18997

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

การกำจัดเชื้อไวรัสในเดหลีชนิดใบมันโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Eradication of *Spathiphyllum wallisii* by Thermotherapy *in vitro*

T098926

โดย

นางสาวเอกอนงค์ แซ่ลิ้ม

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545

ปพ.
อ885ก
2545

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....93926
วัน.เดือน,ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ปริญญา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง
การกำจัดเชื้อไวรัสในเดหลียชนิดใบมันโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
Eradication of *Spathiphyllum wallisii* by Thermotherapy *in vitro*

โดย

นางสาวเอกอนงค์ แซ่ลิ้ม

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

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

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(รศ.ดร.วรเดช จันทรสร)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
วันที่ ๒๖ เดือน พค ปี ๕๖

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง การกำจัดเชื้อไวรัสในเดหลีชนิดใบมันโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

โดย นางสาวเอกอนงค์ แซ่ลิ้ม

ชื่อปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา ..... 20 / มี.ค. / 2546

(ผศ.ดร.นวลพรรณ งามยี่สุ่น)

การกำจัดเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ในเดหลีชนิดใบมัน (*Spathiphyllum wallisii*) โดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยการนำต้นเดหลีมาเพิ่มปริมาณในอาหารสูตร Murashige & Skoog (MS)ที่มี BA (6-Benzylamino purine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร และแยกพืชเลี้ยงเป็นต้นเดี่ยวๆ ในอาหาร MS ปกติ แล้วนำมาเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 25 , 36 , 37 , 38 และ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ จากนั้นตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี Direct ELISA โดยเปรียบเทียบกับ control ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่า ที่ระดับอุณหภูมิ 35 , 36 และ 37 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสได้ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถทำให้ต้นพืชปราศจากเชื้อไวรัสได้ และการรักษาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 38 และ 39 องศาเซลเซียส ทำให้ต้นพืชตายทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Title : Eradication of *Spathiphyllum wallisii* by Thermotherapy in vitro

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Mager field : Plant Pest Management Technology

Advisor : N. Ngamyeesoon 20/5/2005

(Asst. Prof. Dr. Nualphan Ngamyeesoon)

Eradication of dasheen mosaic virus (DMV) infected peace lily (*Spathiphyllum wallisii*) by thermotherapy *in vitro* using heat-treatment incorporated with tissue culture was demonstrated. The plants were multiplied in tissue culture, using Murashige & Skoog (MS) with 6-Benzylamino purine (BA) at 2 mg./l. Then, each plantlet was subcultured on MS medium and transferred to an incubator at 25°C, 36°C, 37°C, 38°C and 39°C for 4 weeks and at 35°C for 5 weeks. Later, DMV was detected by direct ELISA on survival plants after incubation period. The result showed that DMV was present in low concentration from plants cultured at 35°C, 36°C and 37°C. Whereas, all plants cultured at 38°C and 39°C were dead.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้นั้นต้องกราบขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ผศ.ดร.นวลพรรณ งามยิ่งสุ่น ที่ให้คำปรึกษาทั้งในด้านการปฏิบัติการทดลองและตรวจทานรายงานปัญหาพิเศษและกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุเม อรัญนารถ ภาควิชาพืชสวน ที่ให้การอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ และอุปกรณ์ในการปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน ที่ให้ความเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และสถานที่ในการทำปัญหาพิเศษ

ขอบคุณพี่ๆปริญญาโท กลุ่มงานไวรัส ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ที่ให้คำแนะนำและให้การช่วยเหลือในการปฏิบัติการทดลองการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

ขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การอนุเคราะห์เกี่ยวกับค่าใช้จ่ายในการทำปัญหาพิเศษ และขอบคุณเพื่อนๆที่ให้การช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ด้วย

