังเกตได้จะอ่านค่า titer ที่ dilution นั้น

การเซต titer ทุกครั้ง ควรทำอย่างน้อย 2 วิธีการ เพื่อจะได้นำผลการตรวจสอบทั้ง 2 วิธีการมายืนยันเพื่อความมั่นใจ ถึงประสิทธิภาพและคุณสมบัติของเซรัมก่อนสรุปผลการทดลอง เพื่อใช้ในการตรวจสอบไวรัสภาคปฏิบัติอย่างมีประสิทธิภาพ

5.2.3 การศึกษาวิธีการตรวจสอบคุณภาพเซรัมในการดักจับอนุภาคไวรัสด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) แบบ indirect ELISA

โดยการบดตัวอย่าง (*D.picta* และ พลุฉลุ) ที่แสดงอาการของโรคชัดเจน ในสารละลาย coating buffer นำน้ำคั้น (sap) ที่ได้ไปเจือจางที่ความเข้มข้น 1:20 สารละลาย coating buffer จากนั้นหยดน้ำคั้น (sap) ลงในหลุม ELISA plate ปริมาณ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำ ELISA plate ใส่ในกล่องความชื้นเข้าตู้อบ (incubator) ที่ 37 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBS-T อีก 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3 นาที จากนั้นจับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหยอด serum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองแต่ละครั้ง โดยเจือจางในสารละลาย conjugate buffer ที่ความเข้มข้น

1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 นำ ELISA plate ใส่กล่องความชื้นเข้าตู้อบ (incubator) อีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBS-T อีก 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3 นาที ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชูหยอด (antibody ของแพะผลิตในกระต่าย) ใน conjugate buffer ที่เชื่อมด้วย enzyme-alkaline phosphatase เจือจางใน conjugate buffer นำ ELISA plate เข้าในกล่องขึ้นอบในตู้อบ (incubator) ที่ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBS-T อีกครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3 นาที จากนั้นนำ phosphatase substrate 5 mg. ต่อ 10 ml. ละลายใน substrate buffer หยอด substrate ลงใน ELISA plate 200 ไมโครลิตรต่อหลุม รอประมาณ 20 นาที buffer ใน plate จะค่อยๆ เปลี่ยนเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงถึงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการตรวจจับอนุภาคของไวรัส จากนั้นจึงนำเข้าเครื่องอ่านผล (ELISA Reader)

## บทที่ 2

### การตรวจเอกสาร

การปลูกไม้ดอกไม้ประดับเพื่อการพักผ่อนหย่อนใจ และเพื่อสนทนากการมีมาช้านานตั้งแต่บรรพบุรุษจนปัจจุบัน และคาดว่าจะยิ่งมากขึ้นในอนาคตมีผู้ปฏิบัติสืบทอดกันมาด้วยความพึงพอใจของคนทุกชนชั้นในสังคม จนปัจจุบันสู่ยุคโลกไร้พรมแดน จากงานอดิเรกของการปลูกไม้ประดับ ก็เริ่มเปลี่ยนเป็นธุรกิจการค้ามีการซื้อขาย แลกเปลี่ยนมากขึ้นตามสมัยนิยมและความต้องการ มีรายงานว่าความจำเป็นต่อการใช้งานในแต่ละท้องถิ่นที่มีความแตกต่าง โดยเฉพาะไม้ประดับใบ (foliage plants) ซึ่งเป็นไม้กระถาง มีการใช้ตกแต่งสำนักงาน และสถานที่มากขึ้นตามลำดับ (สมพงษ์, 2525) ยังมีรายงานอีกว่า ไม้ประดับวงศ์ Araceae กำลังเป็นที่สนใจและโดยเฉพาะในสกุล *Dieffenbachia picta* มีผู้นิยมสูงสุด (วิทย์, 2536) ไม้ประดับวงศ์ Araceae มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศเวเนซุเอลา คอสตาริกา บราซิล โคลัมเบีย เปรู และบริเวณแถบลุ่มน้ำอเมซอน (สารานุกรม ไม้ประดับในประเทศไทย, 2536) แต่ยังไม่มียางานอย่างเป็นทางการว่ามีผู้นำเข้ามาในประเทศไทยเมื่อใดจากรายงานทราบว่าไม้ชนิดนี้สามารถปรับตัวและเจริญเติบโตในที่อากาศร้อนชื้นได้เป็นอย่างดี ค่อนข้างทนต่อโรคและแมลงได้ดีในช่วงแรกเมื่อปลูกต่อเนื่องกันเป็นเวลานานและจำนวนมากย่อมจะเกิดปัญหาด้านโรคและแมลงตามมา โดยเฉพาะไม้ประดับสกุล *Dieffenbachia sp.* ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมภายในประเทศ ทั้งยังมีแนวโน้มในการส่งออกแต่ก็ประสบปัญหาด้านโรค โดยเฉพาะโรคจากไวรัส ซึ่งยังไม่มีวิธีรักษาในไม้ประดับหลายชนิด

การศึกษาถึงพืชอาศัยของเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุ โดยการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบโดยวิธีกล (mechanical transmission) ใช้น้ำคั้นจากพืชที่เป็นโรคทาลงบนใบพืชทดสอบ โดยผสมผง celite เพื่อเป็นตัวทำให้เกิดบาดแผล (wound) สู่พืชอาศัยในตระกูล Nonaraceous ซึ่งมีคุณสมบัติชอบน้ำและอ่อนแอต่อเชื้อสาเหตุ จากนั้นย้ายเข้าเรือนกันแมลงภายในปรับอุณหภูมิประมาณ 18-24 °C พบว่าเชื้อสาเหตุในน้ำคั้นสามารถทำให้พืชอาศัยแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนบนใบเช่น *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*,

*C.ambrosioides*, *Nicotiana benthiana*, ใน *C.quinoa* และ *N.benthiana* จะมีอาการ local chlorotic spots (Verplancke, 1930)

Tompkins และคณะ (1934) รายงานว่าการถ่ายทอดโดยวิธีกล (mechanical transmission) ของเชื้อไวรัส ตัวยาวคดงอคล้ายเส้นด้าย (flexuous rod) จัดอยู่ในกลุ่ม potyvirus group อาการของไวรัสจะปรากฏในพืชตระกูลบอนสีที่มีการขยายพันธุ์แบบแยกหน่อ (sprout) เชื้อมีความสัมพันธ์กับพืชในกลุ่ม Araceous โดยมีเพลี้ยอ่อน (aphid), เพลี้ยแป้ง (mealy bug), ไโรแดง (red spider), แมลงหิวขาว (white fly) เป็นพาหะซึ่งสามารถเข้าทำลายในพืชตระกูลบอนสีและเชื้อจะระบาดรุนแรง เมื่อพืชอาศัยอ่อนแอหรือช่วงที่เป็นต้นอ่อน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้พืช แคระแกรน และตายในเวลาต่อมา

นอกจากนี้ Gunguly (1965) ได้ทำการทดสอบปลูกเชื้อโดยวิธีกล ด้วยน้ำคั้นจากใบของพืชที่เป็นโรคมาเจือจาง (dilute) ด้วยน้ำประปาผสมผง Carborandum เพื่อให้พืชทดสอบเกิดบาดแผล ซึ่งพืชทดสอบได้จากการเพาะด้วยเมล็ดมีใบจริง 2-3 ใบอายุประมาณ 14-15 วัน จากนั้นพืชทดสอบจะเริ่มแสดงอาการมากขึ้นตามความรุนแรงของเชื้อเมื่อนำมาตรวจสอบพบอนุภาคไวรัส จากการศึกษารายละเอียดในส่วนของใบ *Colocasia esculenta* (L.) Schott ที่เป็นโรคและอาการบน *Dieffenbachia* ที่พบหลังจากการปลูกเชื้อ มี 3 ระดับ คือ อาการเริ่มแรกจะไม่รุนแรง คล้ายๆกับเป็นการพักตัวของเชื้อต่อมาอาการจะเริ่มรุนแรงขึ้นตามลำดับในที่สุดพืชทดสอบจะตายในเวลาต่อมา ส่วน *Dieffenbachia maculata* พันธุ์ perfection และ lemon จะมีอาการต่างบริเวณใบส่วนยอดที่ผลิใหม่จะแสดงอาการบิดเบี้ยวพื้นใบเหี่ยวย่นสีจะขาวซีดและเขียวเข้มในใบเดียวกัน ขนาดใบและทรงต้นเล็กลง พืชแสดงอาการแคระแกรน (Bos, 1970)

Alconero (1971) รายงานว่า พืชที่มีอาการใบต่างคล้ายกับพืชทดสอบตระกูลบอนคือ *Caladium hortulanum*, *Bridsey*, *Caladium esculenta*, *Dieffenbachia picta*. Schott และ *Xanthosoma caracu* Koch & Bouche จนกระทั่ง Abo El-Nil และคณะ (1977) รายงานว่าพบเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1970 จากการเข้าทำลายไม้ประดับตระกูลบอนสี ซึ่งพบอนุภาคของเชื้อไวรัสที่มีลักษณะเป็นตัวยาวคดคล้ายเส้นด้าย (flexuous rod) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม potyvirus group ระบาดและทำความเสียหายในรัฐฟลอริดาประเทศสหรัฐอเมริกา เปอโตริโก เวเนซุเอลา เนเธอร์แลนด์ และในหมู่เกาะไซโลมอน ต่อมา Chase และ Zettler (1982) ได้รายงานว่ ในไม้ประดับสกุล *Dieffenbachia* sp. หลายชนิดถูกทำลายโดยเชื้อไวรัส ซึ่งพบว่าเป็นการติดเชื้อในธรรมชาติเนื่องจากต้องปลูกเป็นจำนวนมากในระยะเวลาที่ยาวนานเพื่อการค้า เมื่อนำตัวอย่างพืชที่แสดงอาการของโรคทำการตรวจสอบ หาสาเหตุพบ

เชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) สาเหตุของการทำให้พืชแสดงอาการเป็นโรคแพร่กระจายทั่วต้น ในพืชอาศัยวงศ์ Araceae เช่นในไม้ประดับสกุล *Aglaonema*, *Alocasia*, *Amorphophallus*, *Anthurium*, *Arisacma*, *Caladium*, *Colocasia*, *Cryptocoryne*, *Dieffenbachia*, *Philodendron*, *Spathiphyllum*, *Xanthosoma* และ *Zantedeschia* (Hartman, 1974 a; Hartman and Zettler, 1972; Tooyama, 1975 a; Zettler et al. 1970)

Chase และ Zettler (1982) รายงานว่าพบลักษณะอาการแผลจุดวงแหวน (ring spots) อาการด่าง (mosaic) และอาการบิดเบี้ยว (distortion) โดยเฉพาะเมื่อมีการเคลื่อนย้ายต้นพืชโดยขาดความระมัดระวัง จะทำให้พืชเกิดบาดแผลโดยการขีดข่วนของใบ กิ่งและลำต้นเกิดการแตกหัก เมื่อมีการสัมผัสกับพืชที่เป็นโรคจะทำให้เกิดการติดเชื้อได้ง่าย ในขณะที่พืชอ่อนแอและอาจจะเป็นการเพิ่มความรุนแรงของเชื้อ DMV ในต้นพืชที่แสดงอาการผิดปกติ จากการเข้าทำลายของเชื้อ ส่วนใหญ่จะพบในไม้ประดับสกุล *Dieffenbachia* ทั้ง *D. maculata*, *D. amoena* และพืชในกลุ่มอื่นที่มีความอ่อนแอต่อเชื้อนี้ คือ *Datura stramonium* จะปรากฏอาการของโรคไวรัสอย่างชัดเจนลักษณะอาการต่างเหลือบบนใบและยอดอ่อน Vovlas และ Zettler (1983) รายงานว่า พืชพวก *Richardia africana* แสดงอาการใบบิดเบี้ยว และสีผิดปกติ โดยใบจะมีสีเหลืองเป็นแถบยาวตามเส้นใบสลับกับสีเขียวเข้ม อาการที่ปรากฏจะชัดเจน ส่วนใหญ่จะเป็นที่ใบอ่อนและส่วนยอดช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วงจะแสดงอาการกระจายทั่วทั้งต้น (systemic symptom) เชื้อจาก dasheen mosaic virus (DMV) จะแสดงอาการใน *Colocasia esulenta* เป็นจุดสีเหลืองซีดกระจายอยู่ทั่วไปอย่างไม่มีขอบเขตที่แน่นอน ส่วนอาการที่พบบน *D. maculata* และ *D. amoena* พืชจะแสดงอาการต่างเหลือบบนใบพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อ 10-20 วัน จุดจะขยายเป็น necrotic บนใบแก่ และขยายเป็น necrotic spots บนใบใหม่ พืชจะตายภายในเวลา 60-70 วัน Bos (1970) ยังรายงานต่ออีกว่า น้ำคั้นจากใบ *Philodendron selloum* ที่ถูกเชื้อ DMV เข้าทำลายพบว่าจุดที่เป็น dilution end point (DEP) อยู่ที่  $10^{-2}$ - $10^{-3}$  อุณหภูมิที่เชื้อยังคงสภาพการก่อให้เกิดโรคอยู่ระหว่าง 60-65°C และคงสภาพในอุณหภูมิห้อง longevity in vitro (LIV) ได้นาน 75 ชั่วโมง

