สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

อิทธิพลของฤดูกาลต่ออาการและปริมาณความเข้มข้นของ dsRNA ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายไม้ประดับบางชนิด

Influence of season on virus symptom and dsRNA concentration in some virus – infected ornamental plants

T098788

โดย

นางสาว ดวงใจ ขำพลกรัง
Miss Douangjai Khumphonekrang

ปพ.
ด1646
9545

เลขหมู่......................................
เลขทะเบียน.......98788
วัน,เดือน,ปี..................................

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2545

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ปริญญาตรี
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

อิทธิพลของฤดูกาลต่ออาการและปริมาณความเข้มข้นของ dsRNA ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายไม้ประดับบางชนิด

Influence of season on virus symptom and dsRNA concentration in some virus – infected ornamental plants

โดย

นางสาวดวงใจ ขำพลกรัง
Miss Douangjai Khumphonekrang

ได้รับพิจารณาเห็นชอบโดย

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

ภาควิชารับรองแล้ว

....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรเดช จันทรสร)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
วันที่..๒๗..เดือน..พ.ค......พ.ศ..๔๖.

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : **อิทธิพลของฤดูกาลต่ออาการและปริมาณความเข้มข้นของ dsRNA ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายไม้ประดับบางชนิด**

โดย : **นางสาว ดวงใจ ขำพลกรัง**

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา : .... 26 / พ.ค. / 2546

(ผศ. ดร. นวลพรรณ งามยี่สุ่น)

การศึกษาพืชไม้ประดับทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* " Snowdrop") กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) และฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) ในวงศ์ Araceae และไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) ในวงศ์ Liliageae ที่แสดงอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายตลอด 3 ฤดูกาล พบกลุ่มอาการดังนี้คือ อาการด่าง อาการหงิกงอบิดเบี้ยว อาการแคระแกรน และจุดด่างเหลือง โดยอาการมักจะเกิดกับใบอ่อนอย่างชัดเจนตลอดปี เมื่อนำน้ำคั้นของใบไม้ประดับทั้ง 5 ชนิดมาทดสอบปฏิกิริยา ELISA พบว่าไม้ประดับทั้ง 5 ชนิดถูกเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) เข้าทำลาย และเมื่อนำใบอ่อนของพืชทั้ง 5 ชนิดที่พบอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสทั้ง 3 ฤดู มาทำการตรวจสอบความเข้มข้นของเชื้อในแต่ละฤดูโดยเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ของเชื้อ (dsRNA extraction) พบว่าในช่วงฤดูฝนมีแนวโน้มว่าปริมาณความเข้มข้นของ dsRNA ของเชื้อในพืชที่เป็นโรคจะดีกว่าในฤดูหนาวและฤดูร้อน

ABTRACT

Title : Influence of season on virus symptom and dsRNA concentration in some virus – infected ornamental plants

By : Miss Douangjai Khumphongkrang

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Major field : Pest Management Technology

Advisor : N. Ngamyeesoon 26 / 5 / 2003

(Asst. Prof. Dr. Nualphan Ngamyeesoon)

Study of virus – like symptom in five ornamental plants named *Diffenbachia picta* "Snowdrop" , *Diffenbachia overstedii* , *Philodendron microstitum* , *Philodendron panduraeforme* in Araceae family and *Dracaena godseffiana* in Liliageae family was performed continuously for 3 seasons. Different kinds of symptoms were observed among these plants. Symptoms were mosaic, leaf distortion , chlorotic spots and stunting which showed clearly on young leaves, while there was little difference on symptom express during three seasons. The virus infected these ornamental plants was identified as dasheen mosaic virus (DMV) by ELISA test. In addition to, study of season that influenced viral – dsRNA concentration in plants was demonstrated by method of dsRNA extraction. The result showed that in rainy season the concentration tended to be highest.

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ ผศ ดร. นวลพรรณ งามยิ่สุ่น อาจารย์ที่ปรึกษาที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษพร้อมทั้งแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จเรียบร้อยและสมบูรณ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชที่ได้ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร สจล. (ADB) ที่ให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือ

ขอขอบคุณรุ่นพี่ปริญาโททุกท่านในส่วนของกลุ่มงานไวรัสที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในระหว่างการทำปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณบิดามารดาที่ให้ความอนุเคราะห์เกี่ยวกับค่าใช้จ่ายในการทำปัญหาพิเศษ ตลอดจนขอขอบคุณเพื่อนที่เป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

ดวงใจ ขำพลกรัง
พฤษภาคม 2546

สารบัญ

เนื้อเรื่อง **หน้า**

บทคัดย่อภาษาไทย …… i

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ …… ii

คำนิยม …… iii

สารบัญ …… iv

สารบัญตาราง …… v

สารบัญภาพ …… vi

คำนำ …… 1

การตรวจเอกสาร …… 3

อุปกรณ์และวิธีการ …… 11

ผลการทดลอง …… 20

สรุปผลและวิจารณ์ …… 38

เอกสารอ้างอิง …… 41

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงผลของฤดูกาลต่ออาการของไม้ประดับและผลการตรวจสอบโดยวิธี การสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA extraction) ของไม้ประดับทั้ง 5 ชนิด ในช่วงฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน............36

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. แสดงชุดสกัด Rneasy Mini Kit และอุปกรณ์ที่ใช้แยกสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ของเชื้อ........14
2. ชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า........14
3. อาการของใบสาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* "Snowdrop") แสดงอาการด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้มขอบแผลไม่แน่นอนและลักษณะใบบิดเบี้ยว........21
4. อาการของกวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ใบของกวักเงินแสดงอาการใบเป็นปื้นสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ผิวใบมีลักษณะเป็นคลื่นไม่เรียบ........21
5. อาการฤดูฝนและฤดูหนาวของไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) แสดงอาการใบเป็นจุดสีขาวอมเหลืองหรือสีเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วทั้งใบ........23
6. อาการฤดูร้อนของไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) ใบแสดงอาการจุดเป็นวงสีเหลืองขนาดใหญ่กระจายทั่วทั้งใบ........23
7. อาการของฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*)ใบมีลักษณะด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้มเกือบทั้งใบ ตามขอบใบมีลักษณะหงิกงอ ม้วนลง........25
8. อาการฤดูฝนและฤดูหนาวของฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) ใบมีอาการด่างเป็นจุดสีขาวอม เหลือง ขอบแผลสีเขียวเข้มกระจายทั่วใบ........25
9. อาการฤดูร้อนของฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) ใบมีอาการเป็นจุดสีเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วทั้งใบ บางจุดตรงกลางแผลมีอาการไหม้สีน้ำตาลอ่อน....26
10. แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาของไม้ประดับบางชนิดในวงศ์ Araceae และวงศ์ Liligaea........28
11. แสดง pattern ของ dsRNA band จากการแยกสกัดในช่วงฤดูฝนจากไม้ประดับในวงศ์ Araceae และวงศ์ Liligaeae ที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส........29
12. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของ dsRNA ของกวักเงิน (*Diffenbachia overstedii*) และสาวน้อยประแป้ง (*Diffenbachia picta* "Snowdrop") บน gel กับน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA........30
13. แสดง pattern ของ dsRNA band จากการแยกสกัดในช่วงฤดูหนาวจากไม้ประดับในวงศ์ Araceae และวงศ์ Liligaeae ที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส........32

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

14. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของ dsRNA ของกวักเงิน (*Diffenbachia overstedii*) บน gel กับน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA.............33

15. แสดง pattern ของ dsRNA จากการแยกสกัดในฤดูร้อนจากไม้ประดับในวงศ์ Araceae และวงศ์ Liligaeae ที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส......34

16. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของ dsRNA ของฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*) บน gel กับน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA.........35

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คำนำ

ในปัจจุบันไม้ดอกไม้ประดับมีความสำคัญและมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นทั้งตลาดภายในประเทศและตลาดต่างประเทศ ไม้ดอกไม้ประดับมีความจำเป็นในการดำรงชีวิตโดยไม้ดอกไม้ประดับได้ถูกนำมาใช้ในการจัดงานต่างๆ นำมาปลูกประดับทำให้ที่อยู่อาศัยสดชื่น สวยงาม น่าอยู่ และไม้ดอกไม้ประดับยังช่วยทำให้เกิดความรู้สึกสดชื่น สบาย คลายความตึงเครียด ดังนั้นไม้ดอกไม้ประดับจึงเป็นพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจในปัจจุบันซึ่งความต้องการใช้ไม้ดอกไม้ประดับในตลาดโลกมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเป็นลำดับเฉลี่ยปีละ11% (บรรเจิด,2534) สำหรับประเทศไทยไม้ดอกไม้ประดับเป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศ ในปัจจุบันประเทศไทยผลิตไม้ดอกไม้ประดับเพิ่มมากขึ้น โดยในปี 2531 มีมูลค่าการส่งออกถึง 594.7 ล้านบาทเพิ่มจากปี 2530 ถึง 21% (บรรเจิด,2534) ไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสำคัญอาทิเช่น สาวน้อยประแป้ง กวักเงิน ไผ่ฟิลิปปินส์ ฟิโลเดนดรอน ซึ่งไม้ประดับเหล่านี้จะเป็นพันธุ์ไม้ประดับที่นำมาปลูกใส่กระถางและนำมาประดับตกแต่งอาคารสถานที่ต่างๆ ทำให้เกิดความสวยงามเพิ่มความสดชื่น นอกจากนี้ไม้ประดับเหล่านี้ยังสามารถปลูกเป็นพืชทางการค้าทำรายได้ให้แก่เกษตรกรได้ด้วย จากการขยายตัวอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตไม้ประดับหลายชนิดเพื่อการส่งออกและใช้ภายในประเทศปริมาณความต้องการกล้าไม้ในแต่ละปีสูงขึ้น แต่ในขณะเดียวกันการเกิดปัญหาโรคพืชต่างๆ รวมทั้งโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสโดยเฉพาะในช่วงที่อากาศเย็นและอุณหภูมิต่ำในฤดูฝนและฤดูหนาวปริมาณการเพิ่มเชื้อและการเข้าทำลายไม้ประดับจะมีสูงซึ่งก็เป็นปัญหาหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายแก่ไม้ประดับ และก่อให้เกิดความสูญเสียแก่เกษตรกรผู้ปลูกไม้ประดับ ทำให้ความต้องการไม้ประดับลดน้อยลง ดังนั้นการเลือกช่วงระยะเวลาในการศึกษาพร้อมทั้งนำเทคนิคการตรวจสอบเชื้อไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพมาใช้ในการศึกษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่เกษตรกรผู้ปลูกไม้ประดับ เพื่อเป็นการป้องกันการเพิ่มจำนวนหรือการขยายพันธุ์ต้นพืชเป็นโรคทำให้เกิดการแพร่ระบาดมากยิ่งขึ้น รวมทั้งนำข้อมูลรายละเอียดเรื่องโรคไวรัสไปพัฒนาการผลิตไม้ดอกไม้ประดับเพื่อการค้าต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะอาการของไม้ประดับบางชนิดที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย
2. เพื่อศึกษาปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในแต่ละฤดูกาลของไม้ประดับบางชนิด โดยใช้วิธีการสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA extraction)

การตรวจเอกสาร

ในปัจจุบันไม้ดอกไม้ประดับในวงศ์ Araceae เป็นพืชในกลุ่มไม้ดอกไม้ประดับที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากพืชในวงศ์นี้มีการปลูกและผลิตเพื่อการค้าอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นพืชที่มีความสวยงาม ราคาสูงเหมาะสมกับการผลิตเพื่อการค้า (บรรเจิด, 2534) ซึ่งพืชในกลุ่มนี้ได้แก่

สาวน้อยประแป้ง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Dieffenbachia picta* “Snowdrop”

วงศ์ : ARACEAE

ชื่อสามัญ : Spotted Dumbcane

ลักษณะของต้นเป็นไม้กอ อวบน้ำ ไม่มีเนื้อไม้ ลำต้นกลมตรง ข้อถี่ สูงประมาณ 4 ฟุต แตกใบอ่อนตรงส่วนยอดของลำต้นทีละใบ ก้านใบยาว ก้านใบส่วนที่ติดกับลำต้นมีลักษณะเป็นกาบ ส่วนที่ใบกลมใบจัดเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว มีรูปร่างยาวคล้ายใบพาย ปลายใบเรียวแหลมโคนใบมน พื้นใบเป็นสีเขียวและมีสีขาวเป็นลายเป็นจุดแต้มอยู่ตามพื้นใบดอกของสาวน้อยประแป้งมีลักษณะเป็นกาบอยู่เพียงกาบเดียวหุ้มแท่งเกสรอยู่ด้านในคล้ายดอกหน้าวัว ดอกออกเป็นกลุ่ม เวลาบานจะแย้มกาบออกเล็กน้อย ต้องการแสงแดดหรือแสงสว่างมากแต่ก็สามารถเลี้ยงได้ทั้งในร่มและที่แจ้งได้ เจริญได้ดีในดินที่เก็บความชื้น แต่ต้องระบายน้ำได้ดีไม่มีน้ำขังมาก ขยายพันธุ์โดยการตัดยอดปักชำตัดแยกหน่อ (วิทย์, 2536)

กวักเงิน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Diffenbachia overstedii*

วงศ์ : ARACEAE

ชื่อสามัญ : Silver Evergreen

ลักษณะลำต้นมีสีเขียวเข้ม แต่จะมีกาบสีขาวติดกับลำต้นด้วยต้นอาจจะสูงถึง 1 เมตร ใบสีเขียวเข้มปลายใบมนและแหลมเล็กน้อยโคนใบมนและมีสีขาวพาดยาวไปตามแนวเส้นกลางใบ แต่บางใบเส้นสีขาวนั้นอาจจะสั้นหรือไม่มีเลย ก้านของใบจะยาวมีสีเขียวกลมเป็นไม้ประดับไม่มีดอก เป็นต้นไม้ที่เจริญเติบโตได้เร็วเหมาะที่จะปลูกในกระถางวางประดับไว้ต้นเดียว ชอบความชุ่มชื้นสูงอยู่ในที่มีแสงแดดรำไร ขยายพันธุ์โดยการตัดยอดหรือเอาส่วนของลำต้นไปปักชำ หรือแยกต้นเล็กๆ มีถิ่นกำเนิดอยู่ในคอสตาริกา (วิทย์, 2536)

ไผ่ฟิลิปปินส์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Dracaena godseffiana*
วงศ์ : LILIAGEAE
ชื่อสามัญ : Gold-Dust Dracaena

ไผ่ฟิลิปปินส์เป็นพรรณไม้ขนาดเล็ก มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศคองโก (Congo) เจริญเติบโตรวมกันอยู่เป็นกอคล้ายกอไผ่แตกกิ่งก้านสาขาตรงส่วนโคนของต้น ลักษณะของลำต้นจะกลมและตรง ใบจะแตกตรงส่วนยอดของลำต้นครั้งละ 2-3 ใบ ลักษณะของใบเป็นรูปไข่ ปลายใบแหลมและโคนสอบ พื้นใบเป็นสีเขียวเข้ม และจุดมีลายสีขาวอมเหลืองหรือสีเหลืองเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วทั้งใบ มีก้านที่สั้น เป็นพรรณไม้ที่ชอบอยู่ที่มีแสงแดดรำไร ขึ้นได้ดีในดินที่ร่วนซุย มีการระบายน้ำได้ดีและต้องการน้ำมาก ความชื้นปานกลาง จึงเหมาะสำหรับปลูกเป็นไม้ประดับในอาคาร ขยายพันธุ์โดยการปักชำและแยกกอส่วนการปลูกก็โดยปลูกลงในกระถางตั้งประดับ (ศิริพร,2535)

ฟิโลเดนดรอน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Philodendron microstictum*
วงศ์ : ARACEAE
ชื่อสามัญ : Philodendron

ฟิโลเดนดรอนมีถิ่นกำเนิดอยู่ตามธรรมชาติในอเมริกาเขตร้อนและหมู่เกาะอินเดียตะวันตก เป็นพรรณไม้ใบหรือไม้ประดับที่ดูทรงต้นและใบมากกว่าจะดูดอก เป็นพันธุ์ไม้เลื้อยที่มีเถาทอดยาวไปตามหลักที่เตรียมไว้ ทรงเถาจะกลมและแบ่งออกเป็นข้อในแต่ละปล้องจะมีรากยาวออกมาเพื่อเอาไว้ยึดเกาะและดูดอาหาร ใบเป็นรูปหัวใจป้อมๆปลายแหลมโค้งมนเว้าเข้าหาก้านใบเล็กน้อย ขอบใบเรียบไม่มีหยัก พื้นใบเรียบมีสีเขียว แตกใบอ่อนตรงส่วนยอดของต้น ก้านใบจะมีลักษณะเป็นกาบ เป็นพืชที่ปลูกในที่ร่มรำไร ต้องการน้ำปานกลาง แต่ชอบความชื้นมากหน่อย ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด ตอนและปักชำ (วิทย์ , 2536)