เอกอนงค์ แซ่ลิ้ม

พฤษภาคม 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....i

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ii

คำนิยม.....iii

สารบัญ.....iv

สารบัญตาราง.....v

สารบัญภาพ.....vi

คำนำ.....1

วัตถุประสงค์.....2

การตรวจเอกสาร.....3

อุปกรณ์และวิธีการ.....14

ผลการทดลอง.....20

วิจารณ์ผลการทดลอง.....32

สรุปผลการทดลอง.....35

เอกสารอ้างอิง.....36

ภาคผนวก.....42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตและลักษณะต้นพืชหลังจากการทำ.....24
   Heat treatment ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 4 สัปดาห์
2. แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และลักษณะต้นพืชหลังจากการทำ.....27
   Heat treatment ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์
3. แสดงจำนวนตัวอย่างพืชที่เกิดปฏิกิริยาที่ระดับต่าง ซึ่งได้จากการ.....30
   ตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA แบบ direct ELISA

ตารางผนวกที่

1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashig & Skoog (MS).....42
2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ตรวจสอบหาปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค.....43
   Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ต้นเดหลีชนิดใบมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งต้นพืช.....22
มีขนาดประมาณ 3 เซนติเมตร
2. แสดงลักษณะต้นพืชที่นำมาเพิ่มปริมาณโดยการย้ายมาเลี้ยงในอาหาร.....22
สูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA (6-Benzylamino purine)
3. แสดงลักษณะต้นพืชที่แยกเป็นต้นเดี่ยวๆนำมาเลี้ยงในอาหาร MS ปกติ..... 23
4. แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 25°C 23
5. แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 36°C.....25
6. แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 37°C.....25
7. แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 38°C.....26
8. แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 39°C.....26
9. แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์.....28
ต้นที่รอดชีวิตมีลำต้นสีเขียว
10. แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์.....28
ต้นที่รอดชีวิตมีลำต้นสีเหลือง
11. แสดงลักษณะต้นเดหลีชนิดใบมันที่ตายที่ทุกระดับอุณหภูมิ.....29
12. แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาของการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัส.....31
โดยเทคนิค ELISA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ไม้ดอกไม้ประดับเป็นพืชที่มีความสำคัญ สามารถนำเงินตราต่างประเทศเข้าสู่ประเทศไทยปีละหลายร้อยล้านบาท ไม้ดอกไม้ประดับเป็นพืชที่มีโอกาสขยายตลาดในต่างประเทศได้ จึงเป็นพืชที่รัฐบาลให้ความสำคัญและสนับสนุนให้มีการส่งออกมากขึ้น โดยได้บรรจุลงในแผนพัฒนาเศรษฐกิจฉบับที่ 6 (ปี 2530 – 2534) จากการขยายตัวอย่างมากในอุตสาหกรรมการผลิตไม้ประดับจึงทำให้เชื้อไวรัสเพิ่มการระบาดในต้นกล้ามากขึ้นเนื่องจากขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ

เดหลีชนิดใบมัน (*Spathiphyllum wallisii*) เป็นไม้ประดับที่โดดเด่นมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากให้ดอกสีขาวที่สวยงาม สามารถดายความชื้นสูงและดูดสารพิษในอาคาร จึงมักเป็นที่นิยมนำไปเป็นไม้ประดับในอาคาร นอกจากนี้ยังสามารถปลูกเป็นไม้ดอกล่อแมลงวันทองให้มารวมกันเพื่อการกำจัดได้อีกด้วย การขยายพันธุ์จะเพิ่มการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในต้นกล้า ดังนั้นจึงต้องมีวิธีป้องกันกำจัดโรคไวรัส ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้ความร้อนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการป้องกันกำจัดโรคไวรัสในพืชเพื่อการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

เพื่อผลิตเดหลีชนิดใบมันให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้ความร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

เดหลี (peace lily) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Spathiphyllum* sp. ซึ่งสามารถจำแนกโดย Watson and Dallwiz (1992) ได้ ดังนี้

Division : Magnoliophyta
Class : Liliopsida
SubClass : Aracidae
Order : Arales
Family : Araceae
SubFamily : Monsteroideae
Tribe : Spathiphylleae

โดยทั่วไปมักเรียก *Spathiphyllum* ว่า Peace lilies หรือ White Anthuriums ซึ่งในปี 1990-1991 ถูกบันทึกไว้ว่ามี 26 ชนิด หนึ่งในนั้นคือ *Spathiphyllum wallisii* (Henny *et al*. 1991)