Korpraditskul (1979) ได้รายงานถึงวิธีการศึกษา และตรวจสอบหาอนุภาคของไวรัสในพืชที่แสดงอาการของโรคจากไวรัส โดยวิธีทางเซรุ่มวิทยาเป็นการตรวจสอบที่รวดเร็ว และแม่นยำแบบเฉพาะเจาะจง เหมาะต่อการตรวจหาเชื้อไวรัส เพื่อการวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรค ซึ่งมีหลายวิธีการดังนี้

1. Slide precipitation test คือ การตกตะกอนในของเหลวบนแผ่นสไลด์เป็นวิธีการตรวจสอบขั้นต้น ของการทดสอบประสิทธิภาพของเซรุ่มวิทยา โดยอาศัยคุณสมบัติที่เฉพาะระหว่างแอนติบอดี (antibody) กับแอนติเจน (antigen) ทำปฏิกิริยากันที่ความเข้มข้นพอเหมาะภายในกล่องความชื้น (moist chamber) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อย ๆ เกิดเป็นตะกอนขุ่นเมื่อมองด้วยตาเปล่า หรือภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มี dark field ที่กำลังขยาย 10-40 เท่า จะเห็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นปุยสีขาวคล้ายก้อนเมฆอย่างชัดเจน

2. Ouchterlony double agar diffusion test คือ การตกตะกอนผ่านวุ้น (ตัวกลางกึ่งแข็งกึ่งเหลว) โดยการศึกษาน้ำแอนติเจน (antigen) กับแอนติบอดี (antibody) จากการเกิดปฏิกิริยาโดยการซึมผ่านวุ้นเข้าทำปฏิกิริยากัน ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจะเกิดเป็นแถบตะกอน (band) สีขาวขุ่นเป็นเส้นโค้งในวุ้นตัวกลาง ซึ่งอยู่ระหว่างหลุมของแอนติเจน (Ag) กับแอนติบอดี (Ab) สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ธีระ, (2522) ลักษณะของแถบตะกอน (band) ที่ปรากฏจะขึ้นอยู่กับแอนติบอดี และชนิดของพีชอาศัยก่อนทำการแยกให้ไวรัสบริสุทธิ์ (Ball, 1974) การตรวจสอบโดยวิธีนี้ สามารถแยกปฏิกิริยาไม่เฉพาะเจาะจง (non-specific reaction) ของแอนติเจน (Ag) กับแอนติบอดี (Ab) ได้ง่าย แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของการตรวจสอบไวรัสโดยวิธีนี้ คือ ความยาวของอนุภาคและการเกาะกลุ่มของไวรัส โดยเฉพาะไวรัสที่มีรูปร่างเป็นท่อนซึ่งมีความยาวมากกว่า 500 นาโนเมตร ขึ้นไปไม่สามารถซึมผ่านวุ้นหรือผ่านได้เพียงขอบหลุม (Chegdi and Girasimosa, 1979)

วิธีอิมมูโนอิเล็กตรอนไมโครสโคป (Immunoelectron microscope - IEM) Derrick (1972) ได้รายงานวิธีการตรวจสอบอนุภาคไวรัส โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในการดักจับอนุภาคของไวรัสเชื้อสาเหตุโรคพิษ เพื่อดูปฏิกิริยาโดยใช้คุณสมบัติที่เฉพาะเจาะจงของแอนติเจน (Ag) กับแอนติบอดี (Ab) และได้เสนอผลงานการปรับปรุงเทคนิคในการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาเชื้อสาเหตุโรค ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและสามารถตรวจพบปริมาณไวรัสได้มากขึ้น จากการเตรียมตัวอย่างปกติ 20-50 เท่า Derrick (1973, a และ b)

Milene และ Luisoni (1971) ได้สรุปวิธี IEM เป็น 3 วิธี คือ

1. วิธี clumping คือ นำน้ำคั้นของพิษเป็นโรค (แอนติเจน, Ag) ทำปฏิกิริยาโดยตรงกับเซรุ่ม (แอนติบอดี, Ab) จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น ใช้กระดาษกรองซับให้แห้ง ย้อมสีด้วย UA 2% ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2. วิธี Decorate จากน้ำคั้นของพืชที่เป็นโรค (แอนติเจน, Ag) ให้ดูดซึมซับกับฟิล์มที่เคลือบกริดขนาด 300 mesh ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับเซรุ่ม(แอนติบอดี, Ab) จากนั้นล้างออกด้วยสารละลายเคมี (buffer) โดยใช้กระดาษกรองซับพอแห้ง ล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น ซับด้วยกระดาษกรองเคลือบด้วย UA 2% ซับให้แห้ง ไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3. วิธี Derrick วิธีการให้แอนติบอดี (Ab) ดูดซึมซับกับฟิล์มที่เคลือบบนกริดขนาด 300 mesh ก่อนจึงนำไปทำปฏิกิริยากับ แอนติเจน (Ag) ล้างด้วยสารละลายเคมี (buffer) ซับด้วยกระดาษกรอง ล้างด้วยน้ำกลั่นซับอีกครั้ง ย้อมสี UA 2% ซับให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นอกจากนี้ ปัจจัยสำคัญในการทำ IEM คือ การเพิ่มประสิทธิภาพ และวิธีการขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่ใช้บ่มเพื่อให้แอนติเจน (Ag) กับแอนติบอดี (Ab) ทำปฏิกิริยากัน หรือช่วงของการใช้แอนติบอดี (Ab) เคลือบติดฟิล์มที่เคลือบกริด เป็นอีกปัจจัยที่มีผลสำคัญ คือช่วงเวลาที่ใช้บ่มอาจเพิ่มหรือลดเวลาได้ตามความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติบอดี (Ab) และแอนติเจน (Ag)

ต่อมา Milene และ Luisoni, (1977) Shukla และ Gough (1979) รายงานว่าได้ใช้โปรตีนเอ จากเชื้อ *Streptococcus amrens* ร่วมกับวิธี Derrick โดยเคลือบกริดก่อนด้วยโปรตีนเอ ทำให้การดักจับอนุภาคไวรัส ได้ผลดีกว่าวิธีของ Derrick

**การตรวจสอบโดยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)** เป็นวิธีการที่ตรวจหาอนุภาคไวรัสที่มีประสิทธิภาพสูง หลักการคือเซรุ่ม(antibody) ถูกจับโดยผิวหน้าด้านในหลุมของ polystyrene microtitre plate ด้วยประจุไฟฟ้าเพื่อเซรุ่มที่เคลือบอยู่บนผิวจะคอยจับและทำปฏิกิริยากับแอนติเจนหรือตัวอย่างที่เติมลงไป)และแอนติเจนจะทำปฏิกิริยากับเซรุ่มที่เกาะกับ enzyme (specific enzyme labelled antibody) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะถูกตรวจสอบด้วยการเปลี่ยนแปลง substrate ให้เป็น product ซึ่งมีสีอัตราความเข้มข้นของสีขึ้นอยู่กับปริมาณของ enzyme และระยะเวลา ดังนั้นจึงสามารถนำมาคำนวณปริมาณของไวรัสได้ enzyme ที่ใช้มี 3 ชนิด คือ horseradish peroxidase alkaline phosphatase และ bysozyme ส่วน enzyme substrate ได้แก่ P-nitropheny phosphates สำหรับ alkaline phosphatase และ N -phenylenediamine สำหรับ horseradish peroxidase ปัจจุบันมีการใช้ระบบคอมพิวเตอร์มาใช้ในการอ่านผลการตรวจสอบ โดยวิธี ELISA ฉะนั้นการตรวจสอบจึงทำได้อย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพสูง สามารถตรวจสอบตัวอย่างไวรัสได้ถึง 2,000 ตัวอย่างต่อวัน วิธีการตรวจสอบไวรัสด้วย ELISA จึงนิยมนำมาใช้ในการวินิจฉัย พยากรณ์โรค การผลิตท่อนพันธุ์พืชปราศจากโรคและคัดพันธุ์ต้านทาน เป็นต้น (ปราณี, 2526; Amos, 1984)

### บทที่ 3

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ชนิดของพืชที่สำรวจพบอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส จากการสุ่มสำรวจไม้ประดับตามลำดับของความนิยมผู้บริโภคพบอาการบนพืชต่อไปนี้

1.1 *D. picta* อาการของไวรัสที่พบบนใบส่วนยอดพื้นสีเขียวของใบจะแสดงอาการแตกต่าง คือจะมีสีเขียวอ่อนเป็นแถบตามความยาวของเส้นแขนงกลางใบยาวลงไปจนถึงเส้นขอบใบสลับกับสีเขียวเข้มในใบเดียวกัน (ภาพที่ 4,5 และ 6) เป็นสาเหตุทำให้ลักษณะของใบผิดปกติในส่วนของใบที่แสดงอาการรุนแรง นอกจากที่กล่าวมาแล้วยังแสดงอาการคล้ายถูกน้ำร้อนลวก และมีรอยชำเป็นวงกลมซ้อนกันอย่างไม่มีขอบเขตที่แน่นอน ส่วนในใบแก่ที่ปรากฏอาการจากไวรัสเข้าทำลาย ลักษณะของใบจะเล็กลง อาการต่างเหลืองและเขียวเข้มที่พื้นใบไม่มีขอบเขตที่แน่นอน ปรากฏอาการต่างเหลืองเป็นแถบยาวจากเส้นแขนงลงไปที่ยอดใบสลับกับสีเขียวเข้ม เป็นสาเหตุทำให้ลักษณะของใบผิดปกติเมื่อเชื้อทวีความรุนแรงส่งผลให้ระบบเซลล์เนื้อเยื่อภายในเปลี่ยนแปลงมากขึ้น และพืชอาศัยจะตายในเวลาต่อมา

1.2 พลุฉลุ พบอาการของไวรัสบนใบอ่อนสีเขียวซีดค่อนข้างเหลือง พบอาการต่างเหลืองกระจายอยู่ทั่วไป ลักษณะของใบโดยส่วนใหญ่ที่พบจะค่อนข้างม้วนงอเข้าหากัน ในต้นที่แสดงอาการรุนแรงใบส่วนยอดจะม้วนเป็นเส้นเชือก ส่วนใบแก่พื้นใบจะแสดงอาการเขียวเข้มเป็นวงกลมประมาณ 0.5 ซม. กระจายอยู่ทั่วไปสลับกับอาการต่างเหลืองแบบไม่มีขอบเขตที่แน่นอนกระจายอยู่ทั่วไป ส่งผลให้ลักษณะของใบเปลี่ยนแปลง เช่น รูปทรงของใบลดลง ใบแสดงอาการบิดเบี้ยว ขอบใบคดงอ ลักษณะของต้นแคระแกรนชะงักการเจริญเติบโต หยุดการเจริญเติบโต และตายในเวลาต่อมา (ภาพที่ 7)

1.3 *D. orstedii* เป็นไม้ประดับที่มีใบลักษณะค่อนข้างหนาและแข็ง อาการของโรคที่พบจากใบอ่อนส่วนยอดจะมีสีเขียวอ่อนเป็นแถบยาวจากเส้นกลางถึงขอบใบ สลับกับสีเขียวเข้มทั่วทั้งใบ พื้นใบแสดงอาการเหี่ยวเล็กน้อยและเป็นคลื่นอาการโดยส่วนใหญ่คล้ายกับไม้ประดับ *D. picta* ในใบแก่จะพบที่ส่วนของพื้นใบต่างเขียวเข้มคล้ายรอยชำกระจายอยู่ทั่วใบ ขอบใบม้วนงอเล็กน้อย (ภาพที่ 8) ทรงต้นจะแสดงอาการโทรมและแคระแกรน

1.4 *Candida* พบที่ใบส่วนยอดแสดงอาการต่างเหลือง พื้นใบเหี่ยวยุ่นเป็นคลื่น

1.5 *Philodendron* ในส่วนของใบอ่อนจะแสดงอาการสีซีด เนื่องจาก chlorophyll ถูกทำลายขอบใบม้วนงอลงเล็กน้อย

1.6 *philodendron selloum* แสดงอาการต่างเหลืองซีดรูปใบบิดเบี้ยว หึงงอ รูปทรงของใบเปลี่ยนไป ขอบและปลายใบม้วนงอ

1.7 *Colocasia esculent* (บอนสี) แสดงอาการต่างสีซีขาวอ่อนสลับกับเขียวเข้มที่รอยต่อระหว่างสีเขียวอ่อนกับสีเขียวเข้มมองเห็นชัดเจน