ฟิโลเดนดรอน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Philodendron panduraeforme*
วงศ์ : ARACEAE
ชื่อสามัญ : Philodendron

มีถิ่นกำเนิดอยู่ในประเทศบราซิล เป็น Philodendron ชนิดลำต้นเลื้อยลักษณะใบยาว ปลายใบมนมีส่วนแหลมเพียงเล็กน้อย ส่วนกลางใบคอดโคนใบกว้างเว้าหูใบมน พื้นใบสีเขียวเข้ม ฉาบทับด้วยสีเทาเงินบางๆตลอดทั้งใบ พื้นใบเป็นมันมีรากเพื่อยึดเหนี่ยว เจริญเติบโตในดินที่มีอินทรีย์วัตถุมากและระบายน้ำได้ดี ไม่ชอบแสงแดดจัด ควรเลี้ยงในที่ร่มแสงสว่างเข้าถึง หรือที่แดดรำไร ขยายพันธุ์ด้วยการตัดยอดหรือชำส่วนของลำต้น (สารานุกรมไม้ประดับในประเทศไทย, 2524)

การตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชบางชนิด เช่นไม้ดอกไม้ประดับพุ่มบางชนิดซึ่งในสภาพการเข้าทำลายพืชในสภาพธรรมชาติพบว่าปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสอยู่ในระดับต่ำ และในการแยกเชื้อ (isolate) จากพืชประเภทนี้สู่พืชทดสอบจะประสบความสำเร็จน้อย เนื่องจากน้ำคั้นจากพืชเหล่านี้จะมีลักษณะเป็นยางเหนียว หรือมีองค์ประกอบของสาร tannin หรือสารประเภท phenolic compound ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเข้าทำลายของเชื้อ หรือทำให้เชื้อไวรัสเสื่อมสภาพลงเป็นปัญหาในการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นสู่พืชทดสอบซึ่งถือเป็นหลักปฏิบัติขั้นต้นในการวินิจฉัยเชื้อไวรัสหรือนำไปสู่การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (purification) ดังนั้น การนำเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิกแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction) มาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยจึงเป็นวิธีหนึ่งสำหรับเชื้อไวรัสที่มีหน่วยพันธุกรรมเป็น RNA ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อไวรัสพืชส่วนใหญ่ โดยอาศัยปรากฏการณ์ของขบวนการเข้าทำลายพืชโดยเชื้อไวรัสในระหว่างการทวีจำนวนของเชื้อ (multiplication) จะมีการเกิด double stranded RNA (dsRNA) ซึ่งก็คือเส้นของ template RNA และ RNA สายใหม่ที่ยังจับคู่กันอยู่ก่อนที่สาย RNA ใหม่จะแยกตัวออกเพื่อสร้างโปรตีนห่อหุ้มเกิดเป็นอนุภาคใหม่ขึ้น ซึ่งขนาดของ dsRNA ที่เกิดขึ้นจะมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ $> 0.1x\ 10^6$ dalton การวินิจฉัยชนิดของเชื้อจะพิจารณาจากลักษณะ จำนวนและระยะทางการเคลื่อนที่ของ dsRNA บนตัวกลาง (matrix) เช่น polyacrylamide gel หรือ agarose การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคการสกัดกรดนิวคลีอิกแบบ RNA สายคู่นี้จะช่วยในการวินิจฉัยกลุ่มของเชื้อและชนิดของไวรัสรวมถึง strain ของเชื้อไวรัสบางชนิดได้ แต่ก่อนการตรวจสอบจะต้องมีข้อมูลและแบบแผน (pattern) การเคลื่อนที่ของ dsRNA เฉพาะเชื้อไวรัสแต่ละชนิดเพื่อใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ นอกจากนี้สภาพสิ่งแวดล้อมในขณะที่พืชเจริญเติบโตรวมทั้งฤดูกาลจะมีผลต่อปริมาณของ dsRNA ที่สกัดได้ (นวลพรรณ,2538)

รายงานวิจัยลักษณะและการเข้าทำลายของเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) มีดังนี้

Verplancke (1930) ได้ศึกษาและรายงานอาการของพืชที่พบใน *Sapronaria vaceia* ซึ่งเกิดจากเชื้อ DMV ทำให้พืชแสดงอาการ systemic ที่เส้น veins และมี chlorotic spots

Zettler *et al.* (1970) รายงานว่าเชื้อ DMV มีความยาวอนุภาคเฉลี่ย 750 นาโนเมตร สามารถถ่ายทอดทางเพลี้ยอ่อนด้วยวิธี stylet - borne และสามารถก่อให้เกิดผลึก cylindrical inclusion ซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อ DMV

พืชในวงศ์ Araceae ปัจจุบันพบว่าถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายเป็นจำนวนมากเช่น สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta*) กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstietum*) ได้มีรายงานว่าถูกเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) เข้าทำลาย โดยการรายงานของ Abo El - nil *et al.* (1977) ได้รายงานว่า Dasheen mosaic virus (DMV) พบครั้งแรกในปี 1970 เข้าทำลายพืชในวงศ์ Araceae ในหลายๆประเทศเช่น ญี่ปุ่น เนเธอร์แลนด์

Hill and Daphne (1980) รายงานว่าต้น *Dieffenbachia picta* พันธุ์ " Schott" ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายส่งผลให้พืชอ่อนแอกว่าต้นปกติและแสดงอาการแผลเป็นวงแหวน (ringspotting) แคระแกรน (stunting) เมื่อนำต้นพืชไปตรวจสอบหาเชื้อทำให้ทราบว่าเชื้อที่เข้าทำลายพืชคือเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) เชื้อ DMV สามารถเข้าทำลายพืช 13 ตระกูล ในวงศ์ Araceae ตัวอย่างเช่น *Aglaonema* sp., *Anthurium* sp., *Caladium* sp., *Dieffenbachia* sp., *Philodendron* sp., และ *Zantedeschia* sp. เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโดยทางน้ำคั้นและมีแมลง (เพลี้ยอ่อน) เป็นพาหะ

Chase and Zetter (1982) รายงานว่าพืชในตระกูล *Dieffenbachia* sp. หลายชนิดที่ปลูกเพื่อทำเป็นการค้าพบเชื้อ DMV เป็นสาเหตุที่แสดงอาการ systemic ซึ่งทำให้เกิดปัญหากับพืชในวงศ์ Araceae เช่น *Aglaonema* sp. , *Dieffenbachia* sp., *Philodendron* sp., *Xanthosoma* sp., และ *Zantedschia* sp.

Walkey (1985) ศึกษาและรายงานว่าเชื้อ DMV อยู่ในกลุ่ม Potyvirus Group เป็นเชื้อไวรัสที่มีพืชอาศัยแคบ สามารถถ่ายทอดเชื้อโดยผ่านทางแมลงพาหะ คือ เพลี้ยอ่อน การถ่ายทอดเป็นแบบ non – persistent ไวรัสบางชนิดในกลุ่มนี้สามารถถ่ายทอดเชื้อโดยผ่านทางเมล็ดได้

Zettler and Hartman (1985) รายงานว่าเชื้อ DMV สามารถเข้าทำลายพืชในวงศ์ Araceae ได้แก่ *Alocaria* sp., *Aylaonena* sp., *Amorphophallus* sp., *Anthurium* sp., *Arisaena* sp., *Caladium* sp., *Colocaria* sp., *Crytocoryne* sp., *Dieffenbachia* sp., *Philodendron* sp, *Richarlia* sp., *Spathiphyllum* sp., *Xanthosoma* sp., และ *Zantedeschia* sp. ได้

Chagas *et al.* (1993) ได้ศึกษาเชื้อ DMV ที่แยกได้จากต้น *Amorphophallus konjac* (*A. rivierr*) ที่แสดงอาการด่างบนใบ ใบมีรูปร่างบิดเบี้ยวและลำต้นใต้ดินมีขนาดเล็ก เชื้อไวรัสถูกจำแนกชนิดโดยใช้พืชอาศัย คุณสมบัติทางสรีระวิทยา และคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา

Fawzy *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลาย *Dieffenbachia* spp. และ *Aglaonema* spp. ในแปลงปลูกในประเทศอียิปต์ พบว่าเกิดจากเชื้อ DMV

รายงานการเข้าทำลายของเชื้อ Cucumber mosaic virus (CMV) และเชื้อไวรัสชนิดอื่นๆ ต่อพืชในวงศ์ Araceae มีดังนี้

Hearon (1979) รายงานว่าเชื้อ CMV สามารถเข้าทำลายไม้ประดับในวงศ์ Araceae เช่นกัน ตัวอย่างเช่นใน *Philodendron selloum* ทำให้รูปร่างของใบเหมือนถ้วยคว่ำและเส้นกลางใบเหลือง

Fawzy (1992) ทำการศึกษา strain ของเชื้อ Cucumber mosaic virus (CMV) เชื้อในกลุ่ม Cucumovirus ซึ่งแยกได้จากแปลงปลูกของ *Philodendron selloum* ในเขต Giza Governate ในประเทศอียิปต์

Sabanadzovic (1995) รายงานเกี่ยวกับเชื้อไวรัสที่มีชื่อว่า Pothos latent virus (PoLV) โดยทำการแยกเชื้อด้วยการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นของต้นพลูด่าง *Scindapsus aureus* ซึ่งเป็นไม้ประดับในวงศ์ Araceae

Gunna (1997) รายงานว่าการตรวจสอบเชื้อไวรัสพืชในวงศ์ Araceae ในพื้นที่ 3 แห่งของ Wahhi valley ในพื้นที่สูงทางตะวันตกของหมู่เกาะ Papua New Guinea พบเชื้อ Alomae bobone complex (ABVC) โดยจะพบอนุภาคของเชื้อเป็นท่อน (bacilliform) ขนาดเล็กและขนาดใหญ่และพบเชื้อ Dasheen mosaic potyvirus (DMV) เข้าทำลายร่วมกันในพืชที่ทำการตรวจสอบจากพื้นที่ทั้งหมด

รายงานการตรวจสอบและวินิจฉัยโดยการใช้เทคนิคการสกัดกรดนิวคลีอิคแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction)

Copeland and Mills (1986) ได้ทำการแยก Tobacco rattle virus โดยวิธี dsRNA extraction ในหัวมันฝรั่งที่แสดงอาการคล้ายไวรัส โดยพบว่า band ของ dsRNA ที่ได้จะคล้ายกับเชื้อ TRV NM ที่สกัดได้จากยาสูบ

Martelli *et al.* (1995) ได้ทำการศึกษาและเก็บตัวอย่าง olive พันธุ์ต่างๆได้แก่ Rasii, Shami, Khulli, Grossa di Spagna, Kanabisi, Souri, Nasohi-Jaba-2, Turkish, St. Catharine, Nabali B และ Nabali mohassan ที่แสดงอาการ severe cracking, mile cracking หรือที่ไม่แสดงอาการ นำมาตรวจสอบโดยวิธี mechanical transmission สู่พืชทดสอบและวิธี dsRNA extraction จาก cortical ของยอดที่มีอายุ 1 ปี พบว่าสามารถแยกเชื้อ Olive layeny 1 virus (OLV-1) ออกมาได้

Sepulveda (1995) ได้รายงานผลการตรวจสอบ dsRNA จากใบถั่วที่สำรวจในไร่ถั่วที่มีการติดเชื้อไวรัสในระหว่างปี 1982-1983 ทั้งหมด 68 ตัวอย่าง สรุปผลการตรวจวิเคราะห์

dsRNA และการทดสอบด้วย ELISA พบเชื้อไวรัส CMV 66% จากตัวอย่างทั้งหมด และพบเชื้อไวรัสที่มีความสัมพันธ์ในกลุ่มเดียวกันคือ Bean common mosaic potyvirus (BCMV) และเชื้อ Bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) อีก 34% จากตัวอย่างทั้งหมด

การศึกษาและรายงานการแยกวิเคราะห์ dsRNA จากต้นเชอรี่ใน California โดย Zhang *et al.* (1998) ทำการแยก dsRNA จาก Bing sweet cherry ผลการตรวจสอบพบการแยกแถบ dsRNA ทั้งหมด 5 แถบโดยวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบได้ 4.7 , 4.7 , 1.3 , 8.5 และ 9 kbp จากช่วงความยาวแถบเมื่อทำการตรวจวิเคราะห์พบว่าเชื้อที่เข้าทำลายคือเชื้อ Cherry green ring mottle virus (CGRMV)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของเชื้อและการแสดงอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสมีความผันแปรมาจาก 2 ปัจจัยใหญ่คือ

1. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อม (Environmental Factor) ได้แก่

- อุณหภูมิ (Temperature) อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้พืชแสดงอาการของโรคลดลงโดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 26 องศาเซลเซียส ดังการทดลองที่เห็นได้ชัดเจน เช่น อาการบนต้นกล้าของต้นฟักที่ถูกเชื้อ Cucumber mosaic virus เข้าทำลายจะปรากฏอาการน้อยและไม่ชัดเจนเมื่อต้นกล้าถูกปลูกที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในขณะที่อาการจะชัดเจนและรุนแรงขึ้นเมื่อต้นกล้าเจริญในอุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส (Walkey and Pink , 1984)
- แสง (Light) ความเข้มของแสงในระดับสูงจะทำให้พืชมีใบหยาบกระด้างซึ่งทำให้การเข้าทำลายของเชื้อไวรัสเป็นไปได้ยากขึ้น ความเข้มแสงที่สูงขึ้นภายหลังการปลูกเชื้อมีผลทำให้พืชแสดงอาการของโรคน้อยลง
- ธาตุอาหาร (Nutrition) อิทธิพลของธาตุอาหารพืชต่ออาการของโรคมีความผันแปร แต่โดยทั่วไปความอุดมสมบูรณ์ของธาตุอาหารซึ่งช่วยให้พืชเจริญเติบโตอย่างดีก็จะส่งเสริมความอ่อนแอต่อโรคด้วย ตัวอย่าง เช่น ปริมาณธาตุอาหารไนโตรเจนที่สูงจะช่วยเพิ่มความอ่อนแอให้กับต้นกล้าฟักที่ถูกเชื้อ Cucumber mosaic virus เข้าทำลาย

2. ปัจจัยเกี่ยวกับพันธุกรรมของเชื้อไวรัสและพืช (Genetic and Host Factors) เชื้อไวรัสที่ต่าง strain กันจะมีพันธุกรรมความรุนแรงของเชื้อต่างกันซึ่งเป็นตัวกำหนดหรือเป็นตัวควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อหรืออาการที่เกิดขึ้นเช่นเดียวกับพันธุ์พืชที่ต่างกันก็จะมีความอ่อนแอต่อโรคต่างกัน เนื่องมาจากลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อหรือทำให้เกิดอาการที่ต่างกันไป

นอกจากนี้อายุของพืชในช่วงที่ถูกเชื้อเข้าทำลายก็จะเป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งต่ออาการของพืชที่ปรากฏโดยทั่วไป พืชที่มีอายุน้อยจะมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อมาก

กว่าพืชที่อายุมากเนื่องจากเชื้อไวรัสจะเจริญและทวีจำนวนใน cell พืชอาศัย ดังนั้นในพืชที่อายุมากหรือบนใบแก่การเคลื่อนย้ายธาตุอาหารและ metabolism ต่างๆจะช้า ดังการรายงานของ Walkey and Pink (1984) ทำการศึกษาการปลูกเชื้อ Cucumber mosaic virus สู่ต้นกล้าฟักในขณะที่พืชเพิ่งแตกใบเลี้ยงเต็มที่ จะเป็นช่วงที่พืชอ่อนแอต่อการปลูกเชื้อมากกว่าการปลูกเชื้อภายหลังจากนั้น14 และ 21 วันนอกจากนี้ Beemster (1966) ทำการศึกษาการปลูกเชื้อ Potato virus Y สู่ต้นมันฝรั่งเมื่อต้นมีอายุ 4 สัปดาห์ พบว่าหัวมันฝรั่งที่ได้จะเป็นโรคไวรัสทั้งหมด ในขณะที่เมื่อทำการปลูกเชื้อต้นมันฝรั่งอายุ 13 สัปดาห์ จะพบหัวมันฝรั่งที่เป็นโรคเพียง 25% (นวลพรรณ, 2539)