Spathiphyllum wallisii มีถิ่นกำเนิดที่ประเทศโคลัมเบียและประเทศเวเนซูเอลา พืชชนิดนี้มีด้วยกันหลายชนิด แต่ที่นิยมนำมาตกแต่งประดับในอาคาร ได้แก่ เดหลีใบมันและเดหลีใบกล้วย (ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ, 2539)

เดหลีชนิดใบมันจะมีขนาดและทรงพุ่มเล็กกว่าทุกๆชนิด มีลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดินแล้วแตกหน่อขึ้นมาเป็นกอ ใบเป็นใบเดี่ยวกว้าง 10-15 เซนติเมตร ยาว 20-25 เซนติเมตร ปลายใบแหลม สีเขียวเข้มเป็นมัน ก้านใบยาว 20-30 เซนติเมตร จุดเด่นของดอกจะมีจานดอกสีขาว เวลาออกดอกจะแทงก้านขึ้นมายาว 20-30 เซนติเมตร ใบประดับที่เรียกว่าจานดอกอันเดียวมีลักษณะเป็นกาบหรือจานรูปหัวใจ ปลายแหลม กว้าง 8-12 เซนติเมตร ยาว 12-20 เซนติเมตร ส่วนหอมจะอยู่ที่ช่อดอก ซึ่งเรียกว่า ปลี ลักษณะทรงกระบอกมีดอกเล็กๆเรียงติดกัน มีกลิ่นหอมเย็น จะบานและส่งกลิ่นล่อแมลงได้มากที่สุดในช่วงสี่โมงเช้า ดังนั้นการใช้ประโยชน์ คือ ปลูกเป็นไม้ดอกไม้ประดับที่มีดอกหอมและสวยงามแล้วยังนิยมปลูกเป็นไม้ดอกล่อแมลงวันทองผลไม้ให้มารวมกันแล้วกำจัดทีเดียว นอกจากนี้เดหลีใบมันยังมีความสามารถสูงในการดูดพิษภายในอาคาร ซึ่งจะดูดสารพิษจำพวกแอลกอฮอล์ อาซีโตน ไตรคลอไรเอทีรีน เบนซีน และฟอร์มาดีไฮด์ เดหลีสามารถดูดสารพิษได้ในปริมาณมากจึงควรนำเดหลีประดับไว้ในสำนักงานหรือบ้านเรือน (ปิยะ, 2540)

เดหลีเป็นไม้ประดับที่มีสีเขียวเข้มและมันเป็นเงาวาววับ ดอกเป็นช่อสีขาว มีลักษณะคล้ายดอกหน้าวัว กาบช่อดอกนี้จะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเขียวหลังจากดอกบานแล้วประมาณ 1 สัปดาห์ ตามธรรมชาติแล้วเดหลีชอบขึ้นอยู่ตามริมลำธารที่มีร่มเงาในป่าฝนเขตร้อน แต่เมื่อนำเข้ามาปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นไม้ประดับภายในห้องหรือในอาคารสถานที่ เดหลีก็สามารถปรับตัวอยู่ได้ แม้จะมีความชื้นต่ำและรับแสงจากหลอดไฟฟ้าได้นานตราบเท่าที่ดินยังมีความชื้นอยู่ การดูแลรักษาเดหลีต้องการแสงแดดรำไร อุณหภูมิ 18-24 องศาเซลเซียส ต้องการความชื้นสูงมาก การรดน้ำควรรดตามสภาพดิน คือ ควรรดเพิ่มในฤดูร้อนและรดลดลงในฤดูหนาว ให้ปุ๋ยเดือนละ 1-2 ครั้ง และควรเปลี่ยนกระถางทุกปี (ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ, 2536)

ปัญหาที่พบในเดหลีมีมากมาย เช่นปัญหาที่เกิดจากสภาพแวดล้อม ปัญหาที่เกิดจากเชื้อรา ปัญหาที่เกิดจากแมลง และปัญหาที่เกิดจากไวรัส ซึ่งปัญหาที่เกิดจากเชื้อไวรัสเป็นปัญหาที่พบเสมอและมักเกิดจากเชื้อ Dasheen Mosaic Virus (DMV) ซึ่งมีลักษณะอาการ คือ ใบอ่อนมีลักษณะด่าง มีสีเหลืองอ่อนหรือสีเขียวอ่อน ใบบิดเบี้ยว การควบคุม คือ ควบคุมพืช aroid ชนิดอื่นที่อ่อนแอต่อเชื้อ DMV ซึ่งเป็นแหล่งแพร่เชื้อสู่ต้น *Spathiphyllum* หมั่นทำลายพืชที่มีอาการของโรคเสมอ และควบคุมเพลี้ยอ่อนที่เป็นพาหะของเชื้อไวรัส ซึ่งอาการเหล่านี้บางครั้งอาจเกิดจากความผิดพลาดทางพันธุกรรม (Henny *et al.* 1991)