ผลความแตกต่างระหว่างพืชทดสอบที่ปลูกในโรงเรือนไม่ปรับอุณหภูมิกับโรงเรือนปรับอุณหภูมิ จากการสังเกตอาการด้วยสายตา พบว่าพืชทดสอบที่ปลูกในโรงเรือนไม่ปรับอุณหภูมิจะมีการเจริญเติบโตโดยเฉลี่ยดีกว่า พืชทดสอบที่ปลูกในโรงเรือนปรับอุณหภูมิล็กน้อยแต่อาการของโรคที่ปรากฏบนพืชทดสอบส่วนใหญ่ พบว่าพืชที่อยู่ในโรงเรือนปรับอุณหภูมิจะแสดงอาการของโรคเชื้อสาเหตุค่อนข้างรุนแรงและพืชทดสอบจะแสดงอาการแคระแกรนกว่าพืชที่ปลูกในโรงเรือนไม่ปรับอุณหภูมิ จากการดูแลรักษาและการให้น้ำเหมือนกันอาจเป็นเพราะไวรัสเชื้อสาเหตุสามารถเจริญและเพิ่มปริมาณได้ดีบนพืชที่อยู่ในที่มีอุณหภูมิเย็น

## 2. ผลการปลูกเชื้อบนพืชอาศัยในเรือนทดลอง

ไม่ปรากฏอาการของการเข้าทำลายจากเชื้อ dasheen mosaic virus บนพืชทดสอบทั้ง 4 วงศ์ ทั้งบนใบที่ทำการปลูกเชื้อและบนใบอ่อนของพืช ดังนั้นในการคัดเลือกชนิดพืชทดสอบเพื่อใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จึงพิจารณาเลือกพืชอาศัย 2 ชนิดเพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบอันได้แก่ *D. picta* และ พลูดลู ซึ่งเป็นพืชที่แสดงอาการของโรคชัดเจนและเชื้อ dasheen mosaic virus เป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยอยู่ในวงศ์แคบ เฉพาะในวงศ์ Araceae เท่านั้น โดยก่อนที่จะทำการปักชำเพื่อเพิ่มปริมาณต้นไม้ได้ทำการตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสอีกครั้ง โดยการทำ IEM เทคนิคด้วยแอนติซีรัมของเชื้อ DMV กับน้ำคั้นของพืชเป็นโรค หลังจากนั้นจึงนำต้นที่มีการเข้าทำลายของเชื้อ DMV มาทำการปักชำเพื่อเพิ่มปริมาณดังนี้

ภาพที่ 4



แสดงถึงอาการผิดปกติของไม้ประดับ *Dieffenbachia picta* ในใบแก่จะปรากฏอาการต่างเขียวเข้มแตกต่างจากลักษณะประจำพันธุ์ ผลคล้ายรอยช้ำเป็นจุดวงแหวนเขียวเข้มสลับเขียวอ่อน ไม่มีขนาดและขอบเขตที่แน่นอน

## ภาพที่ 5



แสดงถึงการเข้าทำลายของไวรัสบนใบอ่อนส่วนยอดของไม้ประดับ *Dieffenbachia picta*  
ปรากฏอาการต่างเหลืองซีด สลับกับสีเขียวอ่อนลักษณะของใบเริ่มม้วนงอ

ภาพที่ 6



แสดงตัวอย่างความผิดปกติของไม้ประดับ *D. picta* จากแหล่งปลูกที่แสดงอาการของไวรัส ลักษณะของใบจะเล็กกว่าปกติ พื้นใบเป็นคลื่นเล็กน้อยเกิดแถบสีเขียวเข้มสลับกับสีเขียวอ่อนจากเส้นกลางถึงขอบใบ

## ภาพที่ 7



แสดงถึงการเข้าทำลายของไวรัสจากแหล่งปลูก โดยพลุจตุจะแสดงอาการของโรคอย่างรุนแรง ลักษณะใบต่างเหลืองกระจายบนใบอย่างไม่มีขอบเขต พื้นใบเหี่ยวย่นหงิกงอต้นแคระแกรน

ภาพที่ 8



แสดงถึงอาการผิดปกติของไม้ประดับ *D. orstedii* ปากฏอาการเขียวเข้มสลับกับเขียวอ่อน เป็นแถบยาวพื้นใบเป็นคลื่นส่วนยอดจะหงิกงอลักษณะของใบเล็กกว่าปกติ

2.1 การเพิ่มปริมาณของไม้ประดับ *D. picta* โดยการตัดชำและแยกหน่อ จากส่วนของต้นที่แสดงอาการของโรค หลังจากที่ได้ตรวจพบอนุภาคไวรัสเชื้อสาเหตุ โดยใช้วิธีตัดเป็นท่อน ทิ้งไว้พอหมาดประมาณ 30 นาที (วิทย์, 2536) แล้วจุ่มฮอร์โมนเร่งราก (เซอราดิก เบอร์ 2) ปลูกในดินผสม เมื่อพืชทดสอบผลิบา จึงเริ่มใส่ปุ๋ยเคมีสูตร 15-15-15 ทั้งหมด 30 กระถาง แล้วย้ายเข้าเรือนเพาะชำกันแมลง (nursery) 15 กระถาง และเรือนกระจก (glass house) ปรับอุณหภูมิที่ 26-28 องศาเซลเซียส อีก 15 กระถางได้ใบโดยเฉลี่ย 4 ใบต่อต้น พืชอาศัยค่อนข้างโตช้าเพราะอาการของโรคระหว่างพืชอาศัยที่อยู่ในเรือนกันแมลงกับพืชอาศัยที่อยู่ในโรงเรือนกระจก ความเจริญเติบโตไม่ต่างกัน แต่อาการของการเกิดโรคจะมีความแตกต่าง คือในเรือนกระจกจะแสดงอาการของโรคชัดเจนกว่าพืชอาศัยที่อยู่ในเรือนกันแมลงอุณหภูมิปกติ

2.2 การเพิ่มปริมาณของพอลลูล จากต้นที่ตรวจพบอาการของเชื้อสาเหตุ DMV โดยวิธีการตัดชำ เช่นเดียวกับ *D. picta* ที่กล่าวไว้ข้างต้น จำนวน 30 กระถาง เช่นกัน โดยส่วนหนึ่งไว้ในเรือนกันแมลง (nursery) 15 กระถาง และในเรือนกระจก (glass house) ปรับอุณหภูมิ 15 กระถาง เป็นเวลาเท่ากัน ปรากฏว่าพืชอาศัยที่อยู่ในเรือนกันแมลงมีทรงต้นโดยเฉลี่ยสูงกว่าพืชอาศัยที่อยู่ในโรงเรือนปรับอุณหภูมิเล็กน้อย แต่พืชอาศัยที่อยู่ในโรงเรือนปรับอุณหภูมิจะแสดงอาการของโรคชัดเจนกว่าโดยการสังเกตด้วยสายตา ยูพา, (2527) รายงานว่าพืชอาศัยจะมีทรงต้นค่อนข้างแคระแกรน และใบส่วนใหญ่จะหงิกงอค่อนข้างมันวาวเล็กน้อยอาจเป็นเพราะเชื้อ DMV สามารถเพิ่มปริมาณได้รวดเร็ว ในพื้นที่ที่มีอากาศเย็นเนื่องจากพืชอาศัยทั้ง *D. picta* และพอลลูล ต่างแสดงอาการจากการเข้าทำลายของเชื้อ DMV อย่างชัดเจน มีรายงานว่าพืชอาศัยที่แสดงอาการต่างเหลือง จากการเข้าทำลายโดยการถ่ายทอดเชื้อด้วยวิธี sap transmission ได้แก่ *philodendron selloum*, *Caladium hortulanum*, *Dieffenbachia spp.* (Chase and Zettler 1982; Rana et al, 1983; Zettler et al, 1978) ซึ่งในการทดสอบชนิดของพืชที่ถูกเชื้อ DMV เข้าทำลายผู้วิจัยไม่ได้มีการทดสอบพืชเหล่านี้ เนื่องจากปัญหาในด้านการหาเมล็ดพันธุ์มาเพาะ หรือการจัดซื้อพืชปลอดโรคจากตลาดนัดต้นไม้ อย่างไรก็ตามจากการทดสอบชนิดของพืชอาศัยทั้ง 4 วงศ์ ก็ไม่ปรากฏอาการการเข้าทำลายของเชื้อ DMV ในขณะที่ Rana และคณะ(1983) ทำการทดสอบการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้น โดยการใช้ส่วนของ epidermis ของใบ *Richardia africana* ปรากฏการเข้าทำลายของเชื้อในพืชทดสอบดังต่อไปนี้ คือ *C. quinoa*, *C. amaranticolor* โดยพืชแสดงอาการแผลจุดสีเหลืองบนใบที่ทำการปลูกเชื้อ ความสำเร็จในการปลูกเชื่อนี้อาจเนื่องมาจากการลดจำนวนของสารพวก inhibitor ซึ่งอาจมีในส่วนของใบ และปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ

### 3. ผลการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ในพืชอาศัยวงศ์ Araceae

3.1 จากตัวอย่างพืชทดสอบ *D. picta* พบอนุภาคของเชื้อสาเหตุจากการตรวจสอบโดยวิธี leaf dip ประมาณ 10-20 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้องและวิธี derrick และ decorate พบอนุภาคไวรัสประมาณ 20-30 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง

3.2 *Monstera obliqua expilat* (พลูดอก) จากการตรวจสอบด้วยวิธี leaf dip พบอนุภาคไวรัสไม่เกิน 10 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง ส่วนวิธี derrick และ decorate พบอนุภาคไวรัสประมาณ 20-32 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง

3.3 *D.orstedii* การตรวจสอบจากตัวอย่างวิธี leaf dip พบอนุภาคไวรัสไม่เกิน 10 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้องส่วนวิธี derrick และ decorate พบอนุภาคไวรัสประมาณ 10-20 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง

3.4 *Candida* จากการตรวจสอบตัวอย่างด้วยวิธี leaf dip ไม่พบอนุภาคไวรัส ส่วนวิธี derrick และ decorate พบอนุภาคไวรัสประมาณ 10-20 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง

3.5 *Philodendron* จากการตรวจสอบตัวอย่างด้วยวิธี leaf dip ไม่พบอนุภาคไวรัส ส่วนวิธี derrick ไม่พบและ decorate พบอนุภาคไวรัสประมาณ 10-20 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง

3.6 *Philodendron selloum* จากการตรวจสอบตัวอย่างด้วยวิธี leaf dip ไม่พบอนุภาคไวรัส ส่วนวิธี derrick พบไม่เกิน 10 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้องและ decorate พบอนุภาคไวรัสประมาณ 10-20 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง

3.7 *Colocasia esculenta* (บอนสี) จากการตรวจสอบตัวอย่างด้วยวิธี leaf dip ไม่พบอนุภาคไวรัส ส่วนวิธี derrick ไม่พบและ decorate พบอนุภาคไวรัสไม่เกิน 10 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง

การตรวจสอบไวรัสด้วยวิธี leaf dip technique ใน *D.picta* พบอนุภาคไวรัสไม่มากนัก พลุฉลุพบเพียงเล็กน้อย ส่วนวิธี derrick และ decorate ร่วมกับเซรุ่ม DMV จะพบอนุภาคไวรัสจาก *D. picta* ปริมาณมากกว่าในพลุฉลุ พบไวรัสเชื้อสาเหตุปานกลางใน *D.orstedii* ส่วนใน *Candida*, *Philodendron*, *P.selloun* และ *Colocasia esculenta* ตรวจสอบด้วยวิธี leaf dip technique ไม่พบอนุภาคไวรัส แต่เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี derrick และ decorate ร่วมกับเซรุ่ม DMV พบอนุภาคไวรัสแต่ไม่มากนัก การเลือกตัวแทนของไม้ประดับในวงศ์ Araceae มา 7 ชนิด เพราะเป็นไม้ประดับ ซึ่งกำลังได้รับความนิยมตามลำดับ พบว่าที่กำลังขยาย 27,000 เท่า พบอนุภาค dasheen mosaic virus ชนิดที่สดเป็นเส้นสีขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ลักษณะ

ด้วยาวคดงอคคล้ายเส้นด้าย ซึ่งมีความยาว 750 นาโมเมตร จัดอยู่ในกลุ่ม potyvirus สรุปลักษณะคือ เป็นไวรัสจากเชื้อ DMV สาเหตุของโรคในไม้ประดับ *D.picta* แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าในหนึ่งหน้า กล้องจะพบอนุภาคไวรัสจาก *D.picta* ในปริมาณที่หนาแน่นกว่าในพฤษภาคม ส่วนในพฤษภาคมที่แสดง อาการของโรคมักกว่า แต่กลับพบอนุภาคของเชื้อสาเหตุโรคปริมาณที่น้อยกว่าดังวิธีการตรวจสอบในตารางที่ 1

## ภาพที่ 9



แสดงตัวอย่างพืชทดสอบ *Datura stamonium* และ *Chenopodium amaranticolor* ไม่  
แสดงอาการจากการถ่ายทอดเชื้อ dasheen mosaic virus

ภาพที่ 10



แสดงการปลูกพืชทดสอบและพืชอาศัยของโรค สาเหตุจากไวรัสในโรงเรือน  
ปรับอุณหภูมิ (glass house) ที่  $26-28^{\circ}\text{C}$  ใช้ในการปลูกและดูแลพืชทดลอง