รายงานวิจัยผลของอุณหภูมิ ฤดูกาลและสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไวรัสและการสกัด dsRNA มีดังนี้

Zettler *et al.* (1978) ศึกษาและรายงานว่าอาการที่เกิดจากเชื้อ DMV จะแตกต่างกันอย่างมากตามชนิดของพืชที่เกิดเชื้อและฤดูที่ปลูก อาการที่เชื้อ DMV แสดงออกจะเป็นไปตามฤดูกาล และอาการส่วนใหญ่จะปรากฏบนใบที่ปลูกในเดือนที่เป็นฤดูใบไม้ร่วงหรือฤดูใบไม้ผลิ

การศึกษาอาการของโรคไวรัสที่ปรากฏในฤดูกาลต่างๆ โดย Rana and Vavlas (1983) ทำการศึกษาและพบว่าต้น *Richardia africana* ที่แสดงอาการด่าง และใบเหลือง จะแสดงอาการขึ้นในใบอ่อนระหว่างช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ผลิ

มีรายงานว่าเชื้อ DMV ทำให้พืชที่ถูกเชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำลายจะแสดงอาการของโรคแตกต่างกันขึ้นกับฤดูกาลเป็นอย่างมาก และเชื้อมีพืชอาศัยตามธรรมชาติ คือ *Aglaonema* , *Alocasia* , *Amorpnophallu* , *Arisaema* , *Caradium* และ *Cyrtosperma spp.* เมื่อเข้าทำลายจะแสดงอาการ ด่าง ส่วนในพืชพวก *Cryptosoryne* , *Dieffenbachia* , *Philodendron* , *Richardia* และ *Zentedeschia spp.* แสดงอาการด่างและรูปร่างใบผิดปกติ *Colocasia* และ *Xanthosoma spp.* แสดงอาการด่าง ใบเรียวยาวคล้ายขนนก และมีแผลแห้ง (Brunt *et al.* 1995; CMI/AAB 1978)

White *et al.* (1995) รายงานว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเกิดอาการ necrosis ของ CMV satellite ในมะเขือเทศ โดยที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมะเขือเทศที่ติดเชื้อ CMV strain D satellite D – CARNA 5 จะแสดงอาการไม่รุนแรงและมีปริมาณเชื้อน้อยในขณะเดียวกันปริมาณ RNA ที่มีอยู่ก็จะมีปริมาณลดลงประมาณ 5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เมื่อทำการตรวจวิเคราะห์พบว่าที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ตรวจพบ ds – CARNA 5 แต่ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเมื่อตรวจสอบเชื้อแล้วปรากฏว่าไม่พบ ดังนั้นอุณหภูมิก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณ RNA และการเกิดอาการ necrosis

Alice *et al.* (1997) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและพืชอาศัยในการจัดเรียง RNA ใหม่ของเชื้อ TSWV การศึกษาการจัดเรียงโมเลกุล RNA ใหม่ของเชื้อ TSWV ที่ถูกถ่ายทอดจากพืชไปสู่พืชอาศัยภายใต้การควบคุมสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันพบว่าการจัดเรียงโมเลกุล RNA ใหม่เกิดขึ้นสูงในพืชที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส

Grieco *et al.* (2000) ได้ศึกษาและรายงานการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี dsRNA extraction ในต้น Olive ที่เก็บจากพื้นที่ต่างๆ ในประเทศอิตาลีพบว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ Olive virus ถึง 210 ตัวอย่างจาก 286 ตัวอย่าง (73.4%) โดยพบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ผลิจะสกัดได้ผลดีกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ร่วง

Almeida *et al.* (2001) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายข้าวโพด เชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม potyvirus ก่อให้เกิดอาการด่าง และเป็นเชื้อที่ส่งผลกระทบต่อข้าวโพดเป็นอย่างมาก โดยใช้วิธี dot – ELISA ในการตรวจสอบ ระหว่างเดือนมีนาคมปี 1997 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 1998 พบว่าเชื้อจะแสดงอาการรุนแรงขึ้นถ้าอุณหภูมิต่ำลง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการสำรวจอาการโรคพืชคล้ายไวรัสในไม้ประดับ

1.1 ตัวอย่างพืชที่แสดงอาการคล้ายอาการเนื่องจากเชื้อไวรัส ทั้งหมด 5 ชนิด ในวงศ์ Araceae ได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* “ Snowdrop”) กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) และ ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) และในวงศ์ Liliageae ได้แก่ ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*)

1.2 กล้องถ่ายรูปสำหรับบันทึกภาพ

1.3 ฟิล์มถ่ายรูป

1.4 เทอร์โมมิเตอร์ (สำหรับวัดอุณภูมิ)

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbend Assay (ELISA) แบบ direct ELISA

2.1 น้ำคั้นพืชจากพืชที่เป็นโรค

2.2 antiserum ของเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) titre 1:200

2.3 Goat entiled rabbit in conjugate buffer (IgG)

2.4 coating buffer

2.5 PBS- Tween

2.6 extraction buffer

2.7 substrate

2.8 P- nitrophenyl phosphate

2.9 polystyrene plate

2.10 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.11 micropipette , pipette และลูกยาง

2.12 beaker

2.13 ผ้าสะอาด

2.14 ตู้เย็นสำหรับบ่ม polystyrene plate

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบและจำแนกชนิดเชื้อไวรัสโดยการแยกสกัดกรดนิวคลีอิกสายคู่(dsRNA)

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกสกัดกรดนิวคลีอิกสายคู่(dsRNA Extraction)

3.1.1 ชุดสกัด Rneasy Mini Potrocol for Isolation of Total RNA จากบริษัท QIAGEN โดยมีบริษัท ธีระเทรดดิ้ง จำกัด เป็นผู้แทนจำหน่ายในประเทศไทย (ภาพที่ 1)

3.1.2 ตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการคล้ายไวรัส

3.1.3 liquid Nitrogen

3.1.4 โกร่งสำหรับบดใบพืช

3.1.5 vortex

3.1.6 hot plat

3.1.7 microcentrifuge

3.1.8 ethanol 100 %

3.1.9 eppendrop tube ขนาด 2 ml

3.1.10 micropipette

3.1.11 beaker ขนาด 200 , 400 ml

3.1.12 ตู้เย็นสำหรับเก็บสารเคมี และสารสกัดตัวอย่างพืช

3.1.13 จุกยาง

3.1.14 pipette

3.1.15 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกสกัด dsRNA โดยใช้กระแสไฟฟ้า (electrophorsis)

3.2.1 ชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยกระแสไฟฟ้าที่ใช้ คือ 50 Voltage ประกอบด้วยเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าและ Electrophoresis tank (ภาพที่ 2)

3.2.2 สารสกัดตัวอย่างพืช 10 µl

3.2.3 gel loading

3.2.4 Agarose

3.2.5 TAE Buffer (50X)

3.2.6 ethidium bromide 0.1 µg/ml

3.2.7 น้ำกลั่น

3.2.8 เครื่อง microwave

3.2.9 กล่องสำหรับย้อมสีด้วยสารละลาย ethidium bromide

3.2.10 กล่องสำหรับล้างสารละลาย

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบและวิเคราะห์ผลโดยสังเกตจากลักษณะจำนวนระยะทางการเคลื่อนที่ของ dsRNA

3.3.1 ตัวมาตรฐานสำหรับการเปรียบเทียบได้แก่ Lambda DNA Hind III double digest

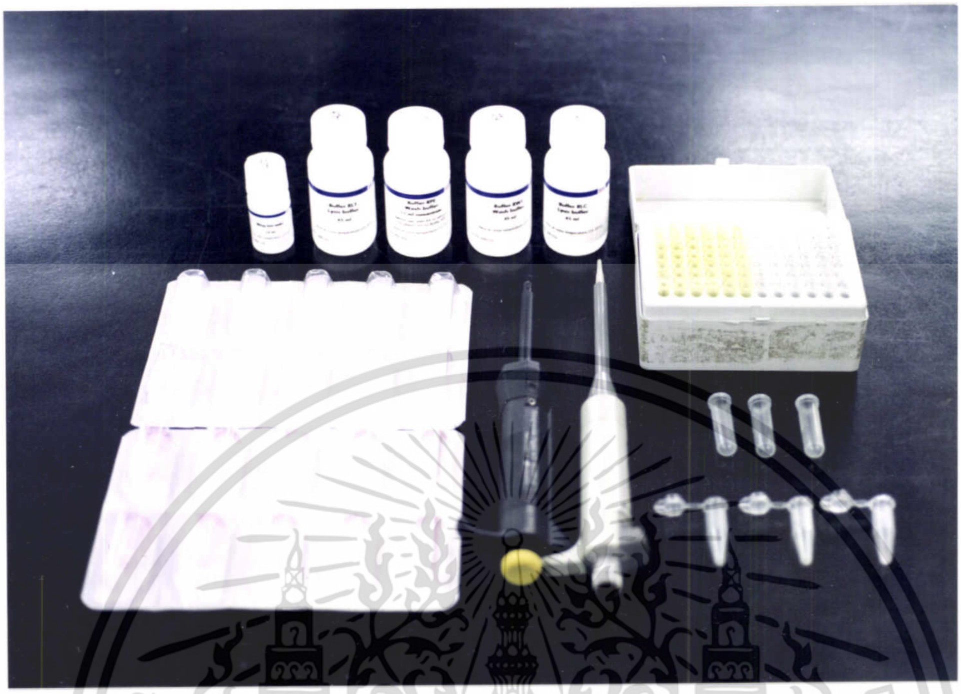
3.3.2 กล่อง UV box

3.3.3 ไม้บรรทัด

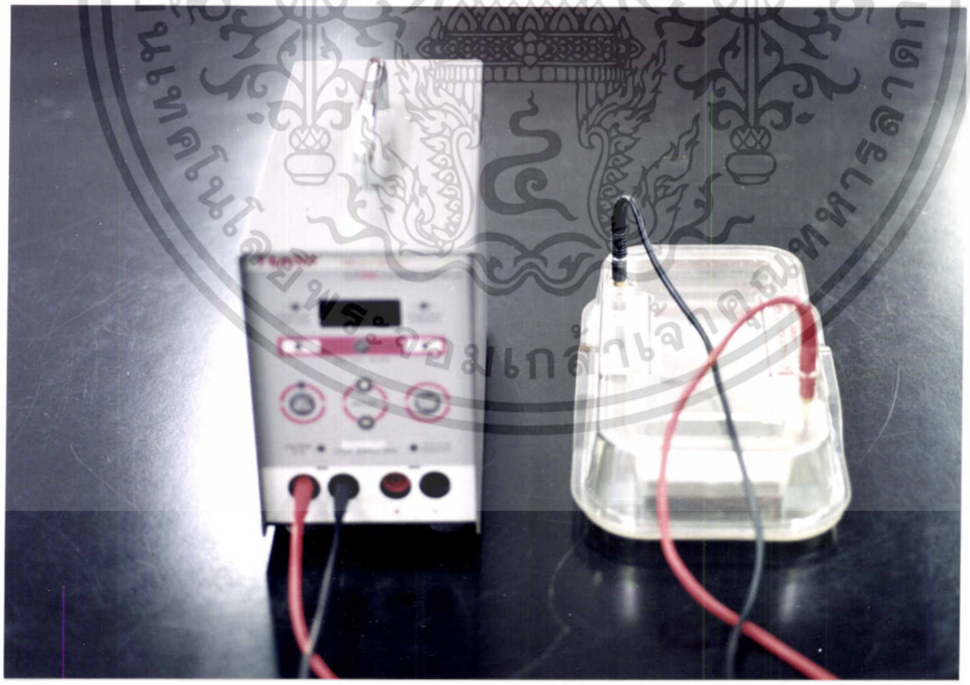
3.3.4 กล้องถ่ายรูป

3.3.5 ฟิล์มถ่ายรูป

3.3.6 เครื่องคิดเลข



ภาพที่ 1 แสดงชุดสกัด Rneasy Mini Kit และอุปกรณ์ที่ใช้แยกสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ของเชื้อ



ภาพที่ 2 แสดงชุดอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ซ้ายมือ คือ เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า / ขวามือ คือ electrophoresis tank

วิธีการ

1. การศึกษาลักษณะอาการของไม้ประดับบางชนิดที่แสดงอาการเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส

นำตัวอย่างพืชไม้ประดับทั้งหมด 5 ชนิด ในวงศ์ Araceae ได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* “ Snowdrop”) กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟีโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) และฟีโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) และในวงศ์ Liliageae ได้แก่ ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) ที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดเชื้อไวรัส (Virus like Symptom) เช่น อาการด่าง อาการใบหงิกงอ อาการแผลจุดเหลือง จากโรงเรือนเพาะชำภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร มาทำการเปลี่ยนกระถางดินใหม่ ดูแลใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15 ทุกๆ 2 เดือน และคอยสังเกตอาการที่เกิดขึ้นบนต้นไม้ประดับ พร้อมทั้งจดบันทึกลักษณะอาการให้ชัดเจน ซึ่งการบันทึกและสังเกตลักษณะอาการจะแบ่งเป็นช่วงฤดูกาล ดังนี้

ช่วงที่ 1 ฤดูฝน ตั้งแต่เดือนมิถุนายน - ตุลาคม 2545

ลักษณะภูมิอากาศมีฝนตกปานกลาง และฝนตกชุกในเดือนตุลาคม ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดทั้งฤดู 167.56 มม. สภาพความกดอากาศเฉลี่ย 1007.857 เฮกโตปาสคาล ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยทั้งฤดู 76.4 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิสูงสุดเฉลี่ย 35.2 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุด 19.8 องศาเซลเซียส ในเดือนตุลาคมเช่นเดียวกัน อุณหภูมิเฉลี่ยตลอดฤดูกาล 29.22 องศาเซลเซียส (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2545)

ช่วงที่ 2 ฤดูหนาว ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2545- เดือนกุมภาพันธ์ 2546

ลักษณะภูมิอากาศไม่หนาวเย็นมาก อากาศหนาวมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน ปริมาณน้ำฝนตลอดทั้งฤดูกาลเฉลี่ย 94.55 มม. สภาพความกดอากาศเฉลี่ย 1011.80 เฮกโตปาสคาล ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยทั้งฤดู 72 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิสูงสุดในเดือนกุมภาพันธ์ 32 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดในเดือนพฤศจิกายน 19.2 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิเฉลี่ยตลอดทั้งฤดูกาล 27 องศาเซลเซียส (กรมอุตุนิยมวิทยา, 2545)

ช่วงที่ 3 ฤดูร้อน ตั้งแต่เดือนมีนาคม – เดือนพฤษภาคม 2546

ลักษณะภูมิอากาศร้อนปานกลางในช่วงต้นฤดูและร้อนมากในช่วงกลางฤดูกาล อากาศร้อนที่สุดในเดือนเมษายน 37 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนเฉลี่ยตลอดทั้งฤดู 27.8 มม. สภาพความกดอากาศเฉลี่ย 889 เฮกโตปาสคาล ปริมาณความชื้นสัมพัทธ์เฉลี่ยทั้งฤดู 79 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิสูงสุดในเดือนเมษายน 37 องศาเซลเซียส และต่ำสุดในเดือนมกราคม 23.1 องศาเซลเซียส อุณหภูมิเฉลี่ยตลอดทั้งฤดูกาล 28 องศาเซลเซียส (กรมอุตุนิยมวิทยา,2546)

โดยในแต่ละช่วงฤดูมีการสังเกตอาการที่เกิดขึ้นบนพืชและจดบันทึกลักษณะอาการที่สังเกตเพื่อจะได้ทราบรายละเอียดของพัฒนาการของโรคพร้อมทั้งถ่ายภาพ และนำใบพืชที่แสดงอาการของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายอย่างชัดเจนในแต่ละฤดูกาลไปทำการตรวจสอบความเข้มข้นของเชื้อไวรัสโดยแยกสกัดกรดนิวคลีอิกสายคู่ (dsRNA) ของเชื้อ

2. การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA แบบ direct ELISA

2.1 นำพืชทั้ง 5 ชนิด มาตัดใบยอด 1-2 ใบ แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ให้น้ำหนักอยู่ในช่วง 0.01 – 0.05 กรัม

2.2 วางแผนการตรวจสอบลงบนตารางของ polystyrene plate ก่อนตรวจสอบจริงใน polystyrene plate

2.3 หยด antiserum ของเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) ที่มี titre 1: 200 ภายหลังจากที่ทำการ dilute ใน coating buffer