เชื้อ Dasheen Mosaic Virus (DMV) อยู่ในกลุ่ม Potyvirus อนุภาคของเชื้อมีลักษณะเป็นท่อนยาวคดงอ (flexuous filaments) ยาวประมาณ 750 นาโนเมตร ไม่มีผนังห่อหุ้มชั้นนอก inclusion body เป็นแบบ pinwheel อนุภาคมีคุณสมบัติดูดซับที่ 260 นาโนเมตร (1 mg./ml., 1 cm. light path) : 2.38 คุณสมบัติของอนุภาคในน้ำคั้นพืชที่เป็นโรค อุณหภูมิที่เชื้อยังคงสภาพ (TIP) คือ 60-65 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่เชื้อยังสามารถก่อโรคได้ (LIV) คือ 3-4 วัน ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส และ dilution end point (DEP) อยู่ที่ $1:10^{-2} - 1:10^{-3}$ มีรหัสพันธุกรรมเป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว ประกอบด้วย nucleic acid 5 % โปรตีน 95 % เชื้อ DMV มีรายงานการติดเชื้อในพืชตระกูล Araceae 13 ตระกูล ได้แก่ *Aglaonema* , *Alocasia* , *Amorphophallus* , *Anthurium* , *Arisaema* , *Caladium* , *Colocasia* , *Cryptocoryne* , *Dieffenbachia* , *Philodendron* , *Xanthosoma*, *Zantedeschia* และ *Spathiphyllum* ซึ่ง *Spathiphyllum* มีความอ่อนแอต่อเชื้อ DMV พื้นที่ที่แพร่ระบาดปรากฏทั่วโลก โดยเฉพาะในเขตร้อนและเขตร้อนชื้น ซึ่งมีรายงานใน คาบสมุทรคาริบเบียน ทวีปยุโรป ประเทศอียิปต์ ประเทศอินเดีย ประเทศญี่ปุ่น ประเทศอเมริกา รัฐฟลอริดา และ แถบโอเชียเนีย การถ่ายทอดเชื้อจะถ่ายทอดได้โดยเพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* , *Aphis craccivora* และ *Aphis gossypii* แบบ non-persistant แต่ไม่ถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน *Pentalonia nigronervosa* และ *Rhopalosiphum padi* ถ่ายทอดโดยวิธีกลแต่ไม่ถ่ายทอดโดยการสัมผัสระหว่างต้นพืช ไม่ถ่ายทอดโดยเมล็ดพันธุ์ และไม่ถ่ายทอดโดยเกสร ในพืชที่ติดเชื้อจะพบเชื้อไวรัสในเซลชั้น mesophyll และ epidermis และอาจพบใน phloem ซึ่งอยู่ใน cytoplasm (Brunt, 1995 ;Zettler *et al.* 1978)

Thankappan (1993) พบเชื้อ DMV เข้าทำลาย *Calocasia* , *Alocasia* , *Xanthosoma* และพบในพืช aroid อื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chagas (1993) ทำการแยกเชื้อ DMV ได้จากต้น *Amorphophallus konjac* ที่เมืองเซา เปาโล ประเทศบราซิล ซึ่งพืชแสดงอาการใบด่าง อาการบิดเบี้ยว (malformation) และหัวใต้ดินมีขนาดเล็ก

Matthews *et al.* (1996) แยกเชื้อ potyvirus ซึ่งส่วนใหญ่ติดเชื้อกับพืชตระกูล Araceae ซึ่งเชื้อ potyvirus ที่แยกได้จาก *Caladium* , *Colocasia* , *Xanthosoma* และ *Zantedeschia* ทั่วโลกเป็นเชื้อ DMV