ภาพที่ 11



แสดงถึงลักษณะการเจริญเติบโตของพืชทดสอบ ของเชื้อสาเหตุบนไม้ประดับ *D.picta* ภายในโรงเรือนปรับอุณหภูมิ

ภาพที่ 12



แสดงถึงวิธีการเก็บตัวอย่างจากพืชทดสอบ *D. picta* เพื่อนำไปแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์

ภาพที่ 13



แสดงถึงอนุภาคของไวรัสที่ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ด้วยวิธี leaf dip technique ที่กำลังขยาย 27,000 เท่า จากไม้ประดับ *D. picta* พบอนุภาคไวรัสมีลักษณะเป็นตัวยาวคดงอคล้ายเส้นด้าย (flexuous rod)

### ตารางที่ 1

การตรวจสอบอนุภาคของไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (EM)

ชื่อพืชทดสอบ	leaf dip	IEM with DMV	
		derrick	decorate
<i>D. picta</i>	+	++	++
<i>M.obliqua</i> (พลูดลู)	-	++	++
<i>D. oerstedii</i>	-	+	+
<i>Candida</i>	o	+	+
<i>Philodendron</i>	o	o	+
<i>P.selloum</i>	o	-	+
<i>Colocasia esculenta</i>	o	o	-

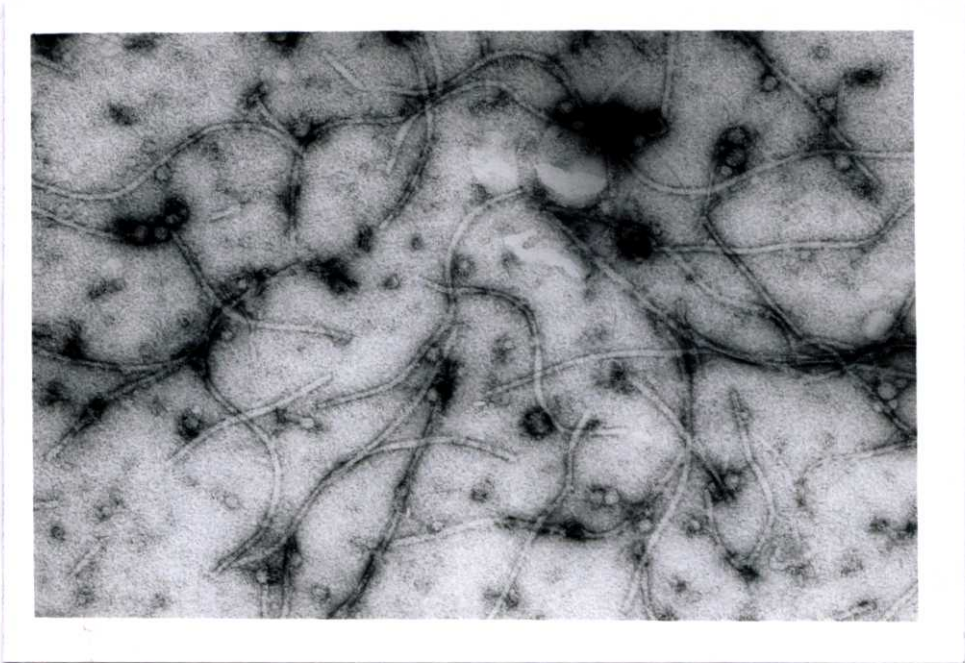
หมายเหตุ o ไม่พบอนุภาคไวรัส

- พบอนุภาคของไวรัสไม่เกิน 10 อนุภาคต่อ 1 หน้ากล้อง
- + พบอนุภาคของไวรัสไม่เกิน 10 - 25 อนุภาคต่อ 1 หน้ากล้อง
- ++ พบอนุภาคของไวรัสไม่เกิน 25 - 40 อนุภาคต่อ 1 หน้ากล้อง
- +++ พบอนุภาคของไวรัสไม่เกิน 40 - 55 อนุภาคต่อ 1 หน้ากล้อง

#### 4. ผลการศึกษาเปรียบเทียบการแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ ระหว่างพืชอาศัย *D.picta* และพลูดลู ซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุ DMV

ผลการทดลองพบว่าที่กำลังขยาย 27,000 เท่าพบอนุภาคของไวรัส DMV ที่มีความยาว 750 นาโนเมตร ลักษณะเป็นเส้นยาวคดงอคล้ายเส้นด้าย (ภาพที่ 13) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่า ในพลูดลูที่นำหนักพืชทดสอบ 500 กรัมเท่ากับพืชทดสอบ *D.picta* ทั้งที่อาการของพืชทดสอบพลูดลู ส่วนใหญ่จะแสดงอาการจากการถูกเชื้อ DMV เข้าทำลายรุนแรงกว่าแต่กลับพบอนุภาคไวรัสน้อยกว่า *D.picta* สำหรับความสมบูรณ์ของอนุภาคไวรัส พบว่าในพืชทดสอบ *D.picta* จะมีความสมบูรณ์และปริมาณมากกว่าในพลูดลู

ภาพที่ 14



แสดงถึงลักษณะอนุภาคไวรัสภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ที่กำลังขยาย 27,000 เท่า หลังการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนพืชอาศัย *D.picta* จาก dilution ที่ 1:10 โดยวิธี decorate

ปรากฏว่าในขั้นตอนการรอกันหลอดด้วยสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 10% ใน *D.picta* ซึ่งมีน้ำคั้นสีเขียวอ่อน จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคของไวรัสตั้งแต่ 25-40 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง แต่ละอนุภาคของไวรัสไม่ค่อยสะอาดนัก เนื่องจากมีสิ่งเจือปนอยู่มาก

ส่วนในน้ำคั้นของพลูจล มีสีเหลืองอ่อนหลังผ่านสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 10% เมื่อตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคของไวรัสตั้งแต่ 10-25 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง และมีสิ่งเจือปนอยู่ค่อนข้างมาก ศึกษาเปรียบเทียบโดยการผ่านสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 20% ใช้ในการรอกันหลอด ปริมาณ 5 cc ต่อหลอดน้ำคั้นของพืชอาศัย *D.picta* ซึ่งมีสีเขียวอ่อน ก่อนการผ่านสารละลายน้ำตาล พบว่าอนุภาคของไวรัสที่ได้ค่อนข้างสะอาดและบริสุทธิ์มากขึ้น เมื่อเทียบกับสารละลายน้ำตาล 10% นำไปตรวจสอบหาอนุภาคของไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคตั้งแต่ 25-40 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง (ภาพที่ 14) ในน้ำคั้นของพลูจลก่อนผ่านสารละลายน้ำตาล 2% พบว่าสีของน้ำคั้นเป็นสีเหลืองอ่อนเมื่อผ่านสารละลายน้ำตาลจะได้อนุภาคของไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์มากขึ้น จากนั้นนำไป dip เพื่อตรวจสอบหาปริมาณอนุภาคของไวรัสพบตั้งแต่ 10-25 อนุภาคต่อหนึ่งหน้ากล้อง แต่ละอนุภาคของไวรัสค่อนข้างสะอาดมีสิ่งเจือปนน้อยเมื่อเทียบกับการผ่านสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 10% พบอนุภาคของไวรัสในพืชอาศัย *D.picta* มากกว่าในพืชอาศัยพลูจล จากการศึกษเปรียบเทียบขั้นตอนและวิธีแยกเชื้อให้บริสุทธิ์วิธีเดียวกัน พบว่าการผ่านสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 20% อนุภาคของไวรัสสะอาดที่สุด จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นจึงพิจารณาคัดเลือกวิธีแยกไวรัสให้บริสุทธิ์จากพืชอาศัย *D.picta* ในการเป็นตัวแทนของไม้ประดับวงศ์ Araceae เพื่อการผลิตเซรุ่มที่ใช้ในการตรวจสอบ การเข้าทำลายของไวรัส DMV วิธีการ purify เมื่อเปรียบเทียบวิธีการทดลองกับต่างประเทศ พบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของห้องปฏิบัติการในต่างประเทศวิธีการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์โดยการใช้สารเคมี cesium chloride (CsCl) เพื่อรองรับอนุภาคของไวรัส(AboEl-Nil.etal,1977)รายงาน ส่วนในรายงานของการวิจัยครั้งนี้ผู้ทำการวิจัยได้ใช้ระดับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของน้ำตาล เพื่อรองรับอนุภาคของไวรัสผลที่ได้คาดว่าไม่มีความแตกต่าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณและอนุภาคของไวรัสที่พบในพืชอาศัย

## 5. ผลการตรวจสอบคุณภาพของเซรุ่ม DMV

5.1 โดยวิธี Slide precipitation test คือการนำเซรุ่ม(antiserum)มาเจือจาง (dilute) ด้วยสารละลาย PBS (phosphate buffer saline) pH 7.0 ตามลำดับความเข้มข้นมาทำปฏิกิริยากับ antigen จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และพืชทดสอบที่เป็นโรคเจือจางด้วยสารละลาย PBS 1M pH 7.0 ที่ 1:4 (พืชทดสอบ : สารละลาย) พบว่าในกรณีของ antigen จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จาก antiserum ครั้งที่ 1-3 เมื่อเจือจางกับสารละลาย 1:8 สามารถเกิดปฏิกิริยากับ antigen ได้ แต่เมื่อเจือจางกับสารละลาย 1:16 ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ antigen จึงอ่านค่า titer ครั้งนี้เท่ากับ 1:8 เมื่อสัตว์ทดลองสร้าง antibody ที่มีค่า titer ต่ำจึง Booster ด้วย antigen จากเชื้อ DMV ครั้งที่1 พบว่าจาก antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองในครั้งที่ 4-8 ( $As_4 - As_8$ ) สัตว์ทดลองสร้าง antibody เพิ่มขึ้นเป็น 1:128 ฉะนั้น  $As$  ครั้งที่ 4-8 จึงมีค่า titer เท่ากับ 1:128 ภายหลังการ Booster ครั้งที่ 2 ด้วย Ag เชื้อ DMV จากพืชอาศัย *D.picta* พบว่า antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองในครั้งที่9 ( $As_9$ ) พบว่าสัตว์ทดลองสร้าง antibody สูงสุดคือ 1:256 (ค่า titer ของ  $As_9 = 1: 256$ ) และ antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองในครั้งที่10 ( $As_{10}$ ) สัตว์ทดลองสร้าง antibody ลดลงที่ 1:128 ดังตารางที่ 2

การตรวจสอบคุณภาพ antiserum (เซรุ่ม)โดยการตกตะกอนในของเหลวบน สไลด์ (Slide precipitation test) โดยการใช้ antigen จากพืชทดสอบ *D.picta* ภายใต้อุณหภูมิ จุลทรศน์ที่กำลังขยาย 40เท่า (ภาพที่ 17) จาก antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลอง ในครั้งที่ 1-3 ( $As_1 - As_3$ ) โดยการอ่านค่าจาก antiserum ที่เจือจางในสารละลายจากความเข้มข้น มากไปหาความเข้มข้นน้อยและความเข้มข้นน้อยสุด ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อ antigen พบว่า antiserครั้งที่ 1-3 มีความเข้มข้นเท่ากับ 1:4 ( $As_1 - As_3$  มีค่า titer =1:4) Booster ครั้งที่ 1 ด้วย antigen เชื้อ DMV จากพืชอาศัย *D.picta* พบว่าจาก antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ ทดลองในครั้งที่ 4-8 สัตว์ทดลองสร้าง antibody เพิ่มขึ้นเป็น 1:128 ภายหลัง Booster ครั้งที่ 2 ด้วย antigen เชื้อ DMV จากพืชอาศัย *D. picta* พบว่า antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ ทดลองในครั้งที่ 9 ( $As_9$ ) จะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 1:128 และ  $As_{10}$  antiserum ที่ได้จากสัตว์ ทดลองปรากฏว่าความเข้มข้นของ antiserum ลดลงที่ 1:64 (ดังตารางที่ 3)

ภาพที่ 15



แสดงวิธีการเจาะเลือดเพื่อการผลิตเซรุ่มจากสัตว์ทดลองหลังการฉีด antigen ครั่งสุดท้าย

## ตารางที่ 2

ผลการตรวจสอบคุณภาพ antiserum โดยวิธี Slide precipitation test ด้วย antigen จาก  
สารแขวนลอยไวรัสบริสุทธ์

จำนวนครั้งที่ เจาะเลือด	Antiserum dilution							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
As <sub>1</sub>	++	++	+	-	-	-	-	-
As <sub>2</sub>	++	++	+	-	-	-	-	-
As <sub>3</sub>	++	++	+	-	-	-	-	-
Booster ครั้งที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>4</sub>	++++	++++	+++	+++	+++	++	+	-
As <sub>5</sub>	++++	++++	+++	+++	+++	++	+	-
As <sub>6</sub>	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-
As <sub>7</sub>	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-
As <sub>8</sub>	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-
Booster ครั้งที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>9</sub>	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+
As <sub>10</sub>	++++	++++	++++	+++	++	++	+	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดปฏิกิริยา                    +++ เกิดปฏิกิริยาค่อนข้างมาก  
 + เกิดปฏิกิริยาเล็กน้อย                    +++++ เกิดปฏิกิริยาสูงสุด  
 ++ เกิดปฏิกิริยาปานกลาง                As = antiserum ครั้งที่ 1....10