2.4 นำ plate ไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน

2.5 เท antiserum ทิ้งและสบัด plate แรงๆ แล้วล้าง plate โดยการหยด PBS-Tween ลงในหลุมทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเททิ้งโดยสะบัดแรงๆ ล้าง plate ทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นคว่ำ plate และตบ plate แรงๆบนผ้าสะอาดหรือกระดาษซับ

2.6 นำใบพืชที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วใส่ถุงพลาสติกขนาดเล็ก 1 ตัวอย่าง : 1 ถุง โดยใส่สารละลาย extracting buffer ให้ได้น้ำคั้นเข้มข้น 1: 10 แล้วทำการบด

2.7 หยดน้ำคั้นพืช (antigen) หลุมละ 100 µl

2.8 นำ plate ไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

2.9 เทน้ำคั้นพืชและสะบัด plate แรงๆ แล้วทำการล้าง plate ด้วย PBS- Tween 3 ครั้ง (วิธีการเหมือนข้อ2.7)

2.10 หยด anti- goat IgG หลุมละ 100 µl ที่ conjugate ไว้ด้วยเอนไซม์ alkaline phosphate ซึ่ง dilute ใน conjugate buffer (ความเข้มข้น 1: 2000)

2.11 นำ plate ไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน

2.12 ดูด anti- goat IgG เก็บไว้เพราะสามารถใช้ซ้ำได้อีก 2 ครั้ง แล้วทำการล้าง plate ด้วย (วิธีการเหมือนข้อ 2.7)

2.13 หยด substrate (นำ P- nitrophenly phosphatase 10 mg / น้ำ 15 ml ละลาย ใน substrate buffer) 10 µl

2.14 ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วตรวจผลของปฏิกิริยา โดยสังเกตสีที่เกิดขึ้น

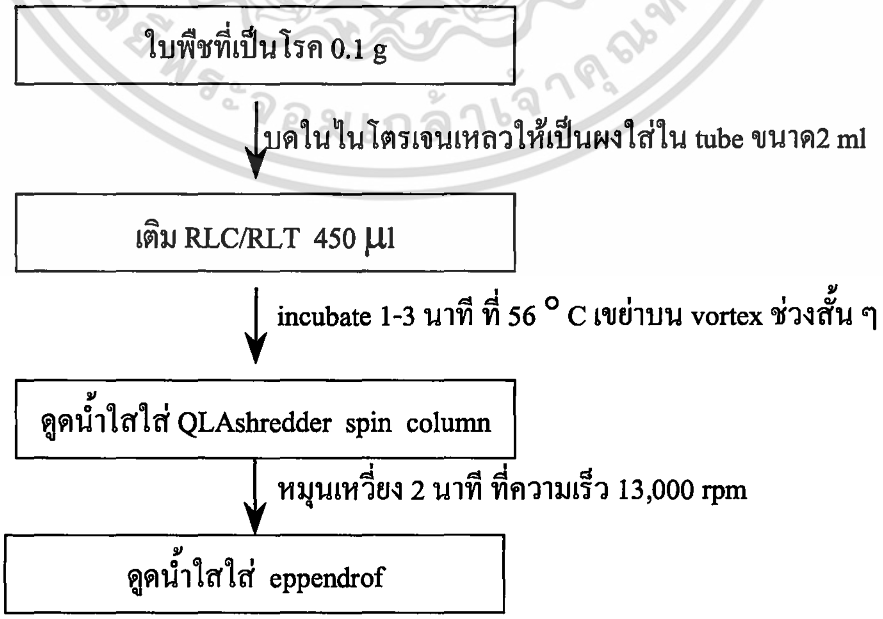
2.15 บันทึกผลการตรวจสอบ โดยจะบอกสีของการเกิดปฏิกิริยาดังนี้

ระดับ 0	ไม่เกิดสี	หมายถึง	ไม่มีเชื้อไวรัส
ระดับ 1	สีเหลืองอ่อน	หมายถึง	มีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำ
ระดับ 2	สีเหลือง	หมายถึง	มีปริมาณเชื้อไวรัสปานกลาง
ระดับ 3	สีเหลืองเข้ม	หมายถึง	มีปริมาณเชื้อไวรัสสูง

3. การตรวจสอบและจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสโดยการแยกสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA)

เทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA) ของเชื้อไวรัสในประดับ แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

3.1 การแยกสกัดกรดนิวคลิอิคสายคู่ของเชื้อไวรัส (dsRNA extraction) โดยใช้ Rneasy Plant Mini Kit. (QIAGEN) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัดดังนี้


ใบพืชที่เป็นโรค 0.1 g

บดในไนโตรเจนเหลวให้เป็นผงใส่ใน tube ขนาด2 ml

เติม RLC/RLT 450 µl

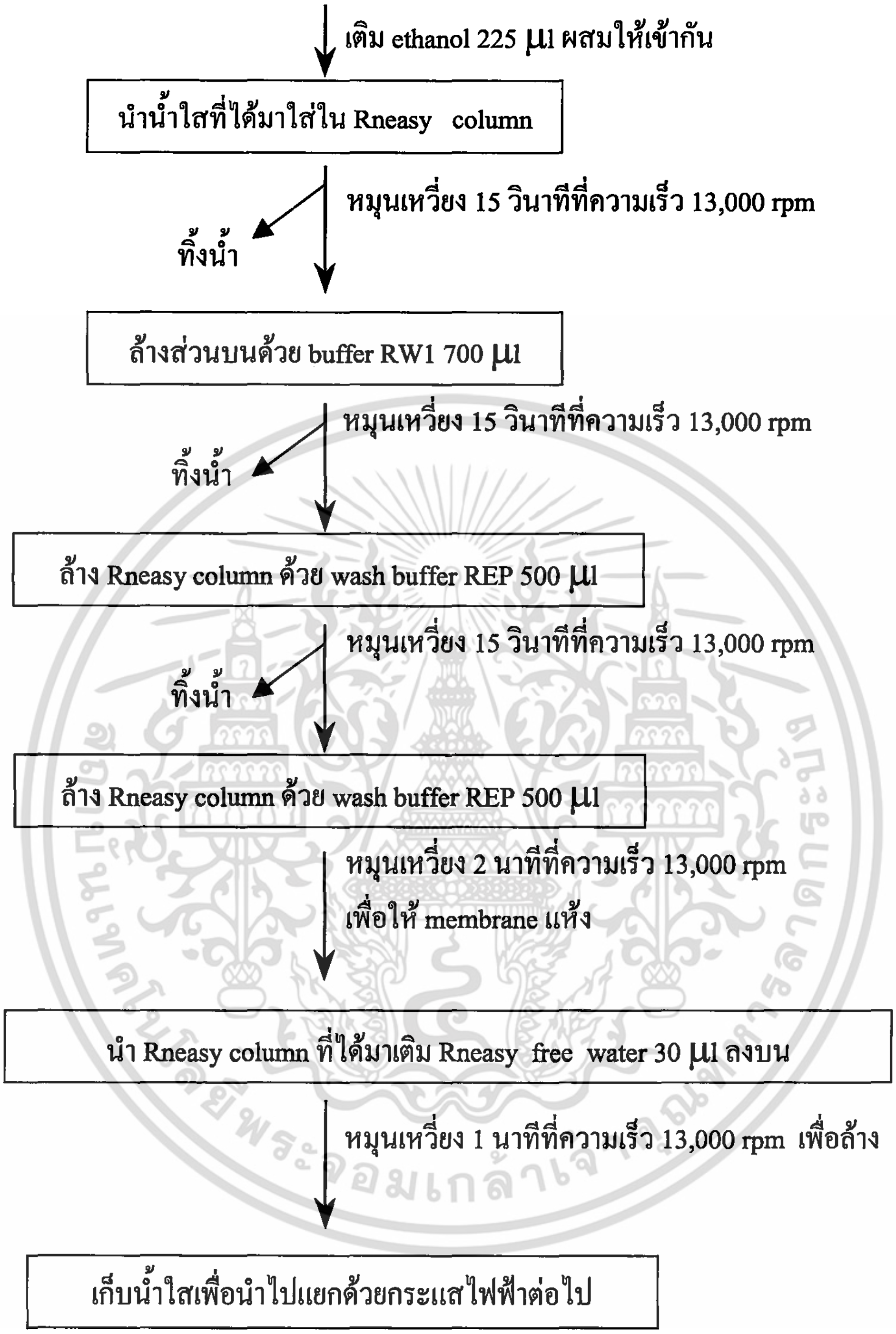
incubate 1-3 นาที ที่ 56 ° C เขย่าบน vortex ช่วงสั้น ๆ

ดูดน้ำใสใส่ QLAshredder spin column

หมุนเหวี่ยง 2 นาที ที่ความเร็ว 13,000 rpm

ดูดน้ำใสใส่ eppendrof

98788


เติม ethanol 225 μl ผสมให้เข้ากัน
นำน้ำใสที่ได้มาใส่ใน Rneasy column
หมุนเหวี่ยง 15 วินาทีที่ความเร็ว 13,000 rpm
ทิ้งน้ำ
ล้างส่วนบนด้วย buffer RW1 700 μl
หมุนเหวี่ยง 15 วินาทีที่ความเร็ว 13,000 rpm
ทิ้งน้ำ
ล้าง Rneasy column ด้วย wash buffer REP 500 μl
หมุนเหวี่ยง 15 วินาทีที่ความเร็ว 13,000 rpm
ทิ้งน้ำ
ล้าง Rneasy column ด้วย wash buffer REP 500 μl
หมุนเหวี่ยง 2 นาทีที่ความเร็ว 13,000 rpm
เพื่อให้ membrane แห้ง
นำ Rneasy column ที่ได้มาเติม Rneasy free water 30 μl ลงบน
หมุนเหวี่ยง 1 นาทีที่ความเร็ว 13,000 rpm เพื่อล้าง
เก็บน้ำใสเพื่อนำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าต่อไป

หมายเหตุ ในการศึกษาใช้ buffer ในการสกัด dsRNA 2 ชนิดคือ buffer RLC และ buffer RLT โดยที่ buffer RLT เหมาะสำหรับใช้สกัดพืชที่มีเมือกและยางเหนียวซึ่งได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* " Snowdrop") และกวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ส่วน buffer RLC ใช้สกัดพืชทั่วๆไปที่ไม่เมือกและยางเหนียวซึ่งได้แก่ ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) และไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena* *godseffiana*) (ศราวุธ , 2544) พร้อมทั้งศึกษาช่วงระยะเวลาการ incubate โดยเพิ่มช่วงระยะเวลาการ incubate จาก 3 นาทีเป็น 5 นาที

3.2 การใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก dsRNA ของเชื้อไวรัส (electrophoresis)

ขั้นตอนการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก dsRNA ของเชื้อตัวกลางที่ใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 0.8% ขนาดของ eletrophoresis tank ที่ใช้ยาว 19.5 กว้าง 8 สูง 4 เซนติเมตร โดยทำการเตรียมตัวอย่างเพื่อแยกสกัด dsRNA ดังนี้

3.2.1 loading buffer ได้แก่ buffer ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างซึ่งประกอบไปด้วยสารละลายของ bromophenol blue 0.05% sucrose 40% ,ETDA pH 8.0 0.1 M และ sodium lauryl sulfate (SDS) 0.5%

3.2.2 เตรียม electrophoresis buffer โดยใช้ TAE buffer (50X) ซึ่งประกอบด้วย Tris 242 g , glacial acetic acid 57.1 ml และ 0.5 M EDTA (pH8.0) 100 ml โดยดูด TAE buffer (50X) มา 6 ml เติมน้ำกลั่นให้ครบ 300 ml แล้วแบ่งมา 50ml เพื่อมาละลาย agarose gel 0.8% ที่เหลือเทใส่ถาด electrophoresis

3.2.3 นำตัวอย่างไวรัสที่ได้จากการแยกสกัด dsRNA 10 μl และ loading buffer 3 μl ผสมให้เข้ากันโดยใช้ micropipette ดูดขึ้นดูดลงแล้วหยอดลงในตัวกลาง (matrix) ที่อยู่ในสนามไฟฟ้า (agarose gel 0.8%) กระแสไฟฟ้าที่ใช้คือ 50 Voltage โดยใช้ระยะเวลา 3 ชั่งโมงครึ่ง หลังจากนั้นทำการย้อม gel ด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 0.1 μg/ml เพื่อสังเกตการเคลื่อนที่ของแถบ (band) dsRNA

3.3 การตรวจสอบและวิเคราะห์

ตรวจสอบโดยนำ gel ที่ได้จากการย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide 0.1 μg/ml แล้วนำมาส่องดูโดยใช้กล่องแสง ultraviolet ที่มีความยาวเคลื่อน 260-302 nm เพื่อดูลักษณะการเคลื่อนที่ของ dsRNA จากลักษณะการเคลื่อนที่ของแถบ (band) dsRNA ที่ตรวจสอบได้นั้นนำมาเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานที่ใช้คือ Lambda DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Hind IIIแล้วถ่ายภาพ พร้อมทั้งวัดระยะทางที่ band เคลื่อนที่ จากนั้นนำมาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างที่ตรวจสอบโดยเปรียบเทียบกับ linear curve

ผลการทดลอง

1. การศึกษาลักษณะอาการของไม้ประดับที่แสดงอาการคล้ายกับอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส

จากการศึกษาลักษณะอาการของไม้ประดับทั้งหมด 5 ชนิด ในวงศ์ Araceae ได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* " Snowdrop") กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) และฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) และในวงศ์ Liliageae ได้แก่ ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) พบว่าพืชแสดงลักษณะอาการแต่ละฤดูกาลดังต่อไปนี้

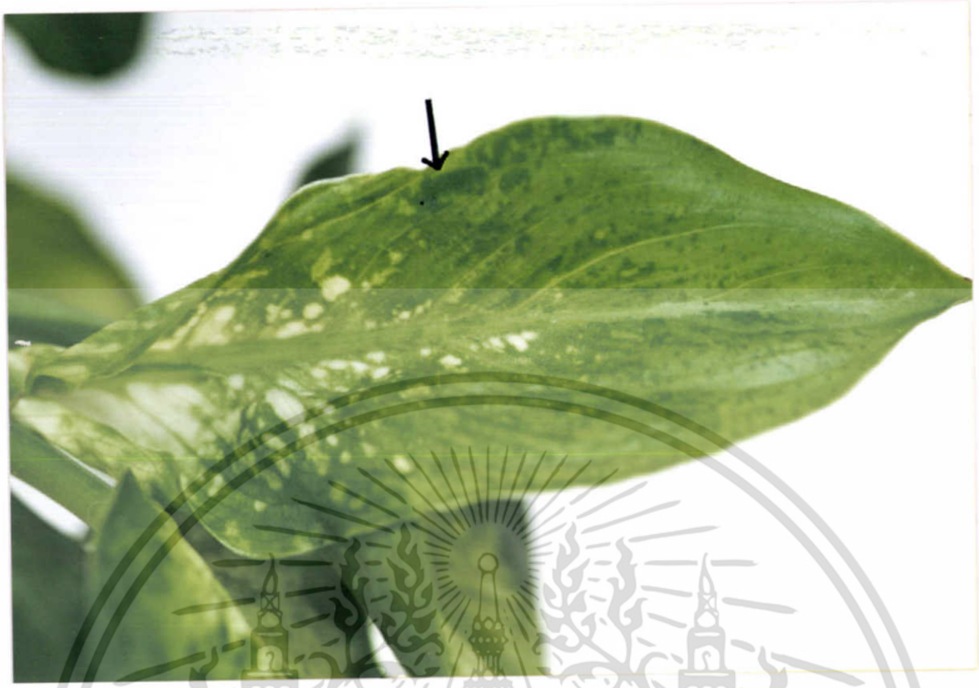
สาวน้อยประแป้ง

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Dieffenbachia picta* "Snowdrop"
วงศ์ : ARACEAE
ชื่อสามัญ : Spotted Dumbcane
อาการ
ฤดูฝน ใบของสาวน้อยประแป้งจะแสดงอาการแผลวงแหวนด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้ม ขอบแผลไม่แน่นอนและลักษณะใบบิดเบี้ยวโดยเฉพาะอย่างยิ่งจะเกิดกับใบอ่อน ต้นมีการเจริญดี (ภาพที่ 3)
ฤดูหนาว ใบของสาวน้อยประแป้งแสดงอาการด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้ม ขอบแผลไม่แน่นอน ลักษณะใบเป็นคลื่นและขอบใบบิดเบี้ยว การเจริญเติบโตของต้นเจริญเติบโตดี
ฤดูร้อน ต้นของสาวน้อยประแป้งเจริญเติบโตช้ากว่าในฤดูฝนและฤดูหนาว ใบของสาวน้อยประแป้งแสดงอาการด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้ม ขอบแผลไม่แน่นอน