จิราพร (2545) รายงานอาการลักษณะต้นเดหลีชนิดใบมันที่ติดเชื้อ DMV ว่ามีลักษณะใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม ขนานไปตามแนวเส้นใบ อาการที่ปรากฏจะชัดเจนที่ใบอ่อน หลังจากนั้นอาการด่างจะค่อยๆจางลงเมื่อเป็นใบแก่ และนำส่วนตาของต้นเดหลีชนิดใบมันจากลำต้นใต้ดินที่แสดงอาการใบด่างชัดเจนมาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จนต้นพืชมีความสูงประมาณ 3-5 เซนติเมตร ใบอ่อนที่เกิดแสดงอาการด่างอย่างชัดเจน และต้นพืชมีสีเขียวเข้ม

การผลิตพืชปลอดโรค

เชื้อไวรัสในต้นพืชสามารถทำให้ผลผลิตและ/หรือคุณภาพของพืชลดลง (บุญยืน, 2544) มีรายงานแสดงให้เห็นว่าผลผลิตเพิ่มขึ้น เมื่อนำเอาต้นที่ปลอดจากโรคไปปลูกทดแทนต้นเดิมที่มีเชื้อไวรัสติดอยู่ (Murashige, 1980) ดังนั้นการกำจัดเชื้อไวรัสจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อต้องการให้ได้ผลผลิตสูงสุด แต่ในปัจจุบันยังไม่มีสารประกอบเคมีทางการค้าที่สามารถรักษาพืชที่มีเชื้อไวรัสติดอยู่

การกำจัดเชื้อไวรัสออกจากต้นแม่พันธุ์ โดยเฉพาะกรณีที่แม่พันธุ์ที่มีอยู่ทั้งหมดเกิดการติดเชื้อมีหลายวิธี คือ

1. การตรวจสอบการแพร่กระจายของเชื้อในต้นพืช จัดเป็นข้อดีในการกำจัดเชื้อไวรัส เช่น การนำยอดอ่อนที่เจริญอย่างรวดเร็วมาเพาะปลูกและพบว่าปลอดจากเชื้อไวรัส หรือสามารถใช้เป็นวิธีในการผลิตพืชปลอดโรค โดยการเลือกขยายพันธุ์ในช่วงที่เชื้อลดจำนวนลง

2. การเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด

3. การใช้ความร้อน

4. การใช้สารเคมี

ซึ่งบางครั้งการใช้วิธีดังกล่าวร่วมกันพบว่าประสบความสำเร็จอย่างสูง (นวลพรรณ, 2538, 2539)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเกิดขึ้นในช่วงปี ค.ศ. 1838-1839 เมื่อนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน 2 คน คือ Schleiden (1838) และ Schwann (1839) มีแนวความคิดว่า เซลของพืชสามารถเจริญเป็นต้นได้ หลังจากนั้นได้มีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายคนทำการศึกษาต่อมาจนถึงปี 1893 มีนักปลูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้วยไม้ชาวอังกฤษได้พยายามเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *Phalaenopsis* จากตาก้านดอกสำเร็จ นับเป็นครั้งแรกที่ใช้ชิ้นส่วนของพืชในการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ (อารีย์,2541) จากความสำเร็จในการเลี้ยงชิ้นส่วนของกล้วยไม้โดย Knudson ในปี 1943 จึงได้มีการพัฒนาสูตรอาหารต่างๆอีกหลายชนิด เช่น สูตรอาหารของ White และของ Vacin and Went ซึ่งต่อมาได้รับการปรับปรุงจนได้สูตรอาหารที่ใช้กันแพร่หลายในปัจจุบัน คือ สูตรอาหารของ Murashige and Skoog และมีการค้นพบสารที่มีฤทธิ์คล้ายสารไซโตไคนิน โดย Miller ค้นพบ ไคเนติน ให้ชื่อว่า 6-furfurylaminopurine คณะวิจัยนี้ได้สังเคราะห์ kinetin analog และให้ชื่อว่า 6-benzylaminopurine ซึ่ง Wand-JiFang *et al.* (1995) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของ 6-BA กับ *Spathiphyllum floribundum* ซึ่งเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการโดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มีฮอร์โมน 6-BA ปริมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้พืชเกิดการแตกใบที่มีลักษณะแหลม เกิดแคลลัสและมีก้านใบเพิ่มจำนวนมากขึ้น