### ตารางที่ 3

ผลการตรวจสอบคุณภาพ antiserum โดยวิธี Slide precipitation test ด้วย antigen จากพืชทดสอบ *D. picta*

จำนวนครั้งที่ เจาะเลือด	Antiserum dilution							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
As <sub>1</sub>	++	+	-	-	-	-	-	-
As <sub>2</sub>	++	+	-	-	-	-	-	-
As <sub>3</sub>	++	+	-	-	-	-	-	-
Booster ครั้งที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>4</sub>	++++	++++	+++	++	++	+	-	-
As <sub>5</sub>	++++	++++	+++	++	++	+	-	-
As <sub>6</sub>	++++	++++	+++	++	++	+	-	-
As <sub>7</sub>	++++	++++	+++	++	++	+	-	-
As <sub>8</sub>	++++	++++	+++	++	++	+	-	-
Booster ครั้งที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>9</sub>	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	-
As <sub>10</sub>	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดปฏิกิริยา      +++ เกิดปฏิกิริยาค่อนข้างมาก  
 + เกิดปฏิกิริยาเล็กน้อย      +++++ เกิดปฏิกิริยาสูงสุด  
 ++ เกิดปฏิกิริยาปานกลาง      As = antiserum ครั้งที่ 1....10

**ผลการตรวจสอบคุณภาพ antiserum** โดยวิธีการตกตะกอนในของเหลวบนสไลด์ (Slide precipitation test) โดยการใช้ antigen จากสารแขวนลอยไวรัส ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ จากพืชอาศัยพลุฉลุ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองในครั้งที่ 1-3 ( $As_1$ - $As_3$ ) โดยการอ่านค่า antiserum ที่เจือจางในสารละลายความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อยและความเข้มข้นน้อยสุด ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อ antigen พบว่า antiserum ครั้งที่ 1-3 มีความเข้มข้นเท่ากับ 1:4 ( $As_1$ -  $As_3$  มีค่า titer เท่ากับ 1:4 )

Booster ครั้งที่ 1 ด้วย antigen เชื้อ DMV จากพืชอาศัย *D.picta* พบว่า antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองในครั้งที่ 4-8 สัตว์ทดลองจะสร้าง antibody เพิ่มขึ้นเป็น 1:64 ( $As_4$  -  $As_8$  มีค่า titer เท่ากับ 1:64)

Booster ครั้งที่ 2 ด้วย antigen เชื้อ DMV จากพืชอาศัย *D.picta* พบว่า antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองในครั้งที่ 9 ( $As_9$ ) จะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 1:128 และ  $As_{10}$  antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองปรากฏว่าความเข้มข้นของ antiserum ลดลงมาที่ 1:64 (ดังตารางที่ 4)

**ผลการตรวจสอบปริมาณ antiserum** โดยวิธีการตกตะกอน ในของเหลวบนสไลด์ (Slide precipitation test) antigen จากพืชอาศัยพลุฉลุ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบว่าจาก antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองในครั้งที่ 1-3 ( $As_1$ - $As_3$ ) โดยการอ่านค่าจาก antiserum ที่เจือจางในสารละลายจากความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อยและความเข้มข้นน้อยสุด ที่สามารถเกิดปฏิกิริยาต่อ antigen พบว่า antiserum ครั้งที่ 1-3 มีความเข้มข้นเท่ากับ 1:2 ( $As_1$ - $As_3$  มีค่า titer เท่ากับ 1:8)

Booster ครั้งที่ 2 ด้วย antigen เชื้อ DMV จากพืชอาศัย *D.picta* พบว่า antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองในครั้งที่ 9 ( $As_9$ ) จะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 1:32 และ  $As_{10}$  antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองปรากฏว่าความเข้มข้นของ antibody ลดลงที่ 1:16 (ดังตารางที่ 5)

### ตารางที่ 4

ผลการตรวจสอบคุณภาพ antiserum โดยวิธี Slide Precipitation test ด้วย antigen จากสารแขวนลอยไวรัส ที่ได้จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์จากพลาสมา

จำนวนครั้งที่ เจาะเลือด	Antiserum dilution							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
As <sub>1</sub>	+	+	-	-	-	-	-	-
As <sub>2</sub>	+	+	-	-	-	-	-	-
As <sub>3</sub>	+	+	-	-	-	-	-	-
Booster ครั้งที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>4</sub>	++++	++++	+++	++	+	-	-	-
As <sub>5</sub>	++++	++++	+++	++	+	-	-	-
As <sub>6</sub>	++++	++++	+++	++	+	-	-	-
As <sub>7</sub>	++++	++++	+++	++	+	-	-	-
As <sub>8</sub>	++++	++++	+++	++	+	-	-	-
Booster ครั้งที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>9</sub>	++++	++++	+++	++	++	+	-	-
As <sub>10</sub>	++++	+++	+++	+	-	-	-	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดปฏิกิริยา                    +++ เกิดปฏิกิริยาอ่อนข้างมาก  
 + เกิดปฏิกิริยาเล็กน้อย                    +++++ เกิดปฏิกิริยาสูงสุด  
 ++ เกิดปฏิกิริยาปานกลาง                    As = antiserum ครั้งที่ 1....10

ตารางที่ 5

ผลการตรวจสอบคุณภาพของ antiserum โดยวิธี Slide precipitation test antigen จาก  
พืชอาศัยพลาซม

จำนวนครั้งที่ เจาะเลือด	Antiserum dilution							
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
As <sub>1</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>2</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>3</sub>	+	-	-	-	-	-	-	-
Booster ครั้งที่ 1	-	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>4</sub>	+++	++	+	-	-	-	-	-
As <sub>5</sub>	+++	++	+	-	-	-	-	-
As <sub>6</sub>	+++	++	+	-	-	-	-	-
As <sub>7</sub>	+++	++	+	-	-	-	-	-
As <sub>8</sub>	+++	++	+	-	-	-	-	-
Booster ครั้งที่ 2	-	-	-	-	-	-	-	-
As <sub>9</sub>	++++	+++	+++	++	+	-	-	-
As <sub>10</sub>	++++	+++	+++	+	-	-	-	-

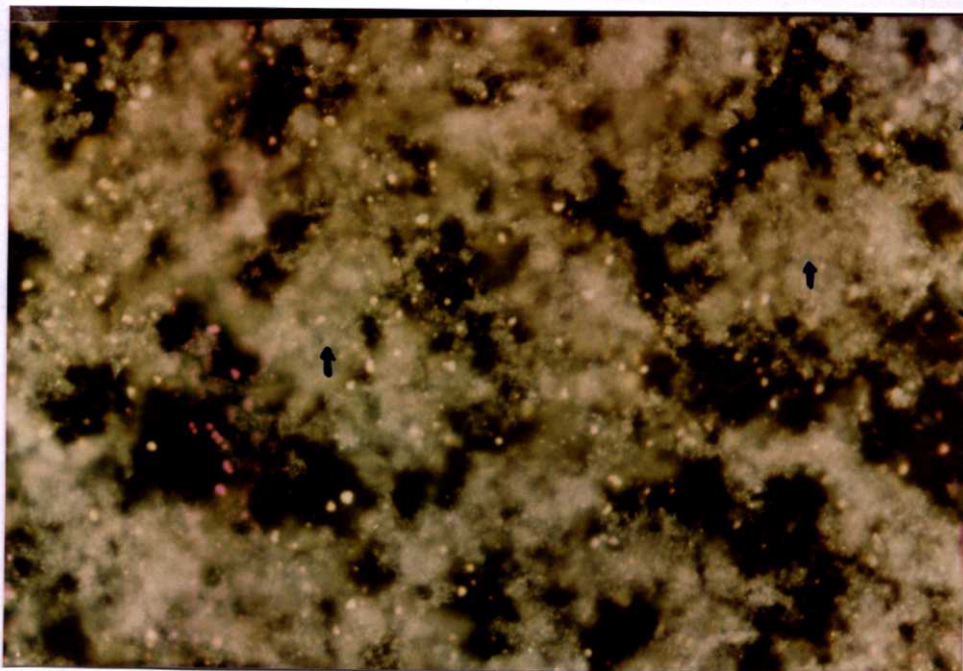
หมายเหตุ - ไม่เกิดปฏิกิริยา                    +++ เกิดปฏิกิริยาค่อนข้างมาก  
 + เกิดปฏิกิริยาเล็กน้อย                    ++++ เกิดปฏิกิริยาสูงสุด  
 ++ เกิดปฏิกิริยาปานกลาง                As = antiserum ครั้งที่ 1....10

ภาพที่ 16



แสดงผลการตรวจสอบปฏิกิริยาจากคุณภาพของเซรัมด้วยวิธี Slide precipitation test ภายใต้อัลดองจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่าโดยใช้ normal serum กับ antigen จะไม่เกิดปฏิกิริยา control (ศรชี้) คือเศษของตะกอนจากพีชทดสอบ (antigen)

ภาพที่ 17



แสดงถึงปฏิกิริยาการตรวจสอบคุณภาพของเซรุ่มด้วยวิธี Slide precipitation test ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่าแสดงถึงปฏิกิริยาของตะกอนที่เกิดขึ้นระหว่าง antiserum กับ antigen ตะกอนจากอนุภาคไวรัสมีลักษณะสีขาวคล้ายปุยเมฆมีระยางค์ยื่นออกมา (ศรีซี่) ตะกอนจากโปรตีนพืชส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นหลังจากปฏิกิริยาของไวรัส ลักษณะของตะกอนจะหนาที่บ

## 5.2 ผลการตรวจสอบโดยวิธี Ouchterlony double agar diffusion test คือ การซึมผ่านของกึ่งแข็งกึ่งเหลว (การตกตะกอนในวัน)

เนื่องจากอนุภาคของไวรัส DMV มีความยาวถึง 750 นาโนเมตร ดังนั้นผู้ทำการวิจัยจึงจำเป็นต้องผสมสาร SDS ปริมาณ 0.5% เพื่อให้อนุภาคของไวรัสเกิดการแตกหัก เพื่อการซึมผ่านที่มีประสิทธิภาพจากการศึกษาพบว่าที่ dilution 1:128 ของการผลิต antiserum ครั้งที่ 9 ในการทำปฏิกิริยากับ antigen จากสารแขวนลอยไวรัสบริสุทธิ์ สามารถเกิดปฏิกิริยาเป็นตะกอนขาวขุ่น จาก dilution ของ antiserum กับสารละลาย PBS จากความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อยที่สามารถเกิดปฏิกิริยาจะอ่านค่า titer ของความเข้มข้น antiserum ที่จุดนั้น สำหรับวิธี Ouchterlony double agar diffusion test นี้จะได้ค่า titer ที่ 1:128 จาก antiserum ครั้งที่ 9

### ผลการตรวจสอบคุณภาพ antiserum จากสารแขวนลอยไวรัสที่ได้จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในพีชอาคัย *D. picta*

พบว่า antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 1-3 ( $As_1 - As_3$ ) พบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง dilution antigen กับ dilution antiserum จะไม่ชัดเจนนัก

Booster ครั้งที่ 1 ด้วยเชื้อ DMV จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในพีชอาคัย *D. picta* พบว่า antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 4-8 ( $As_4 - As_8$ ) พบปฏิกิริยาระหว่าง dilution antiserum กับสารแขวนลอยไวรัสที่ได้จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ *D. picta* ที่เกิดระหว่างหลุมขุ่นของ antigen กับ antiserum ที่ dilution เจือจางสุดและสามารถเกิดปฏิกิริยาจึงสามารถอ่านค่า titer ได้ที่ 1:64

Booster ครั้งที่ 2 ด้วยเชื้อ DMV จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในพีชอาคัย *D. Picta*

$As_9$  antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองพบว่า dilution ของ antiserum กับ antigen ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา โดยการตกตะกอนผ่านวันที่ dilution สูงสุด 1:128 และเป็นปฏิกิริยาที่ดีที่สุดสำหรับการตรวจสอบ antiserum DMV ในครั้งนี้

$As_{10}$  จะได้อ่านค่า titer 1:64 เป็นค่า titer ที่ลดลงจาก  $As_9$  เนื่องจากสัตว์ทดลองเริ่มแสดงอาการอ่อนแอต่อ antigen ที่เข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากสัตว์ทดลองเริ่มแสดงอาการผิดปกติที่กล่าวไว้ข้างต้น จึงเลิกเจาะเลือด

**ผลการตรวจสอบคุณภาพของ antiserum จาก antigen ในพืชอาศัย *D. picta***  
antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 1-3 (As<sub>1</sub>-As<sub>3</sub>) พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในได้วันระหว่าง dilution antiserum กับ dilution antigen จากพืชทดสอบ พบปฏิกิริยาเพียง 1:2 (ค่า titer=1:2)