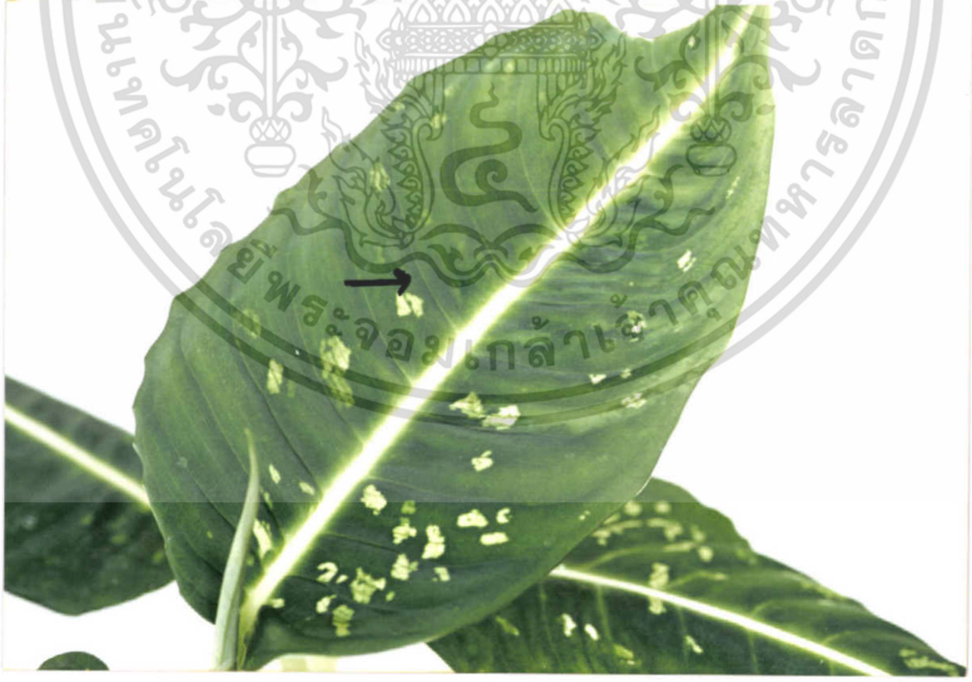
กวักเงิน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Diffenbachia overstedii*
วงศ์ : ARACEAE
ชื่อสามัญ : Silver Evergreen
อาการ
ฤดูฝน ต้นมีการเจริญเติบโตดี ใบของกวักเงินจะแสดงอาการใบด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ผิวใบมีลักษณะเป็นคลื่นไม่เรียบ (ภาพที่ 4)

18992



ภาพที่ 3 อาการของใบสาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* "Snowdrop") แสดงอาการด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้ม (ลูกศรชี้) ขอบแผลไม่แน่นอนและลักษณะใบบิดเบี้ยว



ภาพที่ 4 อาการของกวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ใบของกวักเงินแสดงอาการใบเป็นปื้นสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ (ลูกศรชี้) ผิวใบมีลักษณะเป็นคลื่นไม่เรียบ

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ฤดูหนาว ต้นมีการเจริญเติบโตเหมือนในฤดูฝน ใบของกวักเงินแสดงอาการด่างใบเป็นปื้นสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ผิวใบเป็นคลื่นไม่เรียบ อาจจะเกิดอาการรุนแรงในใบอ่อนและจะลดลงเมื่อใบแก่

ฤดูร้อน การเจริญเติบโตของต้นเจริญเติบโตช้ามากกว่าในฤดูฝนและหนาว ลำต้นแคระแกรน ใบของกวักเงินแสดงอาการใบเป็นปื้นสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ผิวใบเป็นคลื่นไม่เรียบ

ไผ่ฟิลิปปินส์

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Dracaena godseffiana*

วงศ์ : LILIAGEAE

ชื่อสามัญ : Gold-Dust Dracaena

อาการ

ฤดูฝน ต้นมีการเจริญเติบโตดี ใบมีลักษณะเป็นจุดลายสีขาวอมเหลืองหรือสีเหลืองเล็กๆ กระจายอยู่ทั่วทั้งใบ อาการจะรุนแรงมากในใบอ่อนและลดลงเมื่อใบแก่ (ภาพที่ 5)

ฤดูหนาว ลักษณะอาการเหมือนในฤดูฝน ใบมีลักษณะเป็นจุดสีขาวอมเหลืองหรือสีเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วทั้งใบ ต้นมีการเจริญเติบโตดี

ฤดูร้อน อาการรุนแรงมากกว่าในฤดูฝนและในฤดูหนาวโดยเฉพาะที่ใบอ่อน ลักษณะใบมีจุดเป็นวงสีเหลืองขนาดใหญ่กระจายทั่วทั้งใบ การเจริญเติบโตของต้นค่อนข้างช้า (ภาพที่ 6)

ฟิโลเดนดรอน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Philodendron microstictum*

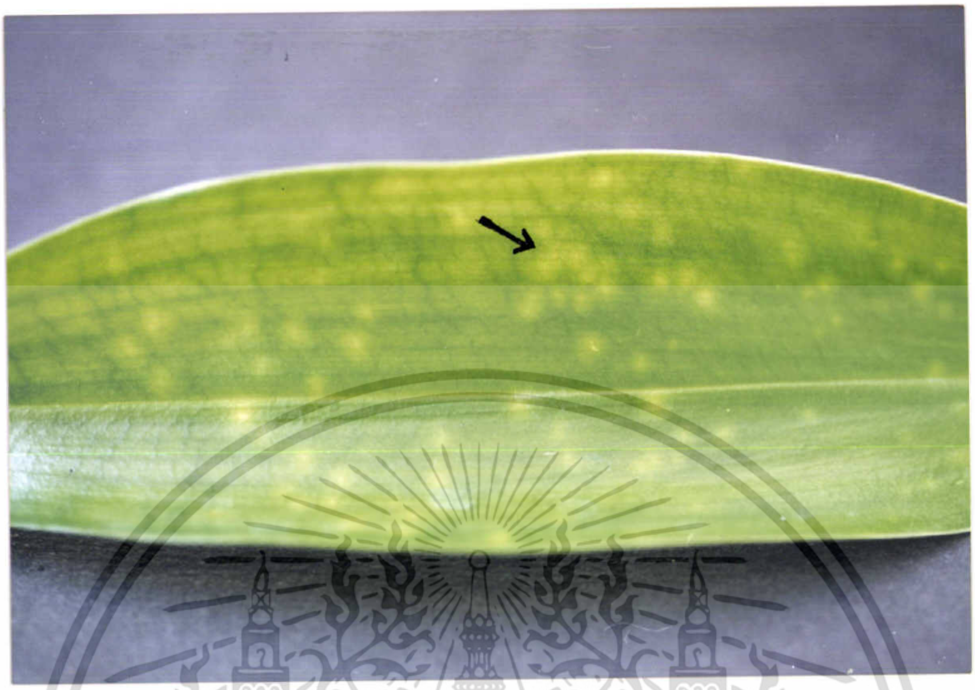
วงศ์ : ARACEAE

ชื่อสามัญ : Philodendron

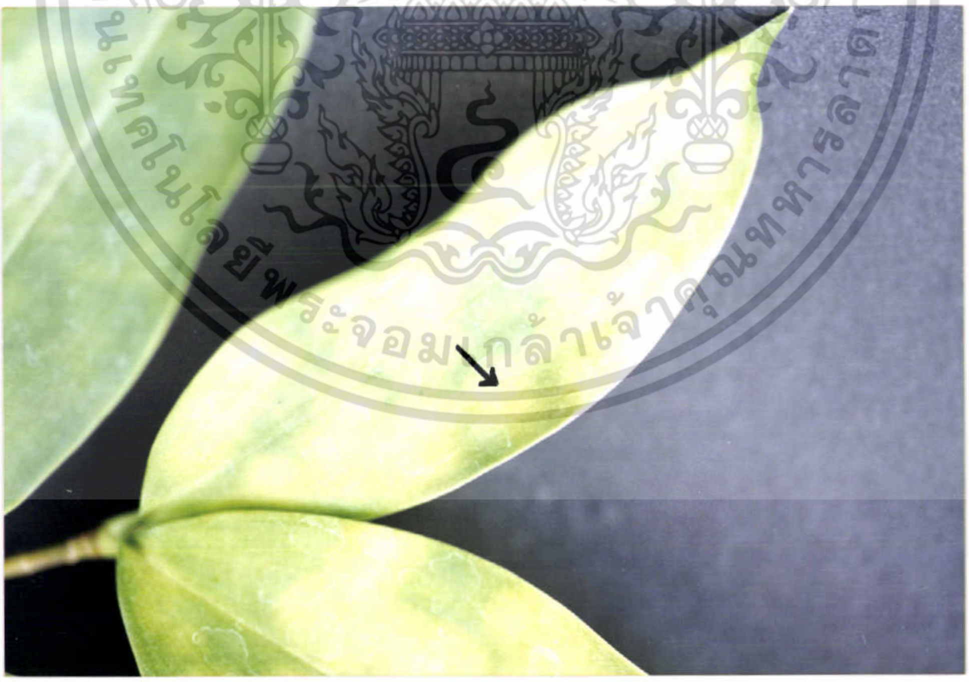
อาการ

ฤดูฝน ต้นมีการเจริญเติบโตดี ใบของฟิโลเดนดรอนที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายจะมีลักษณะอาการใบด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้มเกือบทั้งใบ ตามขอบใบมีลักษณะหงิกงอ ม้วนลง (ภาพที่ 7)

ฤดูหนาว ต้นมีการเจริญเติบโตดี ลักษณะอาการเหมือนในฤดูฝนโดยมีอาการใบด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้มเกือบทั้งใบ ตามขอบใบมีลักษณะหงิกงอ ม้วนลง



ภาพที่ 5 อาการฤดูฝนและฤดูหนาวของไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) แสดงอาการใบเป็นจุดสีขาวอมเหลืองหรือสีเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วทั้งใบ (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 6 อาการฤดูร้อนของไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) ใบแสดงอาการจุดเป็นวงสีเหลืองขนาดใหญ่กระจายทั่วทั้งใบ (ลูกศรชี้)

ฤดูร้อน ต้นมีลักษณะแคระแกรนมีการเจริญเติบโตช้ากว่าฤดูฝนและฤดูหนาว อาการใบเช่นเดียวกับในฤดูฝนและฤดูหนาว มีลักษณะอาการด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้มเกือบทั้งใบ ขอบใบมีลักษณะหงิกงอ ม้วนลง

ฟิโลเดนดรอน

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Philodendron panduraeforme*
วงศ์ : ARACEAE
ชื่อสามัญ : Philodendron
อาการ

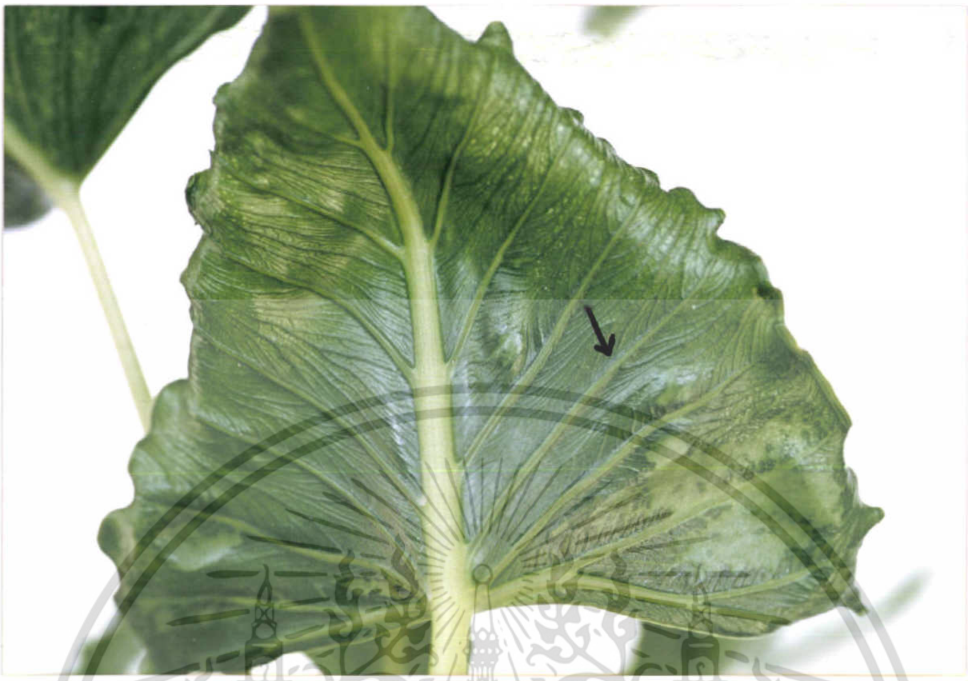
ฤดูฝน ต้นมีการเจริญเติบโตดี ใบของ *Philodendron panduraeforme* ที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายจะมีอาการใบด่างเป็นจุดสีขาวอมเหลือง ขอบแผลสีเขียวเข้มกระจายทั่วทั้งใบ อาการรุนแรงมากในใบอ่อนและลดลงเมื่อใบแก่ (ภาพที่ 8)

ฤดูหนาว ลักษณะอาการที่แสดงของใบ *Philodendron panduraeforme* มีอาการเหมือนในฤดูฝน ใบแสดงอาการด่างเป็นจุดสีขาวอมเหลือง ขอบแผลสีเขียวเข้มกระจายทั่วทั้งใบ

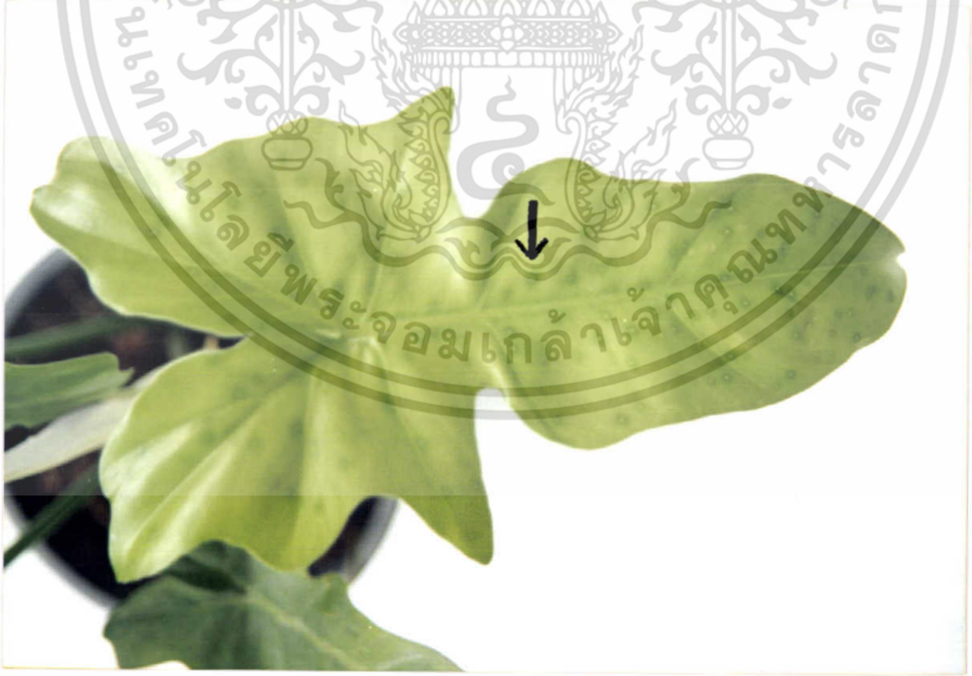
ฤดูร้อน ต้นมีการเจริญเติบโตดี อาการที่แสดงออกค่อนข้างรุนแรงมากในใบอ่อน โดยใบมีอาการเป็นจุดสีเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วทั้งใบ บางจุดตรงกลางแผลเป็นจุดไหม้สีน้ำตาลอ่อน ตามแนวเส้นใบปรากฏอาการด่างสีเขียวเข้ม (ภาพที่ 9)

2. การตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสของไม้ประดับบางชนิดในวงศ์ Areceae และวงศ์ Liliageae ด้วยเทคนิค ELISA แบบ Direct ELISA