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปลายยอดมีประโยชน์ในการใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงจาก vegetative phase ไปเป็น flowering phase แล้วยังใช้ขยายพันธุ์พืชอีกด้วย โดยเงื่อนไขประการหนึ่งที่สำคัญสำหรับการขยายพันธุ์พืชก็คือ พืชที่ได้ควรปลอดโรค เช่นปลอดจากไวรัส (คำนูญ, 2542) การใช้ส่วนเนื้อเยื่อเจริญเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อผลิตท่อนพันธุ์พืชปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวรัส เช่น ในการผลิตมันฝรั่งหรือพืชชนิดอื่น อันเป็นการขยายพันธุ์พืชให้ปลอดโรคที่มักติดไปกับท่อนพันธุ์ เชื้อไวรัสจะแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่อส่วนอื่นโดยทางระบบท่อน้ำท่ออาหาร แต่การใช้เนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดซึ่งยังไม่มีท่อน้ำท่ออาหารจะปลอดไวรัส ดังนั้นจึงนิยมนำเนื้อเยื่อส่วนนี้ของพืชมาเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตท่อนพันธุ์ให้ปราศจากเชื้อโรค (อารีย์, 2541)ความสำเร็จในการกำจัดเชื้อไวรัสโดยวิธีนี้จะขึ้นอยู่กับการที่เชื้อไวรัสไม่สามารถเข้าทำลายหรืออยู่ในส่วนของเซลเนื้อเยื่อเจริญได้ซึ่งวิธีนี้ใช้ได้ผลกับการผลิตพืชปลอดโรคหลายชนิด (นวลพรรณ, 2538) การนำส่วนปลายยอดอ่อนมาเพาะเลี้ยงพบว่าดีกว่าส่วนอื่น เพราะนอกจากจะทำให้พืชหรือโคลนที่ได้มีความผันแปรเกิดขึ้นน้อยมากแล้ว วิธีการนี้ก็ไม่ยุ่งยากนัก สามารถขยายพันธุ์พืชได้จำนวนมากในระยะเวลาอันสั้น แล้วยังทำให้เกิดพืชที่ปราศจากโรคอีกด้วย เนื่องจากบริเวณปลายยอดเป็นส่วนที่ปลอดเชื้อ เช่นเมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของกล้วยไม้จนได้ต้นขึ้นมา ก็จะได้ต้นที่ปราศจากเชื้อไวรัส ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น หรือการเพาะเลี้ยงแคลลัสจากพืชที่เป็นโรคพบว่าถ้าเปลี่ยนอาหารไปเรื่อยๆ ไวรัสที่ติดมากับแคลลัสอาจหายไปได้ (คำนูญ, 2542)

บุญยืน (2544) ได้ให้เหตุผลที่บริเวณเนื้อเยื่อปลายยอดไม่มี หรือมีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำจากการวิเคราะห์ส่วนของเนื้อเยื่อที่แก่พบไวรัสเพิ่มขึ้นเมื่อมีระยะห่างจากปลายยอดมากขึ้น คือ

1. ไวรัสสามารถเคลื่อนไปตามส่วนต่างๆของพืชได้ตามระบบของเนื้อเยื่อลำเลียง ซึ่งเนื้อเยื่อเจริญไม่มีเนื้อเยื่อลำเลียง ดังนั้นเนื้อเยื่อเจริญที่ปลายยอดจึงไม่มีไวรัส วิธีการเคลื่อนที่ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไวรัสอีกแบบหนึ่งคือ การผ่านทางช่องว่างระหว่างเซลล์ (plasmodesmata) ซึ่งผ่านได้ช้ามาก จึงทำให้เคลื่อนไปพร้อมกับการเจริญของปลายยอด

2. กระบวนการเมตาโบลิซึมสูงในตำแหน่งที่เซลล์เนื้อเยื่อเจริญแบ่งตัวไม่ยอมให้เกิดการจำลองตัวของไวรัส

3. ไวรัสถูกยับยั้งในอวัยวะของพืช เมื่อเนื้อเยื่อเจริญมีกิจกรรมสูงกว่าส่วนอื่นๆ เนื้อเยื่อเจริญจึงป้องกันการรุกรานเข้าไปของไวรัส