Booster ครั้งที่ 1 ด้วยเชื้อ DMV จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในพืชอาศัย *D. picta* As<sub>4</sub> ถึง As<sub>8</sub> พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวันระหว่าง Ag กับ As มากขึ้น คือ 1:32 (ค่า titer=1:32)

Booster ครั้งที่ 2 ด้วยเชื้อ DMV จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในพืชอาศัย *D. picta* As<sub>9</sub> antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองพบว่า ที่ dilution ของ antiserum กับ antigen ที่สามารถเกิดปฏิกิริยา โดยการตกตะกอนผ่านวันที่ dilution 1:64 พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวัน แต่เมื่อ dilute เพิ่มขึ้นเป็น 1:128 จะไม่พบปฏิกิริยาดังกล่าว ดังนั้นค่า titer ครั้งนี้จะอ่านค่าได้เท่ากับ 1:64

As<sub>10</sub> พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวันระหว่าง Ag กับ As ลดลงเหลือ 1:32 (ค่า titer=1:32)

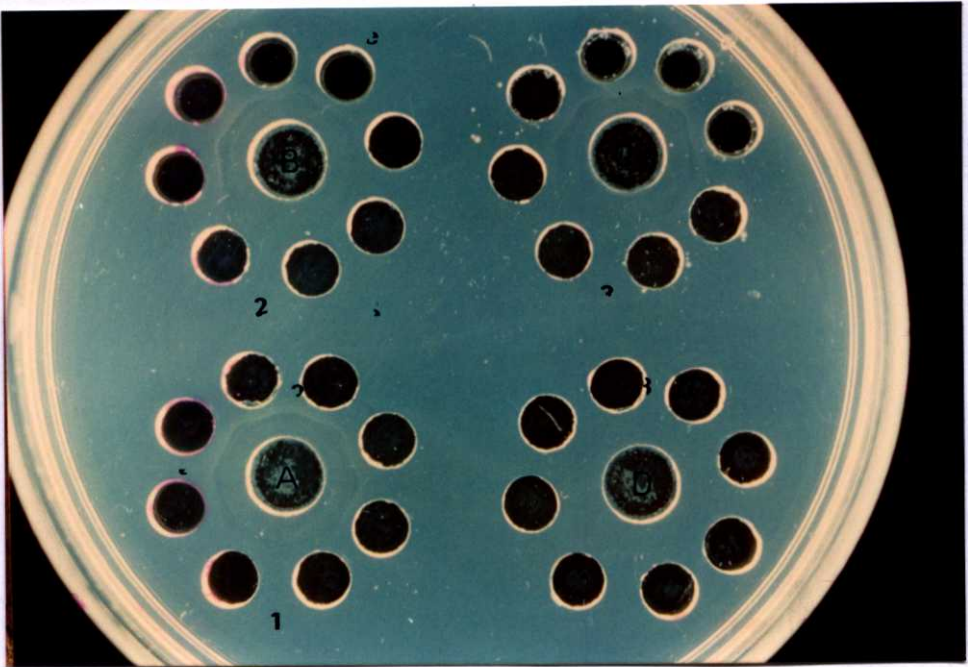
**ผลการตรวจสอบคุณภาพของ antiserum จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนพลาจูด**  
antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 1-3 (As<sub>1</sub>-As<sub>3</sub>) พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวันระหว่าง dilution serum กับ dilution antigen จากพืชทดสอบพบปฏิกิริยาเพียง 1:2 เนื่องจากที่ dilution 1:4 จะไม่พบปฏิกิริยา ดังนั้น ค่า titer ของ antiserum ครั้งที่ 1-3 จึงมีค่า titer เพียง 1:2

Booster ครั้งที่ 1 ด้วยเชื้อ DMV จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในพืชอาศัย พลาจูด antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 4-8 (As<sub>4</sub>-As<sub>8</sub>) พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวันระหว่าง dilution antiserum กับ dilution antigen เพิ่มขึ้นเป็น 1:32 ค่า titer=1:32

Booster ครั้งที่ 2 ด้วยเชื้อ DMV จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในพืชอาศัย พลาจูด antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 9 (As<sub>9</sub>) พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวันระหว่าง dilution antiserum กับ dilution antigen เพิ่มขึ้นเป็น 1:64 (ค่า titer = 1:64)

As<sub>10</sub> พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวันระหว่าง dilution antigen กับ dilution antiserum ลดลงเหลือ 1:32 (ค่า titer=1:32)

ภาพที่ 18



แสดงถึงการตรวจสอบคุณภาพเซรัม ด้วยวิธี Ouchterlony double agar diffusion test เพื่อศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง dilution ของ antiserum กับ antigen จากพืชอาศัย *D.picta* ที่เจือจาง 1:2 (พืชทดสอบ : สารละลาย) ระหว่างหลุม As กับ Ag

1,2,3 = antiserum ในการเจาะเลือดสัตว์ทดลองในแต่ละครั้ง

4 = normal serum dilution 1:2,1:4,1:8 (a,b,c,d) คือ (control)

A, B, C, D, = antigen จากพืชทดสอบ

a, b, c, d = 1:2, 1:4,1:8,... คือ dilution antiserum จากความเข้มข้นมากไปหาความเข้มข้นน้อย

## ผลการตรวจสอบคุณภาพ antiserum จาก antigen บนพืชอาศัยพลาซม

antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 1-3 ( $As_1$ - $As_3$ ) ไม่พบปฏิกิริยา จากการตกตะกอนภายในวัน

Booster ครั้งที่ 1 ด้วยเชื้อ DMV จากพืชอาศัยในพลาซม antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 4-8 ( $As_4$ - $As_8$ ) พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวันระหว่าง dilution antiserum กับ dilution antigen ปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็น 1:4 (ค่า titer=1:4)

Booster ครั้งที่ 2 ด้วยเชื้อ DMV จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ในพืชอาศัยพลาซม antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 9 ( $As_9$ ) พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวันระหว่าง dilution antiserum กับ dilution antigen ปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเป็น 1:32 (ค่า titer = 1:32) antiserum ที่ได้จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองครั้งที่ 10

$As_{10}$  พบปฏิกิริยาจากการตกตะกอนขาวขุ่นภายในวันระหว่าง dilution antiserum กับ dilution antigen ลดลงเป็น 1:16 (ค่า titer=1:16)

การเช็ค titer ทุกครั้ง ควรจะทำอย่างน้อย 2 วิธีการ เพื่อจะได้นำผลการตรวจสอบทั้ง 2 วิธีการมายืนยันเพื่อความมั่นใจถึงประสิทธิภาพและคุณสมบัติของเซรั่มก่อนสรุปผลการทดลอง เพื่อใช้ในการตรวจสอบไวรัสภาคปฏิบัติอย่างมีประสิทธิภาพ

### 5.3 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง antiserum และ antigen ในพืชอาศัย *D. picta* ด้วยวิธี ELISA

ผลการตรวจสอบพบว่า  $As_1$ - $As_3$  ที่เจือจาง ที่ 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 กับ antigen ที่เจือจาง 1:20 ไม่พบปฏิกิริยาจากการตรวจสอบโดยวิธีการทาง ELISA สาเหตุเนื่องจากค่า titer ของ antiserum ของเชื้อ DMV มีค่า titer ที่ต่ำมาก จากการตรวจสอบด้วยวิธี slide precipitation test ซึ่งมีค่า titer เพียง 1:8 โดยใช้ antigen จากสารละลายแขวนลอยเชื้อไวรัสจากพืชอาศัย *D. picta*

$As_4$ - $As_8$  จาก antiserum ที่เจือจาง 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 จาก antigen ที่เจือจางที่ 1:20 จาก *D. picta* ผลปรากฏว่า antiserum ที่ 1:10-1:500 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum DMV

As<sub>9</sub> จาก antiserum ที่เจือจางที่ 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 เพื่อทำการศึกษากิจกรรมของแอนติบอดีในการทำให้เกิดสีกับ antigen ค่าเจือจาง 1:20 พบว่าที่ antiserum DMV ที่ 1:10-1:1,000 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum DMV

As<sub>10</sub> จาก antiserum ที่เจือจางที่ 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 กับ antigen ที่เจือจาง ที่ 1:20 จาก *D. picta* พบว่าที่ dilution antiserum ที่ 1:10-1:500 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum DMV

#### 5.4 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง antiserum และ antigen บนพืชอาศัย *D. picta*

ผลการตรวจสอบจากตารางที่ 6 พบว่า As<sub>1</sub>-As<sub>3</sub> ของ dilution antiserum ที่ 1:10, 1:100, 1: 500 และ 1:1,000 กับ dilution antigen 1:20 ไม่พบปฏิกิริยาจากการตรวจสอบโดยวิธีทาง ELISA สาเหตุเนื่องจากค่า titer ของ antiserum ของเชื้อ DMV มีค่า titer ที่ต่ำมาก จากการตรวจสอบด้วยวิธี precipitation test ซึ่งมีค่า titer เพียง 1:8 โดยใช้ antigen จากสารละลายแขวนลอยเชื้อไวรัสจากพืชอาศัย *D. picta*

As<sub>4</sub>-As<sub>8</sub> จาก dilution ของ antiserum ที่ 1:100, 1:500 และ 1:1,000 กับ dilution antigen ที่ 1:20 จาก *D. picta* ผลปรากฏว่า dilution antiserum ที่ 1:10-1:500 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum DMV

As<sub>9</sub> จาก dilution ของ antiserum ที่ 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 เพื่อทำการศึกษากิจกรรมของแอนติบอดีในการทำให้เกิดสีกับ dilution antigen 1:20 พบว่าที่ dilution antiserum DMV ที่ 1:10-1:1,000 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum DMV

As<sub>10</sub> จาก dilution ของ antiserum ที่ 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 กับ dilution antigen 1:20 จาก *D. picta* พบว่าที่ dilution antiserum ที่ 1:10-1:500 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum DMV (ตารางที่ 6)

#### 5.5 ผลการตรวจสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมระหว่าง antiserum กับ antigen ในพืชอาศัยพลงลุ โดยวิธี Indirect ELISA

ผลจากตารางที่ 7 พบว่าการตรวจสอบ As<sub>1</sub>-As<sub>3</sub> ของ dilution antiserum ที่ 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 กับ dilution antigen ที่ 1:20 ปรากฏว่าไม่พบปฏิกิริยา จากการตรวจสอบ

โดยวิธีทาง ELISA เนื่องจากค่า titer ของ serum DMV ต่ำมาก จากการตรวจสอบด้วยวิธี Slide precipitation test จาก purified virus บนพีชออคัยพลาซม

As<sub>4</sub>-As<sub>8</sub> ของ dilution antiserum ที่ 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 กับ dilution anantigen ที่ 1:20 จาก พลาซม พบว่า ที่ dilution antiserum จาก 1:10-1:500 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum DMV

As<sub>9</sub> จาก dilution ของ antiserum ที่ 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 กับ dilution anantigen ที่ 1:20 จาก พลาซม พบว่า ที่ dilution antiserum จาก 1:10 - 1:500 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum จาก 1:10-1:500 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum DMV

As<sub>10</sub> จาก dilution antiserum ที่ 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 กับ dilution antigen ที่ 1:20 จาก พลาซม พบว่า ที่ dilution antiserum จาก 1:10-1:500 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum จาก 1:10-1:500 สามารถเกิดสีจากการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen กับ antiserum DMV

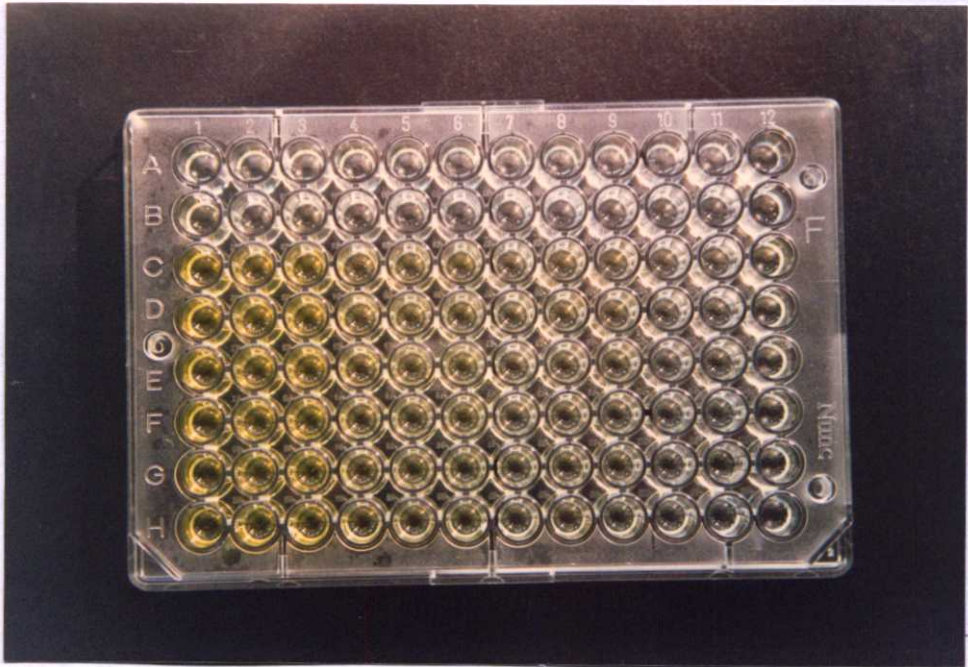
### ตารางที่ 6

ผลการตรวจคุณสมบัติ antiserum โดยวิธี indirect ELISA ด้วย antigen จากพืช  
อาศัย *D. picta*