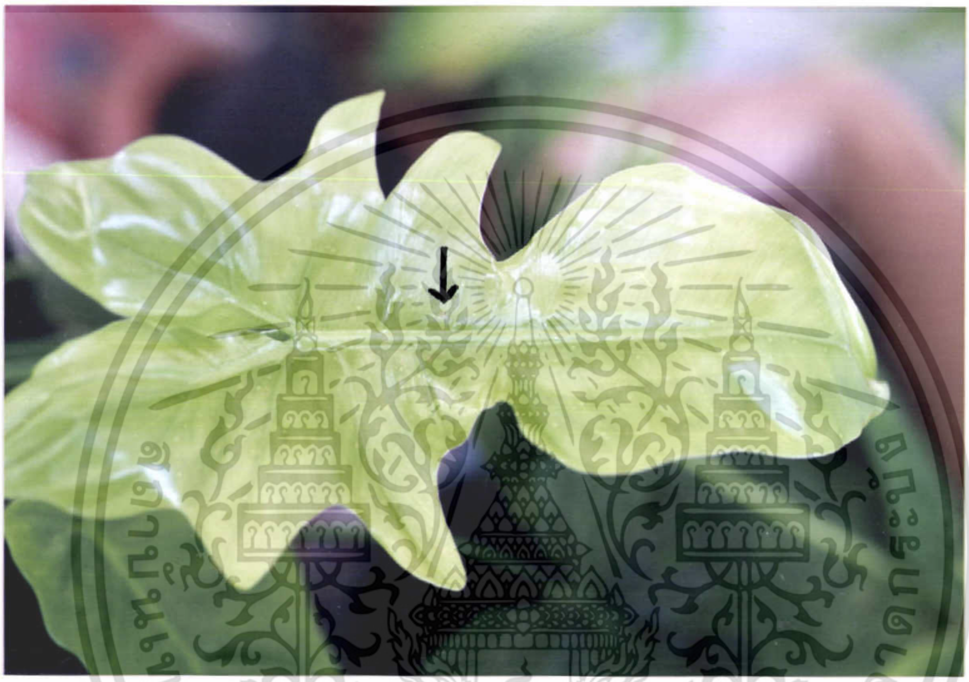
จากการตรวจสอบพบว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใน polystyrene plate โดยแบ่งปฏิกิริยาออกเป็น 4 ระดับ คือ ระดับ 3 สีเหลืองเข้ม หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสสูง ระดับ 2 สีเหลือง หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสปานกลาง ระดับ 1 สีเหลืองอ่อน หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสต่ำ ระดับ 0 ไม่เกิดสี หมายถึง ไม่มีปริมาณเชื้อไวรัส โดยทำการเปรียบเทียบกับหลุมเปรียบเทียบ คือ disease control 2 หลุม พบว่าน้ำคั้นจากตัวอย่างพืชไม้ประดับทั้งหมด 5 ชนิด ในวงศ์ Araceae ได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* “ Snowdrop”) กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) และฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) และในวงศ์ Liliageae ได้แก่ ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*)



ภาพที่ 7 อาการของฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microsticum*)ใบมีลักษณะด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้มเกือบทั้งใบ (ลูกศรชี้) ตามขอบใบมีลักษณะหงิกงอ ม้วนลง



ภาพที่ 8 อาการฤดูฝนและฤดูหนาวของฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) ใบมีอาการด่างเป็นจุดสีขาวอม เหลือง ขอบแผลสีเขียวเข้มกระจายทั่วใบ (ลูกศรชี้)



ภาพที่ 9 อาการฤดูร้อนของฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) ใบมีอาการเป็นจุดสีเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วทั้งใบ บางจุดตรงกลางแผลมีอาการไหม้สีน้ำตาลอ่อน ตามแนวเส้นใบปรากฏอาการด่างสีเขียวเข้ม (ลูกศรชี้)

เกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 3 ส่วนในหลุมเปรียบเทียบ คือ disease control เกิดปฏิกิริยาระดับ 3 ซึ่งแสดงว่าพืชทั้ง 5 ชนิดถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) โดยปริมาณเชื้อในพืชที่เป็นโรคอยู่ในระดับสูง (ภาพที่ 10)

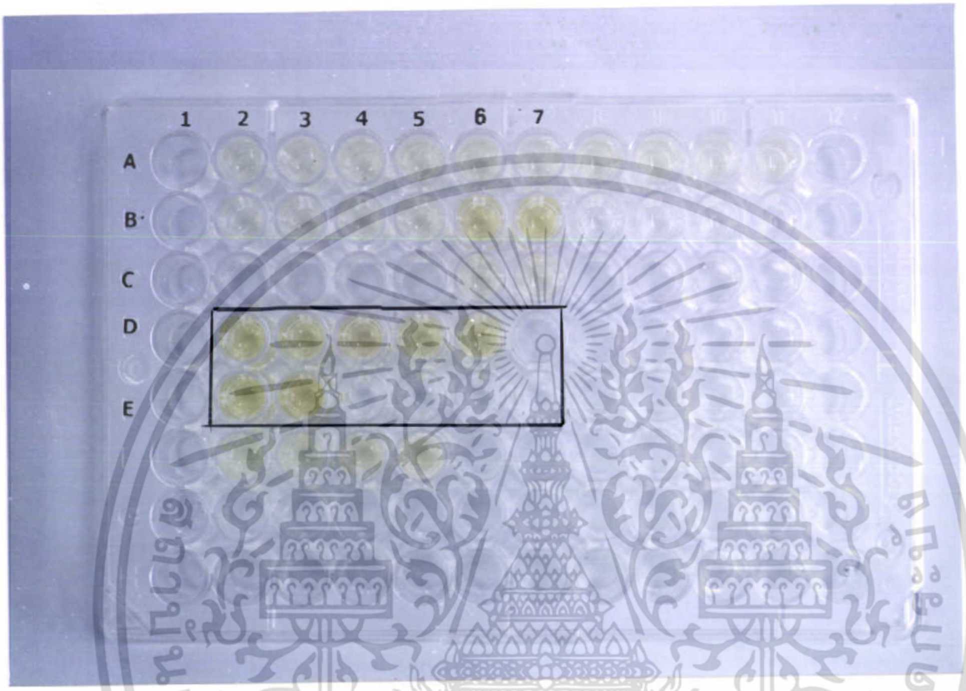
3. การตรวจสอบและวิเคราะห์ผลการสกัด dsRNA ของเชื้อไวรัส

ผลการตรวจสอบการแยกสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA) จากตัวอย่างใบไม้ประดับบางชนิดทั้งหมด 5 ชนิด ในวงศ์ Araceae ได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* "Snowdrop") กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) และฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) และในวงศ์ Liliageae ได้แก่ ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) ที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสโดยแบ่งการสกัด dsRNA ออกเป็น 3 ฤดู คือ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน ผลปรากฏ pattern ที่ปรากฏแถบของ dsRNA ดังนี้

ฤดูฝน

ช่วงระยะเวลาตั้งแต่เดือนมิถุนายน - เดือนตุลาคม 2545

ผลการตรวจสอบกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA) จากใบพืชไม้ประดับทั้งหมด 5 ชนิด ในวงศ์ Araceae ได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* " Snowdrop") กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) และฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) และในวงศ์ Liliageae ได้แก่ ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) ในฤดูฝนผลปรากฏว่ากวักเงินปรากฏแถบของ dsRNA แยกตัวให้เห็นเมื่อใช้ buffer RLT ในการสกัด โดยแถบ dsRNA ค่อนข้างเจือจางและปรากฏให้เห็นเพียงแถบยาวเป็นปื้นไม่แยกชัดเจน ในสาวน้อยประแป้งก็ปรากฏแถบของ dsRNA แยกตัวให้เห็นด้วยเช่นกันโดย buffer ที่ใช้คือ RLC โดยที่แถบdsRNA ของสาวน้อยประแป้งค่อนข้างเจือจางมากและแยกให้เห็นเพียงแถบเดียว (ภาพที่ 11) เมื่อวัดระยะทางการเคลื่อนที่ของกวักเงินได้ 6.1 ซม. และของสาวน้อยประแป้งได้ 6.3 ซม. และเมื่อนำระยะทางที่แถบเคลื่อนที่มาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยการ plot กราฟเปรียบเทียบระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานกับน้ำหนักโมเลกุลของตัวมาตรฐาน โดยแกนนอนเป็นระยะทางการเคลื่อนที่ได้เป็นเซนติเมตร แกนตั้งเป็นน้ำหนักโมเลกุล ปรากฏว่าสามารถวัดน้ำหนักโมเลกุลของกวักเงินได้ 0.30×10^6 dalton และวัดน้ำหนักโมเลกุลของสาวน้อยประแป้งได้ 0.29×10^6 dalton (ภาพที่12)



ภาพที่ 10 แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาของไม้ประดับบางชนิดในวงศ์ Araceae และวงศ์ Liligaeae ดังนี้

หลุมที่ 2D น้ำคั้นจากใบกวักเงิน (*Diffenbachia overstedii*)

หลุมที่ 3D น้ำคั้นจากใบสาวน้อยประแป้ง (*D. picta* "snowdrop")

หลุมที่ 4D น้ำคั้นจากใบไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godesfiana*)

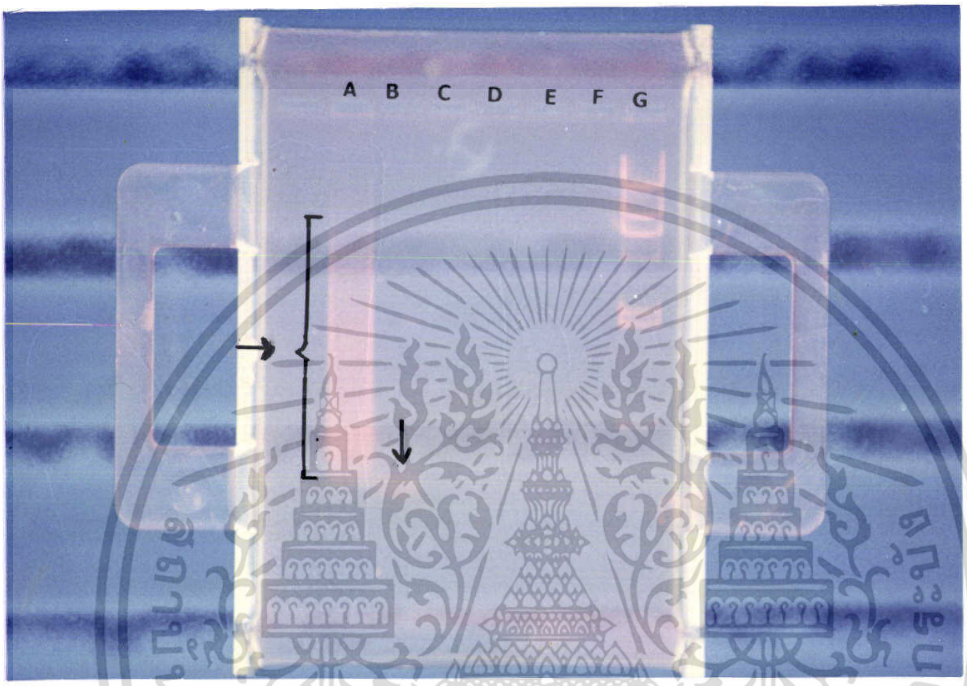
หลุมที่ 5D น้ำคั้นจากใบฟิโลเดนดรอน (Philodendron panduraeforme)

หลุมที่ 6D น้ำคั้นจากใบฟิโรเดนดรอน (*Philodendron microstitum*)

หลุมที่ 2E และ 3E คือ Disease control

หลุมที่ 4E และ 5E คือ Enzyme control

หลุมที่ 6E และ 7E คือ Substrate control



ภาพที่ 11 แสดง pattern ของ dsRNA band จากการแยกสกัดในช่วงฤดูฝนจากไม้ประดับในวงศ์ Araceae และวงศ์ Liligaeae ที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส โดยที่

Land A คือ แถบ band ของกวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) (ลูกศรชี้)

Land B คือ แถบ band ของสาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* “Snowdrop ”) (ลูกศรชี้)

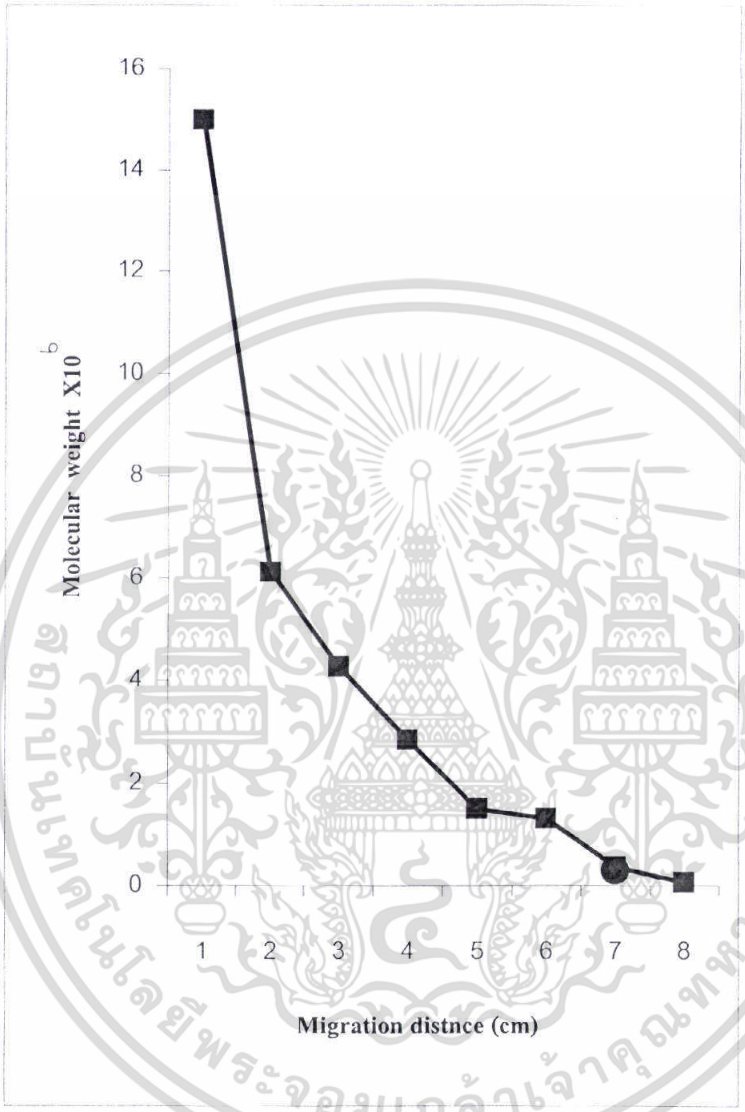
Land C คือ ตัวอย่างจากฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*)

Land D คือ ตัวอย่างจากไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godesffiana*)

Land E คือ ตัวอย่างจากฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*)

Land F คือ ตัวอย่างจากมะลิ

Land G คือ pattern ของ Lambda DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Hind III



ภาพที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของ dsRNA ของกวักเงิน (*Diffenbachia overstedii*) และสาวน้อยประแป้ง (*Diffenbachia picta* “Snowdrop”) บน gel กับน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA ที่ได้โดยการ plot กราฟ. ■——■ lambda DNA และ ▲——▲ dsRNA ของกวักเงิน ●——● dsRNA ของสาวน้อยประแป้ง

ฤดูหนาว

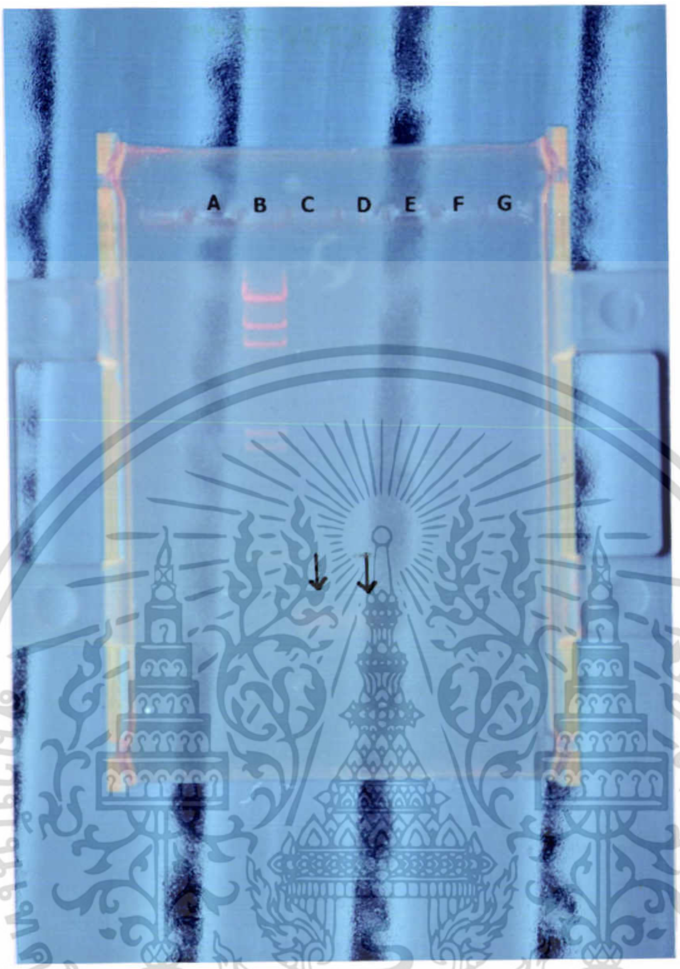
ช่วงระยะเวลาตั้งแต่ เดือนพฤศจิกายน 2545 – เดือนกุมภาพันธ์2546

ผลการตรวจสอบกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA) จากใบไม้ประดับทั้งหมด 5 ชนิด ในวงศ์ Araceae ได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* " Snowdrop") กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) และฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) และในวงศ์ Liliageae ได้แก่ ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) ในฤดูหนาวผลปรากฏว่าตัวอย่างจากต้นกวักเงินเท่านั้นที่ปรากฏแถบ dsRNA แยกให้เห็นโดย buffer ที่ใช้สกัดคือ RLT และใช้เวลาในการ incubate ที่ 56 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที โดยแถบของ dsRNA ค่อนข้างเจือจางและแยกตัวให้เห็นแถบเพียงแถบเดียว (ภาพที่ 13) เมื่อวัดระยะทางการเคลื่อนที่ได้ 5.5 ซม.และเมื่อนำระยะทางที่แถบเคลื่อนที่มาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลโดยการ plot กราฟเปรียบเทียบระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานกับน้ำหนักโมเลกุลของตัวมาตรฐานโดยแกนนอนเป็นระยะทางเคลื่อนที่ได้เป็นเซนติเมตร แกนตั้งน้ำหนักโมเลกุลปรากฏว่าสามารถวัดน้ำหนักโมเลกุลได้ 0.31×10^6 dalton (ภาพที่ 14)

ฤดูร้อน

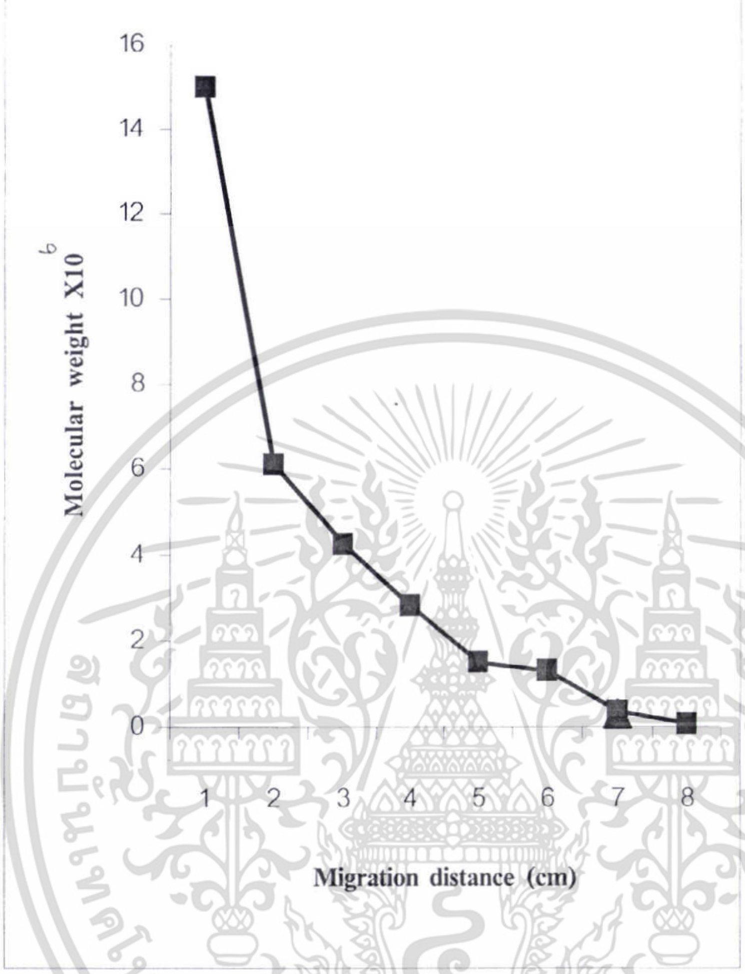
ช่วงระยะเวลาตั้งแต่ เดือนมีนาคม – เดือนพฤษภาคม 2546

ผลการตรวจสอบกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA) จากใบไม้ประดับทั้งหมด 5 ชนิด ในวงศ์ Araceae ได้แก่ สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* " Snowdrop") กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstitum*) และฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) และในวงศ์ Liliageae ได้แก่ ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) ในฤดูร้อนผลปรากฏว่ามีเพียงฟิโลเดนดรอนเท่านั้นที่ปรากฏแถบ dsRNA แยกให้เห็นและ buffer ที่ใช้สกัดคือ buffer RLC และใช้เวลาในการ incubate ที่ 56 องศาเซลเซียสนาน 5 นาที โดยแถบของ dsRNA ค่อนข้างเจือจางและแยกตัวให้เห็นเพียงแถบยาวเป็นปื้นไม่แถบแยกชัดเจน (ภาพที่ 15) เมื่อวัดระยะทางการเคลื่อนที่ได้ 8.0 ซม.และเมื่อนำระยะทางที่แถบเคลื่อนที่มาคำนวณน้ำหนักโมเลกุลโดยการ plot กราฟเปรียบเทียบระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานกับน้ำหนักโมเลกุลของตัวมาตรฐานโดยแกนนอนเป็นระยะทางเคลื่อนที่ได้เป็นเซนติเมตร แกนตั้งน้ำหนักโมเลกุลปรากฏว่าสามารถวัดน้ำหนักโมเลกุลได้ 0.34×10^6 dalton (ภาพที่ 16)

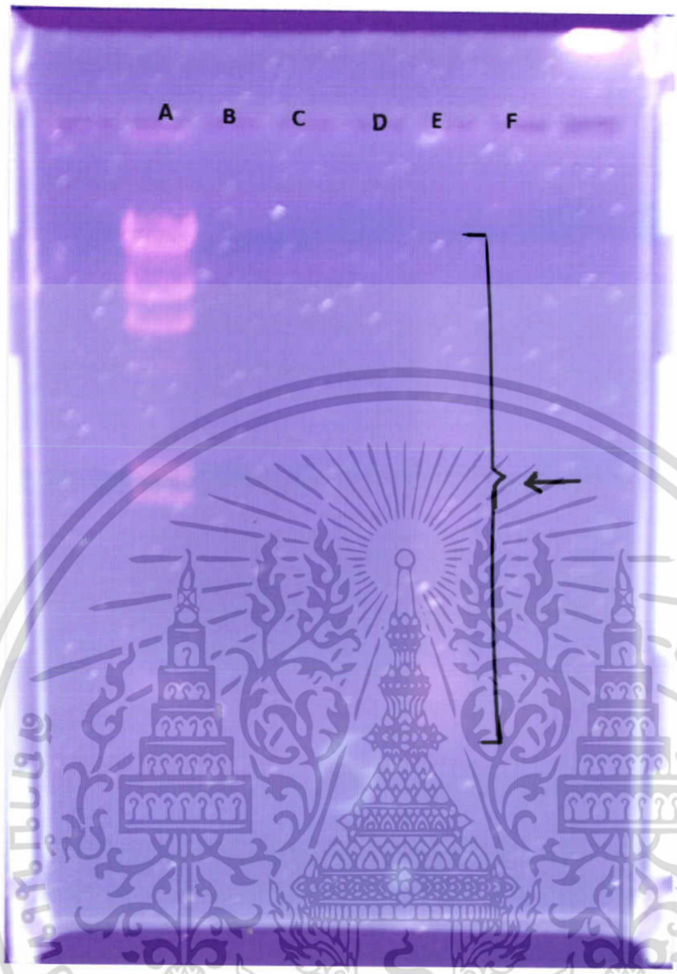


ภาพที่ 13 แสดง pattern ของ dsRNA band จากการแยกสกัดในช่วงฤดูหนาวจากไม้ประดับในวงศ์ Araceae และวงศ์ Liligaeae ที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัส โดยที่

Land A	คือ	ตัวอย่างจากไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godesffiana*)
Land B	คือ	pattern ของ Lambda DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Hind III
Land C,D	คือ	แถบ band ของกวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) (ลูกศรชี้)
Land E	คือ	ตัวอย่างจากฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*)
Land F	คือ	ตัวอย่างจากฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*)
Land G	คือ	ตัวอย่างจากสาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* "Snowdrop")



ภาพที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของ dsRNA ของกวักเงิน (*Diffenbachia overstedii*) บน gel กับน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA ที่ได้โดยการ plot กราฟ ■——■ lambda DNA และ ▲——▲ dsRNA ของกวักเงิน



ภาพที่ 15 แสดง pattern ของ dsRNA จากการแยกสกัดในฤดูร้อนจากไม้ประดับในวงศ์ Araceae และวงศ์ Liligaeae ที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสโดยที่

Land A คือ pattern ของ Lambda DNA ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Hind III

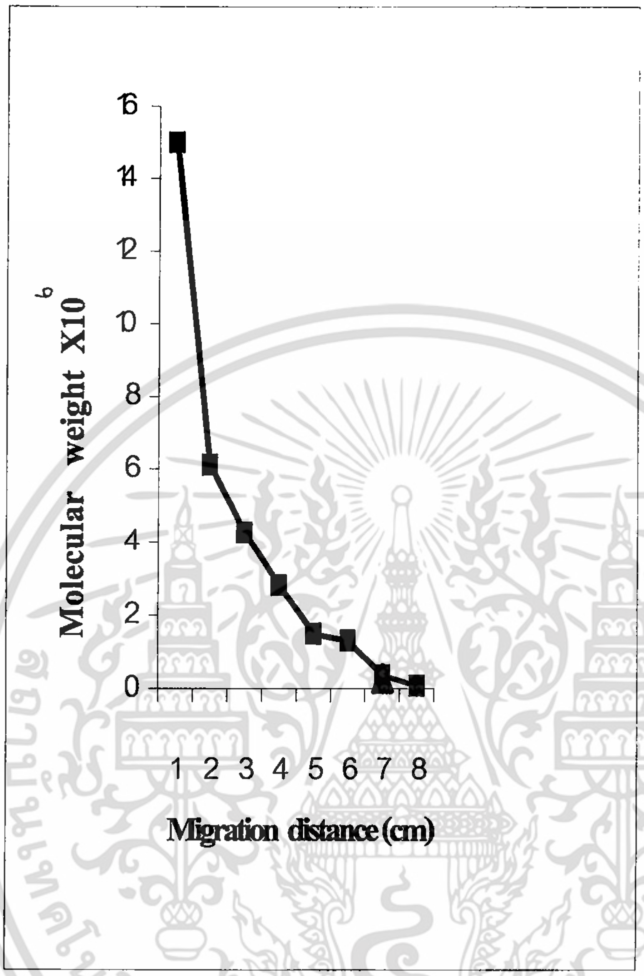
Land B คือ ตัวอย่างจากกวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*)

Land C คือ ตัวอย่างจากสาวน้อยประแป้ง (*D. picta* "Snowdrop")

Land D คือ ตัวอย่างจากฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*)

Land E คือ แถบ band ของฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*) (ลูกศรชี้)

Land F คือ ตัวอย่างจากไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godesffiana*)



ภาพที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของ dsRNA ของฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*) บน gel กับน้ำหนักโมเลกุลของ dsRNA ที่ได้โดยการ plot กราฟ ■ —— ■ lambda DNA และ ▲ —— ▲ dsRNA ของฟิโลเดนดรอน

จากการแสดงลักษณะการเกิดอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสของไม้ประดับและผลการตรวจสอบโดยวิธีการสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA extraction) ของไม้ประดับทั้ง 5 ชนิดในแต่ละช่วงฤดูกาลสรุปผลออกมาเป็นตารางดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของฤดูกาลต่ออาการของไม้ประดับและผลการตรวจสอบโดยวิธีการสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA extraction) ของไม้ประดับทั้ง 5 ชนิดในช่วง ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน

ชื่อพืช	อาการของไม้ประดับและผลการตรวจสอบdsRNA					
	ฤดูฝน		ฤดูหนาว		ฤดูร้อน	
	อาการของพืช	ระดับการตรวจสอบ dsRNA	อาการของพืช	ระดับการตรวจสอบ dsRNA	อาการของพืช	ระดับการตรวจสอบ dsRNA
สาวน้อยประแป้ง (*D. picta* "Snowdrop")	* * *	+	* * *	-	* *	-
กวักเงิน (*D. overstedii*)	* * *	++	* * *	+	* * *	-
ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*)	* * *	-	* * *	-	* * *	-
ฟิโลเดนดรอน (*P. microstictum*)	* * *	-	* * *	-	* * *	++
ฟิโลเดนดรอน (*P. panduraeforme*)	* * *	-	* * *	-	* * *	-

หมายเหตุ

* * * : อาการของโรคชัดเจน

* * : อาการของโรคปานกลาง

* : อาการของโรคไม่ชัดเจน

+ + + : การแยกแถบ dsRNA ชัดเจน

+ + : การแยกแถบ dsRNA ปานกลาง

+ : การแยกแถบ dsRNA ไม่ชัดเจน

จากตารางที่ 1 แสดงผลของฤดูกาลต่ออาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสของไม้ประดับและระดับของผลการตรวจสอบโดยวิธีการสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA extraction) ของไม้ประดับทั้ง 5 ชนิดในช่วงฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน ผลปรากฏว่า สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbachia picta* “Snowdrop”) ในฤดูฝนและฤดูหนาวแสดงลักษณะอาการด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้ม ขอบแผลไม่แน่นอนอย่างชัดเจน ส่วนในฤดูร้อนแสดงลักษณะอาการของเชื้อไวรัสในระดับปานกลาง ผลการตรวจสอบ dsRNA พบการแยกแถบไม่ชัดเจนโดยปรากฏแถบสุดท้ายเพียงแถบเดียวและพบแถบเฉพาะในฤดูฝนเพียงฤดูเดียว กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) แสดงลักษณะอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสโดยแสดงอาการใบเป็นปื้นสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ผิวใบมีลักษณะเป็นคลื่นไม่เรียบอย่างชัดเจนทั้ง 3 ฤดูกาล และผลการตรวจสอบ dsRNA ในฤดูฝนพบการแยกแถบของ dsRNA ในระดับปานกลางโดยแถบแยกออกมาเป็นปื้น ในฤดูหนาวการแยกแถบของ dsRNA ไม่ค่อยชัดเจนโดยเห็นเพียงแถบสุดท้าย ส่วนในฤดูร้อนไม่ปรากฏการแยกแถบ dsRNA ของกวักเงิน ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) และฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) พบว่าไม้ประดับทั้ง 2 ชนิดแสดงอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสอย่างชัดเจนในทั้ง 3 ฤดูกาลโดยไผ่ฟิลิปปินส์แสดงอาการแผลจุดสีขาวอมเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วทั้งใบ และฟิโลเดนดรอนแสดงจุดด่างสีขาวอมเหลือง กระจายทั่วทั้งใบ ส่วนผลการตรวจสอบ dsRNA ของไม้ประดับทั้ง 2 ชนิดพบว่าไม่ปรากฏแถบของ dsRNA เลยในทั้ง 3 ฤดูกาล ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*) แสดงอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสอย่างชัดเจนในทั้ง 3 ฤดูกาลโดยแสดงอาการด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้มเกือบทั้งใบ ตามขอบใบหงิกงอ ม้วนลง และผลการตรวจสอบ dsRNA พบการแยกแถบเป็นปื้นในระดับปานกลางในช่วงฤดูร้อนเพียงฤดูเดียว จากการตรวจสอบ dsRNA ของไม้ประดับทั้ง 5 ชนิดในทั้ง 3 ฤดูกาลพบว่าในช่วงฤดูฝนการแยกสกัด dsRNA มีแนวโน้มจะได้ผลดีกว่าในฤดูหนาวและฤดูร้อน แต่อย่างไรก็ตามฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*) การตรวจสอบกับได้ผลดีในฤดูร้อน