4. ระดับของออกซินที่ปลายยอดสูงอาจยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส

Gautheret (1985) รวบรวมผลงานทางด้านนี้ไว้ว่า White ในปี ค.ศ. 1934 สังเกตเห็นว่าถ้าเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนปลายรากที่ปลอดเชื้อไวรัสและเมื่อทำการย้ายเปลี่ยนอาหารจะยังคงได้ต้นที่ปลอดเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่า บริเวณเนื้อเยื่อเจริญเป็นส่วนที่ปลอดเชื้อไวรัส ต่อมาในปี ค.ศ. 1949 Limasset และ Cornuet ได้พิสูจน์ยืนยันว่าไม่เพียงแต่เซลล์เนื้อเยื่อเจริญตรงปลายรากเท่านั้นที่ปลอดเชื้อไวรัส เซลล์เนื้อเยื่อเจริญตรงบริเวณตาของต้นก็ปลอดเชื้อไวรัสเช่นกัน โดยให้ Morel และ Martin ซึ่งเป็นผู้ร่วมงานทำการทดลองเพาะเลี้ยงส่วนปลายยอดของต้นรักเร่ ขนาด 0.1-0.5 มิลลิเมตร และมันฝรั่งที่ติดโรคอยู่ก่อนแล้วในสภาพปลอดเชื้อ ผลที่ได้คือ ต้นที่เกิดจากการเลี้ยงจะไม่มีอาการของโรคแสดงให้เห็นอีก

Gomez *et al.* (1989) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด ของพืช aroid 3 ชนิด คือ *Colocasia esculenta* var. antiquorum , *Xanthosoma violaceum* และ *X. sagittifolium* ในห้องปฏิบัติการ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่มี IAA ทำให้พืชปลอดจากเชื้อไวรัส Shishida *et al.* (1991) ได้ทำการเพาะเลี้ยง shoot tips ต้น *Amorphophallus konjak* ที่ติดเชื้อ DMV และ KMV (Konjac mosaic virus) โดยชักนำให้เกิด protocorm-like calluses (PLC) บนอาหารที่มี NAA จากนั้นแยกต้นที่ได้จาก PLC ผลคือ เชื้อ DMV และ KMV ถูกกำจัดได้ในอัตราสูง เมื่อตัด shoot tip ขนาด 0.3-0.5 มิลลิเมตรมาเพาะเลี้ยง

จารุวรรณ และ คณะ (2540) ได้ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญเพียงอย่างเดียวในการกำจัดเชื้อ CyMV (Cymbidium mosaic virus) และ ORSV (Odontoglossum ring spot virus) ในกล้วยไม้พบว่าเมื่อเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญขนาด 0.2×0.3 มิลลิเมตร ทั้งเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง จำนวน 107 ชิ้น เนื้อเยื่อเจริญส่วนยอดเพียง 8 ชิ้น และเนื้อเยื่อเจริญตาข้างเพียง 2 ชิ้น สามารถรอดชีวิตและเจริญเติบโตต่อไปได้ เมื่อนำมาตรวจเชื้อ CyMV และ ORSV โดยวิธี ELISA พบว่าเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง 2 ยอด มีเชื้อ CyMV และ ORSV ส่วนเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด 2 ชิ้นใน 8 ชิ้น ปราศจากเชื้อ CyMV เพียงอย่างเดียว และมีเพียง 1 ชิ้น เท่านั้นที่ปราศจากเชื้อ CyMV และ ORSV ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทฤษฎีที่กล่าวว่าเซลล์ meristem tip จะปลอดเชื้อไวรัสอย่างสิ้นเชิงนั้นไม่ถูกเสมอไป (นวลพรรณ, 2538) เนื่องจากไวรัสบางชนิดสามารถรุกรานเข้าไปในบริเวณเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของปลายยอดที่กำลังเจริญเติบโตได้ (Langhans *et al.* 1977) ซึ่งHolling and Stone (1964) ได้แสดงให้เห็นว่า ในส่วนยอดของคาร์เนชั่นที่มีขนาด 100 ไมโครเมตร ยังคงมีเชื้อ Carnation mottle virus อยู่ เช่นเดียวกับ Earle and Langhans (1974 a , b) ได้นำเนื้อเยื่อเจริญขนาด 300-600 ไมโครเมตร ของต้นเบญจมาศที่มีเชื้อไวรัสไปเพาะเลี้ยง ต้นที่ได้จากแคลลัสประมาณ 33 % ยังคงมีเชื้อไวรัสติดอยู่ ซึ่งนอกจากนี้ยังมีรายงานเชื้อไวรัสอื่นที่สามารถรุกรานเข้าไปในเนื้อเยื่อเจริญของปลายยอดอีก คือ Tobacco mosaic virus (TMV) , Potato virus X (PVX)และ Cucumber mosaic virus (CMV) (Walkey and Cooper, 1972) ดังนั้นการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพียงอย่างเดียวบางครั้งยังไม่สามารถทำให้พืชปลอดเชื้อไวรัสได้ การแก้ปัญหาที่ดีที่สุดในการขยายพันธุ์พืชให้ปราศจากเชื้อไวรัส คือ การใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ (จารุวรรณ และ คณะ, 2540)