จำนวนครั้งที่ เจาะเลือด	Antiserum dilution			
	1:10	1:100	1:500	1:1,000
As <sub>1</sub>	-	-	-	-
As <sub>2</sub>	-	-	-	-
As <sub>3</sub>	-	-	-	-
Booster ครั้งที่ 1	-	-	-	-
As <sub>4</sub>	+++	++	+	-
As <sub>5</sub>	+++	++	+	-
As <sub>6</sub>	+++	++	+	-
As <sub>7</sub>	+++	++	+	-
As <sub>8</sub>	+++	++	+	-
Booster ครั้งที่ 2	-	-	-	-
As <sub>9</sub>	++++	+++	++	+
As <sub>10</sub>	+++	++	+	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดปฏิกิริยา      +++ เกิดปฏิกิริยาค่อนข้างมาก  
 + เกิดปฏิกิริยาเล็กน้อย      +++++ เกิดปฏิกิริยาสูงสุด  
 ++ เกิดปฏิกิริยาปานกลาง      As = antiserum ครั้งที่ 1....10

ภาพที่ 19



แสดงถึง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง antiserum กับ antigen จากการตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ที่ dilution antiserum 1:10, 1:100, 1:500 และ 1:1,000 กับ dilution antigen ที่ 1:4 บนพืชอาศัย *D. picta*

แถว A1-A12 คือ buffer control

แถว B1-B12 คือ normal serum control

แถว C1-C3 จนถึง H1-H3 คือ dilution antiserum ที่ 1:10

แถว C4-C6 จนถึง H4-H6 คือ dilution antiserum ที่ 1:100

แถว C7-C9 จนถึง H7-H9 คือ dilution antiserum ที่ 1:500

แถว C10-C12 จนถึง H10-H12 คือ dilution antiserum ที่ 1:1,000

## ตารางที่ 7

ผลการตรวจสอบคุณภาพ antiserum โดยวิธี indirect ELISA ด้วย antigen จากพืช  
อาศัยพลาซมิด

จำนวนครั้งที่ เจาะเลือด	Antiserum dilution			
	1:10	1:100	1:500	1:1,000
As <sub>1</sub>	-	-	-	-
As <sub>2</sub>	-	-	-	-
As <sub>3</sub>	-	-	-	-
Booster ครั้งที่ 1	-	-	-	-
As <sub>4</sub>	+++	++	+	-
As <sub>5</sub>	+++	++	+	-
As <sub>6</sub>	+++	++	+	-
As <sub>7</sub>	+++	++	+	-
As <sub>8</sub>	+++	++	+	-
Booster ครั้งที่ 2	-	-	-	-
As <sub>9</sub>	+++	++	+	-
As <sub>10</sub>	+++	++	+	-

หมายเหตุ - ไม่เกิดปฏิกิริยา      +++ เกิดปฏิกิริยาค่อนข้างมาก  
+ เกิดปฏิกิริยาเล็กน้อย      ++++ เกิดปฏิกิริยาสูงสุด  
++ เกิดปฏิกิริยาปานกลาง      As = antiserum ครั้งที่ 1....10

การผลิตเซรุ่ม DMV เชื้อสาเหตุโรคต่างเหลืองของไม้ประดับสกุล *Dieffenbachia* sp.  
เพื่อทำการศึกษาร่วมเทียบกับต่างประเทศพบว่า คุณภาพของเซรุ่มได้คุณภาพค่อนข้างต่ำ

กว่าเล็กน้อย คือ ได้ค่า titer สูงสุด 1:256 จากรายงานทราบว่าในต่างประเทศมีการผลิตเซรุ่ม DMV ได้ค่า titer สูงสุด 1:512 (Abo EL-Nil *et al.*, 1977) สาเหตุอาจเป็นเพราะพีชอาศัยที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส ก่อนนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ผู้วิจัยคัดเลือก *D. picta* ซึ่งเป็นพีชที่หาได้ง่าย และสามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ขยายพันธุ์ง่าย ในขณะที่ในรายงานของ Chasem และ Zettler (1982) ใช้ *P. selloum* ซึ่งเป็นพีชที่เหมาะสมกว่า เนื่องจากเชื้อสามารถทวีจำนวนได้มาก แต่ค่อนข้างหาเมล็ดในประเทศไทยได้ยาก ซึ่งต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศในราคาแพง เนื่องจากต้น *P. selloum* ที่ขายในตลาดไม้ประดับเมืองไทยยังจัดอยู่ในกลุ่มพีชมีราคา

## บทที่ 4

### สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการศึกษา

การศึกษาเชื้อ dasheen mosaic virus บนไม้ประดับวงศ์ *Araceae* สาเหตุโรคต่างเหลือของไม้ประดับ จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาถึงเชื้อสาเหตุ ตามแหล่งปลูก (nursery) จากการสุ่มสำรวจในเขตกรุงเทพฯ และ ปริมาณผลเพื่อทำการศึกษาที่ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และห้องปฏิบัติการกลางมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อศึกษาข้อมูลและการผลิตเซรุ่มที่ใช้ในการตรวจสอบอนุภาคของไวรัสเชื้อสาเหตุที่สะควกรวดเร็วและแม่นยำ ดังผลการศึกษาพอสรุปได้ดังนี้

จากการเก็บตัวอย่างไม้ประดับวงศ์ *Araceae* เช่น *Dieffenbachia picta*, พลูดุ *Snowdrop*, *Colocasia* (บอนสี) *philodendron* ที่แสดงอาการของโรคไวรัส และโรคที่คล้ายไวรัส เช่น อาการต่างเหลือ เส้นใบขาวขีด และอาการยอดหงิกงอต้นแคระแกรน จากนั้นนำเข้าห้องปฏิบัติการ เพื่อการตรวจสอบด้วยวิธี Immunoelectron microscope (IEM) โดยการใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยาร่วมกับการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ด้วยวิธี leaf dip technique, derrick และ decorate จากการตรวจสอบขั้นแรกพบ อนุภาคของไวรัสเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) เป็นเชื้อสาเหตุที่มีความยาว 750 นาโมเมตร ลักษณะตัวยาวคดงอคล้ายเส้นด้าย (flexuous rod) จัดอยู่ใน potyvirus group

การศึกษาพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุ โดยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้น (sap transmission) บนพืช ทดสอบทั้ง 4 วงศ์ ได้แก่ *Chenopodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Leguminosae*, และ *Solanaceae* ในโรงเรือนกันแมลงที่อุณหภูมิปกติ ด้วยน้ำคั้นโดยวิธีกล ใช้ผง Celite ปริมาณ 2% ในการทำให้พืชทดสอบเกิดบาดแผล ผลปรากฏว่าไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุบนพืชทดสอบทั้ง 4 ชนิด ดังนั้นวิธีการทำให้เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ จึงทำการศึกษาโดยเปรียบเทียบระหว่างพืชอาศัย

*D. picta* กับพลาซม โดยการใช้สารเคมี chloroform กับ carbon tetrachloride อัตราส่วน 1:1 และ การใช้สารเคมี PEG (polyethylene glycol) 8% เป็นตัวทำให้อนุภาคของไวรัสตกตะกอนโดยใช้วิธีผสมลงในน้ำคั้นของพืชทดสอบทั้ง 2 ชนิด พบว่าในน้ำคั้นของพืชอาศัย *D. picta* จะมีสีเขียวอ่อน และในน้ำคั้นของพลาซมมีสีเหลืองอ่อน จากนั้นจึงนำน้ำคั้นทั้ง *D. picta* และพลาซม ผ่านสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 10% และ 20% ที่รองอยู่ก้นหลอดผ่านเครื่องหมุนเหวี่ยง centrifuge แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเพื่อตรวจสอบอนุภาคของไวรัส พบว่าตะกอนของ *D. picta* ที่ผ่านชั้นน้ำตาล 10% พบอนุภาคไวรัสประมาณ 25-40 อนุภาคต่อ 1 หนากล้อง และในพลาซม พบอนุภาคไวรัสประมาณ 10-25 อนุภาคต่อ 1 หนากล้อง แต่ทั้งสองตัวอย่างพบสิ่งสกปรกเจือปนอยู่ค่อนข้างมาก เมื่อเทียบกับการผ่านสารละลายน้ำตาล 20% ที่รองก้นหลอด จาก *D. picta* และพลาซมพบอนุภาคที่สะอาดและบริสุทธิ์ขึ้น อนุภาคของไวรัสค่อนข้างสมบูรณ์ ปริมาณและจำนวนของอนุภาคไวรัสต่อหนึ่งหนากล้องยังคงพบเท่าเดิมแต่เป็นที่น่าสังเกตว่าในตัวอย่างพลาซมจะพบอาการจากการเข้าทำลายของโรคอย่างชัดเจน แต่เมื่อแยกไวรัสให้บริสุทธิ์แล้ว กลับพบอนุภาคของเชื้อสาเหตุของโรคน้อยกว่าพืชอาศัย *D. picta* ซึ่งแสดงอาการและการเข้าทำลายของโรคเหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะภายนอกจะเห็นว่าพลาซมพบอาการจากการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุรุนแรงกว่า แต่ใน *D. picta* พบอนุภาคของเชื้อสาเหตุปริมาณมากกว่าทั้งที่น้ำหนักและปริมาตรเท่ากัน

ดังนั้นจึงเลือกพืชอาศัย *D. picta* เป็นตัวแทนในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อการผลิตเซรุ่ม โดยนำสารแขวนลอยไวรัสไปฉีดเข้าสัตว์ทดลอง ใช้กระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ เพศเมีย อายุ 2 เดือน โดยการเลือกฉีด 2 วิธี ร่วมกันคือ Intramuscular (I/M) การฉีดเข้ากล้ามเนื้อที่บริเวณสะโพกกับวิธี Intrascutaneous (I/S) คือการฉีดเข้าใต้ผิวหนังรวมทั้งหมด 4 ครั้ง หลังจากนั้น 10 วัน จึงเริ่มเจาะเลือดครั้งที่ 1 โดยงดการให้น้ำและอาหารครึ่งวันก่อนการเจาะเลือด เพื่อให้ปริมาณเซรุ่มในเลือดมีความเข้มข้นและมีประสิทธิภาพสูงสุด จากนั้นจึงตรวจสอบคุณภาพเซรุ่มทุกครั้งหลังการเจาะเลือดโดยวิธี Slide precipitation test คือการตกตะกอนในของเหลวบนสไลด์และวิธี Ouchterlony double agar diffusion test คือการซึมผ่านของกึ่งแข็งกึ่งเหลว (การตกตะกอนผ่านวุ้น) และการตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) จากการเจาะเลือดสัตว์ทดลองทั้งหมด 10 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน พบว่า antiserum จากการเจาะเลือดครั้งที่ 9 ( $A_{50}$ ) มีความเข้มข้นของเซรุ่มสูงสุดที่ 1:256 (ค่า titer = 1:256) จากการตรวจสอบด้วยวิธี Slide precipitation test ใช้ antigen จากการแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ วิธี Ouchterlony double agar diffusion test ได้ค่า titer สูงสุด 1:128 และวิธีการตรวจ

สอบด้วย ELISA ซึ่งใช้ antigen จากพืชทดสอบ *D. picta* ได้ความเข้มข้นที่ระดับของเซรัม 1:1,000

### ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่า โรคที่เป็นปัญหาสำคัญของไม้ประดับของวงศ์ *Araceae* สาเหตุของอาการต่างเหลืองและแคระแกรน คือเชื้อ *dasheen mosaic virus* ซึ่งส่งผลกระทบต่อพันธุกรรม การเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์เป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากไม้ประดับดังกล่าวจะขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ แต่อาศัยการปักชำและแยกหน่อ จึงเป็นสาเหตุของการแพร่ระบาด จากการศึกษพบว่า เชื้อสาเหตุสามารถเจริญและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็ว ในที่มีอุณหภูมิค่อนข้างเย็น และยังพบว่า พืชทดสอบที่ปลูกภายในโรงเรือนปรับอากาศจะสามารถตรวจสอบพบ อนุภาคของเชื้อสาเหตุปริมาณที่มากกว่าพืชที่ปลูกในโรงเรือนอุณหภูมิปกติ เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งยังไม่มีวิธีการรักษา ดังนั้นในแง่ของการป้องกันกำจัดที่ดีที่สุดคือ การตรวจสอบแม่พันธุ์หรือท่อนพันธุ์ การตรวจสอบเชื้อไวรัสที่รวดเร็วและแม่นยำ โดยการใช้เทคนิคทางเซรัมวิทยาจัดเป็นวิธีการหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้เพื่อให้แน่ใจว่าแม่พันธุ์หรือท่อนพันธุ์ของไม้ประดับที่จะนำมาทำการปักชำ การตอนกิ่งที่หรือการขยายพันธุ์ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้ปลอดภัยจากโรคไวรัส อันเป็นการยับยั้งการแพร่ระบาดของเชื้อได้อย่างมากและมีประสิทธิภาพที่สุด