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการนำตัวอย่างพืชไม้ประดับทั้งหมด 5 ชนิดในวงศ์ Araceae และวงศ์ Liliageae ที่แสดงอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสจากโรงเรือนเพาะชำภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร พบกลุ่มอาการดังนี้คือ อาการด่าง (mosaic) อาการหงิกงอบิดเบี้ยว (leaf distortion) อาการแคระแกรน (stunting) และแผลจุดเหลือง (chlorotic spots) ซึ่งอาการเหล่านี้มักเกิดกับใบอ่อนและอาการจะค่อยๆลดเมื่อเป็นใบแก่ และเมื่อนำตัวอย่างพืชทั้ง 5 ชนิดมาทำการทดสอบปฏิกิริยา ELISA เพื่อวินิจฉัยชนิดของเชื้อที่เข้าทำลาย พบว่าไม้ประดับทั้ง 5 ชนิดถูกเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) เข้าทำลายและเกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 3 คือ มีปริมาณเชื้อไวรัสสูง ดังการรายงานและศึกษาว่าปัจจุบันพืชในวงศ์ Araceae ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายเป็นจำนวนมาก เช่น สาวน้อยประแป้ง กวักเงิน ฟิโลเดนดรอน มีรายงานว่าถูกเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) เข้าทำลาย (Abo El – nil *et al.* 1977) นอกจากนี้พบการรายงานว่าพืชในตระกูล *Dieffenbachia sp.* หลายชนิดที่ปลูกเพื่อทำเป็นการค้าพบเชื้อ DMV เป็นสาเหตุการเข้าทำลาย (Chase and Zetter , 1982) และเมื่อนำใบอ่อนที่แสดงอาการเนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายของไม้ประดับทั้ง 5 ชนิด จากทั้ง 3 ฤดูกาล คือ ฤดูฝน ฤดูหนาว และฤดูร้อน มาทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิกสายคู่ของเชื้อ (dsRNA extraction) พบว่าในฤดูฝน กวักเงิน และสาวน้อยประแป้ง ที่ใช้ buffer RLT สกัดปรากฏแถบของ dsRNA แยกตัวให้เห็นเนื่องจาก buffer RLT เป็น buffer ที่เหมาะสมต่อการสกัดพืชที่มีเมือกและยางเหนียว ในฤดูหนาว มีเพียงต้นกวักเงินที่ใช้ buffer RLT สกัดเท่านั้นที่ปรากฏแถบ dsRNA แยกตัวให้เห็นและในการสกัดครั้งนี้มีการเพิ่มช่วงระยะเวลาการ incubate จาก 3 นาที เป็น 5 นาที ในฤดูร้อน ผลปรากฏว่าเฉพาะแถบของต้นฟิโลเดนดรอนที่ใช้ buffer RLC สกัดเท่านั้นที่ปรากฏแถบ dsRNA โดยใช้เวลาในการ incubate นาน 5 นาที จากการทดลองดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า buffer RLT เหมาะสมต่อการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อไวรัสจากพืชที่มีเมือกและยางเหนียว เช่น กวักเงิน สาวน้อยประแป้ง ส่วน buffer RLC เหมาะสมต่อการสกัด dsRNA ของเชื้อไวรัสจากพืชที่ไม่มีเมือกและยางเหนียว เช่น ฟิโลเดนดรอน ไผ่ฟิลิปปินส์ ส่วนช่วงระยะเวลาในการ incubate ที่เหมาะสมต่อการสกัด dsRNA ของเชื้อไวรัสคือ 5 นาที ส่วนผลของฤดูกาลที่มีผลต่อการเกิดอาการของเชื้อไวรัสและระดับของผลการตรวจสอบโดยวิธีการสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ของเชื้อผลปรากฏว่า สาวน้อยประแป้ง (*Dieffenbbachia picta* “Snowdrop”) ในฤดูฝนและฤดูหนาวแสดงลักษณะอาการด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้ม ขอบแผลไม่แน่นอนอย่างชัดเจน ส่วนในฤดูร้อนแสดงลักษณะอาการของเชื้อไวรัสในระดับปานกลาง ผลการตรวจสอบ dsRNA พบการแยกแถบไม่

ชัดเจนโดยปรากฏแถบสุดท้ายเพียงแถบเดียวและพบแถบเฉพาะในฤดูฝนเพียงฤดูเดียวโดยวัดค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ 0.29 x 10^6 dalton กวักเงิน (*Dieffenbachia overstedii*) แสดงลักษณะอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสโดยแสดงอาการใบเป็นปื้นสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ผิวใบมีลักษณะเป็นคลื่นไม่เรียบอย่างชัดเจนทั้ง 3 ฤดูกาล และผลการตรวจสอบ dsRNA ในฤดูฝนพบการแยกแถบของ dsRNA ในระดับปานกลางโดยแถบแยกออกมาเป็นปื้นวัดค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ 0.30 x 10^6 dalton ในฤดูหนาวการแยกแถบของ dsRNA ไม่ค่อยชัดเจนโดยเห็นเพียงแถบสุดท้ายวัดค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ 0.31 x 10^6 dalton ส่วนในฤดูร้อนไม่ปรากฏการแยกแถบ dsRNA ของกวักเงิน ไผ่ฟิลิปปินส์ (*Dracaena godseffiana*) และฟิโลเดนดรอน (*Philodendron panduraeforme*) พบว่าไม้ประดับทั้ง 2 ชนิดแสดงอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสอย่างชัดเจนในทั้ง 3 ฤดูกาลโดยไผ่ฟิลิปปินส์แสดงอาการแผลจุดสีขาวอมเหลืองเล็กๆ กระจายทั่วทั้งใบ และฟิโลเดนดรอนแสดงจุดด่างสีขาวอมเหลือง กระจายทั่วทั้งใบ ส่วนผลการตรวจสอบ dsRNA ของไม้ประดับทั้ง 2 ชนิดพบว่าไม่ปรากฏแถบของ dsRNA เลยในทั้ง 3 ฤดูกาล ฟิโลเดนดรอน (*Philodendron microstictum*) แสดงอาการที่เกิดจากเชื้อไวรัสอย่างชัดเจนในทั้ง 3 ฤดูกาลโดยแสดงอาการด่างเป็นปื้นสีเขียวเข้มเกือบทั้งใบ ตามขอบใบหงิกงอ ม้วนลง และผลการตรวจสอบ dsRNA พบการแยกแถบเป็นปื้นในระดับปานกลางในช่วงฤดูร้อนเพียงฤดูเดียววัดค่าน้ำหนักโมเลกุลได้ 0.34 x 10^6 dalton จากการทดลองทั้ง 3 ฤดูกาล พบว่าในช่วงฤดูฝนการแยกสกัด dsRNA เพื่อศึกษาความเข้มข้นจะได้ผลดีกว่าในฤดูหนาวและฤดูร้อนโดยจะปรากฏแถบของ dsRNA ให้เห็นทั้งกวักเงิน และสาวน้อยประแป้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในช่วงฤดูฝนเป็นช่วงที่สภาพอากาศและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของพืช ต้นพืชมีการผลิใบขึ้นมาใหม่ทำให้เชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้นในใบอ่อนที่เกิดขึ้นมาใหม่ดังการรายงานของ Griero *et al.* (2000) ที่รายงานการตรวจสอบเชื้อไวรัสในต้น Olive พบว่าตัวอย่างที่เก็บใบในฤดูใบไม้ผลิการสกัด dsRNA จะให้ได้ผลดีกว่าตัวอย่างที่เก็บได้ในฤดูใบไม้ร่วง

เมื่อนำระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบ dsRNA ที่สกัดได้จาก กวักเงิน สาวน้อยประแป้ง และฟิโลเดนดรอนมาคำนวณค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยการ plot กราฟเปรียบเทียบระหว่างระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานกับน้ำหนักโมเลกุลของตัวมาตรฐาน ปรากฏว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลที่คำนวณได้ไม่สัมพันธ์กับค่าน้ำหนักโมเลกุลของเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) ทั้งนี้เนื่องจาก pattern ของ dsRNA ที่แยกให้เห็นมีเพียงบางส่วนเท่านั้น จากการทดลองการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่ (dsRNA extraction) ในครั้งนี้ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัจจัยหลัก 2ประการคือ 1) ความเข้มข้นของเชื้อไวรัสในต้นพืชที่เป็นโรคในช่วงที่นำมาสกัดมีปริมาณต่ำ 2) ปัญหาการรวมตัว

ระหว่าง dsRNA และ cellulose ในสภาพที่มีการแยกสกัดที่มีเมือกหรือยางเหนียวของพืชที่เป็นองค์ประกอบในใบพืช (Hick *et al.* 1988) ซึ่งปัญหาการรวมตัวระหว่าง dsRNA และ cellulose อาจจะมีผลมาจากขั้นตอนการสกัดในช่วงการ incubate ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ดังการทดลองจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มเวลาในการ incubate จาก 3 นาทีเป็น 5 นาที ทำให้เห็นแถบของ pattern ดีขึ้นแม้ในฤดูร้อนยังปรากฏแถบให้เห็น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าขั้นตอนการสกัดในช่วงการ incubate ก็มีความสำคัญต่อการแยกตัวของ dsRNA ด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมและดัดแปลงวิธีในการแยกสกัดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบให้ชัดเจนขึ้น ซึ่งอาจรวมไปถึงการพัฒนาตัวตรวจ (probe) ที่มีความไวต่อการตรวจสอบถึงแม้เชื้อไวรัสจะอยู่ในปริมาณต่ำ (นวลพรรณ , 2540) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำไปเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กรมอุตุนิยมวิทยา. 2545. รายงานลักษณะภูมิอากาศ. สำนักพัฒนาอุตุนิยมวิทยา. กรุงเทพมหานคร.

กองบรรณาธิการวารสารบ้านและสวน. 2524. สารานุกรมไม้ประดับแห่งประเทศไทย. อมรินทร์การพิมพ์ , กรุงเทพมหานคร. 414 หน้า.

นวลพรรณ งามยิ่สุ่น. 2538. การผลิตพืชปลอดโรคไวรัสและการป้องกันการเข้าทำลายซ้ำ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 13(2) : 42-50.

นวลพรรณ งามยิ่สุ่น. 2539. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสและไวรอยด์. กรุงเทพมหานคร : คณะเทคโนโลยีทางการเกษตร , สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง . 130 หน้า.

นวลพรรณ งามยิ่สุ่น. 2540. การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธีการแยกสกัดและวิเคราะห์กรดนิวคลีอิคแบบ RNA สายคู่. วารสารเกษตรพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 5(2) : 32-37.

บรรเจิด คติการ. 2534. การพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับของประเทศไทย. หน้า 1-2 , ใน : ณรงค์ โฉมเฉลา , เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอกไม้ประดับ. สมาคมไม้ดอกไม้ประดับแห่งประเทศไทย, กรุงเทพมหานคร.

วิทย์ เที่ยงบุญธรรม. 2542. พจนานุกรมไม้ดอกไม้ประดับแห่งประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร. 981 หน้า.

ศราวุธ ทุบบาง. 2544. การตรวจสอบชนิดของเชื้อไวรัสในไม้ประดับบางชนิดโดยเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิคสายคู่. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช, คณะเทคโนโลยีการเกษตร ,สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 29 หน้า.

ศิริพร เบญจศรีอักษร. 2535. ไม้ประดับในอาคาร. โรงพิมพ์มิตรสยาม , กรุงเทพมหานคร . 142 หน้า.

Abo El – nil , M.M., Zettler , F.W. and E. Hiebert. 1977. Purification , serology and some physical propertie of dasheen mosaic virus. Phytophotology. 67:1445-1450.

Alice, K. Inoue – Nagata, R. Kormelink, T. Nagata, E.W. Kitajima, R.Goldbach and D. Peters. 1997. Effect of temperature and host on the generation of tomato spotted wilt virus defective interfering RNAs. Phytopathology. 87:1168-1173.

Almeida, A.C.L. 2001. Factors related to incidence and dissemination of maize common mosaic virus. Fitopatolooogia Brasileire. 26(4):766-769.

Beemster, A.B.R. 1966. The rate of infection of potato tubers with potato virus Y in

relation to position of the inoculated leaf. In Virus of Plants (ed. Beemster, A.B.R. and Dijkstra, J.), North – Holland, London. pp 44-47.

Burnt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J.Gibbs and L. Waton. 1995. Viruses of Plant Description and Lists from the Vide Database. University Press. UK. 1,484 pp.

CMI / AAB (eds.) 1978. "Dasheen mo10saic virus" Descriptions of Plant Viruses. 191(8).

Chagas, C.M. et al. 1993. Natural infection of Amorphophallus konjac dasheen mosaic virus in Brazil. Fitopatologia Brasileire. 18(4) :551-554

Chase, A.R. and F.W. Zettler. 1982. Dasheen mosaic virus infection of *Dieffenbachia* cultivars. Plant Disease. 66:891-893.

Copeland, R.B. and P.R. Mill. 1986. Potato virus disease. Annul Report on Research and Technical Work of the Department of Agriculture for Northern Ireland. 1985. pp 136-137.

Fawzy , R.N. . 1992. Identification of a strain of cucumber mosaic virus isolate from naturally infected *Philodendron selloum* Ann. Agric. Sci. 30(30) : 1219-1232.

Fawzy , R.N. 1996. Dasheen mosaic virus infection of *Dieffenbachia* and *Aglaonema* in Egypt. Ann. of Agricultural Scince, Moshtohor. 34(4) : 1595-1604.

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

Gunna , T.G. 1997. Foliar disease of taro in the Wahhi valley of the western highlands province of Papua New Guinea. Papua New Guinea Jounal of Agrilculture. Forestry and Fisheries. 40 : 22-26.

Hearon, S.S. 1979. A ringspot of prayer plant cause by a strain of cucumber mosaic virus. Plant Disease Report. 63: 32-36.

Hick, R. G. T., Naamyeesoon, N. And Perkins, C. J. 1988. Double-stranded RNA analysis as a Method for detecting viruses in woody ornamentals. Acta-Hort. 226(2) : 47-56.

Hill, S. A. and Daphne, M. 1980. Indentification of dasheen mosaic virus in *Dieffenbachia picta* and *Xathosoma helliborifolium* by immune electron microscopy. Plant Pathology. 29 : 143-144.

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

34 (2) : 133-136.

Rana ,G.L. and C. Vavlas. 1983. Manual transmission of dasheen mosaic virus from *Richaradia* to Nonaraceous hosts. Plant Disease. 67 : 1121-1122 .

Sabanadzovic, S. 1995. Characterization of apothos (*Scindapsas aureus*) virus white unsual properties. European Journal of Plant Pathology. 101(2) : 171-183.

Sepulveda , R. P. 1995. Virus detection in dehydrated plant material by double – stranded RNA analysis. Agricultura Tecnica Santigo. 55 : 170-175.

Verplancke , A. 1930. Une Maladia "A virus Fillterand" des Anthuriun. Compt. Fend. Soc. Biol. 130 : 524-526.

Walkey, D.G.A. and Pink, D.A.C. 1984. Resistance in vegetable marrow and other *Cucurbita* spp. to two British strains of cucumber mosaic virus. J. Agri Sci. 120: 197-205.

Walkey , D.G.A. 1985. Applied Plant Virology. London : William Heinemann. 329 pp.

White , J.L.Tousignant, M.E. Geletka, L.M. and J.M. Kaper. 1995. The replication of a necrogenic cucumber mosaic virus satellite is temperature – sensitive in tomato. Archives Viorology. 140 : 53-56.

Zettler , F.W. Foxe, M. J. Hartman ,R.D. Edwardson , J.R. and R.G. Christae. 1970. Filamentous viruses infecting dasheen and other araceous plants. Phythopathology. 60 : 983- 987.

Zettler , F.W. Foxe, M. J. Hartman ,R.D. Edwardson , J.R. and R.G. Christae. 1978. Dasheen mosaic virus. Commonwealth Myocologied Insititute Assoc. Appl. Biol. Description of Plant virus No. 191 Kew. Surrey. England.

Zetter , F.W. and Hartman ,R.D. 1985. Dasheen mosaic virus and its control in cultivated aroids. Virus Disease of Horticultural Groups in the Tropics and Subtropics , FFTC Book Series No. 33. Food and Fertilize technology Center for the Asian and Pacific Region . Republic of China. 193 pp.

Zhang , Y.P. Uyemoto , J.K. and B.C. Kirkpatrick. 1998. Analysis of double – stranded RNAs from cherry trees with stem pitting in California. Plant Disease. 82 : 871-874