## เอกสารอ้างอิง

- ฤทัย สกกุลแรงรุ่ง และ วัฒนะ พันธุ์ม่วง,2532. การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี การประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีในห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.47-63 หน้า.
- ธีระ สูตะบุตร,2522. วิสาวิทยาเบื้องต้นพืช. ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.106 หน้า.
- ณรงค์ โฉมฉาย,2525. เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับในเมืองไทย สำนักพิมพ์สุริยบรรณ มูลนิธิแห่งสภาคริสตจักรแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ. 371-377 หน้า.
- ปราณี ฮัมเมอลิงค์,2526. หนังสือบทปฏิบัติการวิชา ร.498 (เซรุ่มวิทยา), ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.70 หน้า.
- ปราณี ฮัมเมอลิงค์,2530. เอกสารประกอบการอบรมซีรัมวิทยาเฉพาะด้าน Immuno electron microscope (IEM), ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พัฒนา ศรีฟ้า,2529. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส (ร.442), ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 60 หน้า.
- ยุพา มงคลสุข, 2527. เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเบื้องต้น, เอกสารอบรมของศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ และห้องปฏิบัติการกลาง บางเขน, สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- วิทย์ เทียงบุญธรรม, 2536. พจนานุกรม ไม้ดอกไม้ประดับเมืองไทย, สำนักพิมพ์สุริยบรรณ มูลนิธิแห่งสภาคริสตจักรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ. 93-96 หน้า
- วรวรรณ ศักดิ์วงศ์.2528. การวินิจฉัยโรคใบหงิกฝ้ายด้วยเทคนิคทางซีรัมวิทยาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 42-64 หน้า.
- สุวรรณ เลิศสมิตินันท์. 2529. ความสัมพันธ์ระหว่างการถ่ายทอดโรคใบม้วนและผลผลิตของมันฝรั่ง.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ 16-20หน้า.

- อุดม พำรุ่งแสง, 2527. การตรวจสอบเชื้อไวรัสในเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาว และการรับรอง  
คุณภาพเมล็ดพันธุ์ที่ปราศจากโรค. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตร-  
ศาสตร์, กรุงเทพฯ. 23-39 หน้า.
- อุไร ศรีเกียรติเด่น, 2533. แนวทางการผลิตต้นมันฝรั่งปราศจากเชื้อไวรัส โครงการเพาะ  
เลี้ยงเซลล์จากต้นมันฝรั่งที่มีเชื้อ potatovirus x. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 73-81 หน้า.
- Abo El-nil, M.M., Zetter, 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., Zetter, F.W. and E.H. Hiebert. 1977. Purification, Serology, and Some  
Physical Properties of Dasheen Mosaic Virus, *Phytopathology* 67 :1445-1450.
- Alconero, R., 1972. Host Water Treatments of Corns of *Xanthosoma* spp. Infected with  
Dasheen Mosaic Virus *Plant Disease* 56 : 320-321.
- Amos, W.M.G. 1981. Immunology. Butterworths and Co., Ltd., London, 188 p.
- Ball, E.M., 1974. Serological tests for the identification of plants viruses. *Plant Virol*  
*Committee, Phytopathol. Soc. St. Pavl. Minnesota*. 31 p.
- Bos, L., 1970. Symptoms of Virus Disease in Plants. Oxford and IBM Publishing Co. Delhi,  
India. 206 P.
- Chase, A.R., and F.W. Zettler. 1982. Dasheen Mosaic Virus infection of *Dieffenbachia*  
Cultivars. *Plant Disease*. 66 : 891-893.
- Chegdia, M.M., and K.F. Gerasimosa. 1979. Serological diagnosis of potato virus Y. *Rev.*  
*Plant Pathol.* 60 (s) : 245.
- Debrot, E. A and A., Ordosgoitti. 1974. Dasheen mosaic virus infection of *Colocasia* and  
*Xanthosoma* in *Venezuela*. *Plant Dis.* 58 : 1032-1034.
- Derrick, R.S. 1972. Immuno-specific grids for electron microscopy of *plant viruses*.  
*Phytopathology* 62 : 753. (Abstr.)
- Derrick, 1973 a. Delectrio and identification of plant viruses by serologically-specific electron  
microscopy. *Phytopatlogy*. 63 : 441 (Abstr.)
- Derrick, 1973 b. Quantitative assay for plant virus using serologically specific electron  
microscopy. *Virology*. 56 : 652-653.

- Girard, J.C., J. Giannotti, P. Baudin, and M. Chatenet. 1980. Mise en evidence de Dasheen mosaic virus dans des macabos (*Xanthosoma sagittaeifolium*) provenant du Cameroun. *Agron. Trop.* 35:30-34.
- Hartman, R.D. 1974. Dasheen mosaic virus and other phytopathogens eliminated from caladium, taro, and cocoyam by culture shoot tips. *Phytopathology*. 64 : 237-240.
- Hartman, R.D., and F.W. Zettler. 1974. Effects of Dasheen mosaic virus on yields of *Caladium*, *Dieffenbachia*, and *Philodendron* *Phytopathology*, 64 : 768.
- Hill, S.A., and D.M., Wright. 1980. Identification of Dasheen mosaic virus in *Dieffenbachia picta* and *Xanthosoma helliborifolium* by immune electron microscopy, *Pl Pathol.* 29 : 143-144.
- Knauss, J.F., 1976. A. Tissue culture method for producing *Dieffenbachia picta* CV. Perfection free of fungus and bacteria. *Prpc. Florida State Hort. Soc*89 : 293-296.
- Kohler, G. and Milsstein, 1975. Continuous cultures of fused cell secreting antibody of predefine specificity. *Nature (London)* : 256-296.
- Korpraditskul, P., 1979. Untersuchungen Zur differenzierung von isolaten des eymbidium mosaic virus mit serologischen verfahren unter immunosorbent assay (ELISA). *Dissertation Zur Erlangung des Doktorgrades der Landwirtschaftlichen Fakultät der George-August Universität der Göttingen.* 128 P.
- Kositratana, W., L.G. Weathers, and D.J. Gumpf. 1983. Dasheen mosaic virus in chinese evergreen plants in California *Phytopathology*. 73 : 791.
- Milne, P.G. and E. Luisoni. 1977. Rapid immune-electron microscopy of virus preparations, pp.265-281. In K. Maromorsch and H. Koprowki (eds.). *Method of virology*, Academic Press, New York.
- Morales, F.J., and F.W. Zettler. 1977. Aphid transmission Characteristics of Dasheen Mosaic Virus. *Fitopatol Colombiana*. 6:134.

- Paludan, N., and J. Begtrup. 1982. *Dieffenbachia maculata* (Lodd.) G. Don. Virus attack in Danish culture, survey and diagnosis, Danish Res. Serv. for plant Report No. 1612 : 399-404.
- Rana, G.L., C. Vovlas, and F. W. Zettler. 1983 Manual transmission of Dasheen mosaic virus from *Richardia* to nonaraceous hosts. *Plant Dis.* 67 : 1121-1122.
- Robert, st. Milne 1990. Immunoelectron microscopy for virus identification. *Electron microscopy of plant pathogens.* 7 : 88.
- Shukla, D.D., and K.W. Gough. 1979. The use of protein A, from *Staphylococcus aureus*, in immune electron microscopy for detecting plant virus particles. *J. Gen Virol,* 45 : 533-536.
- Tompkin, G.M. and M.W. Gardner. 1934. Spotted Wilt of Head Lettuce *Phytopathology.* 24 :1135--1136.
- Toompkins, C.M. and M.W. Gardner. 1934. Spotted Wilt of Head Lettuce *phytopathology* 24 : 1135-1136.
- Tooyama, a. 1975. Expression of mosaic symptoms on taro plants from Dasheen mosaic virus infected corms. *Ann. Phytopathol . Soc. Japan.* 41 : 504-507.
- Verplancke, G., 1930. Une Moladie "A virus Filteraut" des Anthurium. *Compt. Rend.Soc. Biol.* 103 : 524-526.
- Wisler, G. C., F.W. Zettler, R.D. Hartman, and J.J.McRitchie. 1978. Dasheen mosaic virus infections of *philodendrons* in florida. *proc. Florida State hort. Soc.* 91 :237-240.
- Zettler,F.W.,M.M. Abo El-Nil, and R.D. Hartman. 1978. Dasheen mosaic virus. Commonwealth Mycologied Insstitute Assoc. Appl. Biol. Descriptions of Plants virus No. 191. Kew, surrey, England.
- Zettler, F.W., J.F. Knauss, M.E. Taylor, Kanuss, R.D. Hartman, and A.R. Chose. 1980. Evaluation of *Dieffenbachia maculata* 'Perfection' plants free of Dasheen mosaic virus. *Hort.* 110 : 256-263.

ภาคผนวก

## 1. สารเคมีที่ใช้

- 1.1 Sodium citrate
- 1.2 sodium sulfite
- 1.3 disodium ethylenediaminetetra acetate ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ )
- 1.4 chloroform
- 1.5 carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ )
- 1.6 polyethylene glycol (PEG)
- 1.7 tris-HCl
- 1.8 2 mercapto ethanal
- 1.9 cesium chloride (CsCl)
- 1.10 sodium dodecyl sulfate (SDS)
- 1.11 ethyl alcohol
- 1.12 sugar
- 1.13 dicthanolamine
- 1.14 formvar
- 1.15 sodium azide ( $\text{NaN}_3$ )
- 1.16 monopotassium phosphate ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 1.17 monosodium phosphate
- 1.18 nobel agar
- 1.19 sodium chloride (NaCl)
- 1.20 distilled water (DW)

### การเตรียมสารเคมี

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (phosphate buffer saline) ประกอบด้วย 1 M pH 7.0

NaCl	8.0	กรัม
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2	กรัม
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.44	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$\text{NaN}_3$	0.2	กรัม
$\text{H}_2\text{O}$	1,000	ml.

### สารที่ใช้ทำ supported film

Supported film ทำหน้าที่รองรับตัวอย่างที่อยู่บนกริด ซึ่งเป็นวัตถุที่รองรับตัวอย่างที่นำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ transmission formvar ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย

formvar	2	เปอร์เซ็นต์
ethylene dichloride	100	ml.

### สารละลายเคมี coating buffer pH 9.6 ประกอบด้วย

$\text{Na}_2\text{CO}_3$	1.59	กรัม
$\text{NaHCO}_3$	2.93	กรัม
$\text{NaN}_3$	0.2	กรัม
$\text{H}_2\text{O}$	1,000	ml.

substrate buffer (add HCl to give pH 9.8) per litre ประกอบด้วย

Diethanolamine	97	ml.
$\text{NaN}_3$	0.2	กรัม
$\text{H}_2\text{O}$	800	ml.

### PBS - T (pH 7.4) per litre

NaCl	8.0	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2.9	กรัม
KCl	0.2	กรัม
NaN <sub>3</sub>	0.2	กรัม
Tween 20	0.5	ml.
H <sub>2</sub> O	1,000	ml.

### conjugate buffer ประกอบด้วย

PBS-Tween + 2% PVP-40t (Polyvinyl pyrolidone) + 2% egg albumin ovalbumin

### วิธีการ เตรียมวุ้น ซึ่งมีส่วนผสม ดังนี้

Noble agar	0.85	%
NaCl	0.85	%
NaN <sub>3</sub>	0.1	%
SDS	0.5	%
BSA	2.0	%
ในน้ำกลั่น	100	มล.

## 2. การเตรียมสารย้อมสี

กริดที่ได้รับการเคลือบฟอรัมวาร์ 2 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนแล้ว นำไปทำลายประจุบนผิวหน้ากริด (Ion discharged) ด้วยเครื่อง ก่อนนำไปเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีลอยกริด

2.1 กรดฟอสโฟทังสติก (phosphotungstic acid-PTA) ใช้ PTA 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่น (Distilled Water-DW) ปรับ pH 7.0 ด้วย 1N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

2.2 ยูเรเนียมอะซิเตท (Uranyl acetate-UA) ใช้ UA 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH 5.6 (ปราณี, 2530)

### ประวัติผู้เขียน

นายชูศักดิ์ แซ่พิมาย เกิดวันที่ 6 กรกฎาคม 2506 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (พืชศาสตร์) จากวิทยาลัยครูพระนคร ปีการศึกษา 2533 ทำงานในตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัยโครงการ“ผลิตท่อนพันธุ์มันฝรั่งปราศจากโรคไวรัส”ที่คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ และปี2533 ทำงานเป็นผู้ช่วยนักวิจัยในโครงการ “SERUM BANK” ที่กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ 10900