การรักษาโรคด้วยความร้อน (Thermotherapy) ได้ใช้อย่างมีประสิทธิภาพมาเป็นเวลานาน เพื่อให้ได้พืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสจากต้นติดเชื้อจากพืชหลายชนิด หลักการใช้ความร้อนเพื่อกำจัดไวรัส คือ อุณหภูมิที่สูงกว่าปกติทำให้ไวรัสหลายชนิดในพืชบางส่วนหรือทั้งหมดอยู่ในสภาพที่เฉื่อยชาไม่ทำอันตรายหรือทำอันตรายเพียงเล็กน้อยต่อเนื้อเยื่อ (บุญยืน, 2544) การใช้ความร้อนสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การใช้น้ำร้อน และอากาศร้อน การใช้น้ำร้อนได้พิสูจน์ว่าดีสำหรับตาพักส่วนอากาศร้อนดีสำหรับการกำจัดไวรัสจากส่วนที่เป็นยอดที่กำลังเจริญ (Holling, 1965) ซึ่งวิธีการใช้อากาศร้อนเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำร้อนนับว่าสะดวกกว่า (บุญยืน, 2544) การกำจัดไวรัสโดยใช้ความร้อนได้มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อผลิตพืชปลอดโรค โดยการนำพืชเหล่านั้น มาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง อาจเป็น 1-2 เดือน (นวลพรรณ , 2538) ข้อจำกัดที่สำคัญของการใช้ความร้อนเพื่อทำการรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสคือไม่สามารถใช้กับเชื้อไวรัสทุกชนิด ตัวอย่างเช่น ในมันฝรั่งมีเพียงโรค Leaf roll virus เท่านั้นที่สามารถกำจัดได้โดยเทคนิคนี้ การใช้ความร้อนใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพกับพวกไวรัสที่มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม (isometric) และคล้ายเส้นด้าย (thread-like) และโรคที่เกิดจากมายโครพลาสมา (Quak, 1977)

ได้มีการศึกษาการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อกำจัดเชื้อไวรัสมากมาย เช่น จิราพร (2545) ได้ทำการศึกษาการผลิตต้นเดหลี (*Spathiphyllum wallisii*) ให้ปลอดโรคไวรัสโดยใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำส่วนของเนื้อเยื่อเจริญบริเวณตา นำมาเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงจาก Murashige & Skoog (MS) โดยใช้ BA (6-Benzylamono purine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้แคลลัสและยอดเจริญเติบโตดี จากนั้นทำการทดสอบด้วยวิธี Thermotherapy ที่ระดับอุณหภูมิ 25 , 30 , 35 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งแต่ละอุณหภูมิจะใช้เวลา 3 สัปดาห์ แล้วตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ทำให้การติด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไวรัสลดลง แต่ก็ไม่ได้ปราศจากเชื้อไวรัสได้ทั้งหมด เมื่อเทียบกับการทดลองเปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พืชตายทั้งหมด

Paet and Zamora (1990) การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ shoot ของมันฝรั่ง 8 สายพันธุ์ ร่วมกับการใช้ความร้อน โดย heat treatment ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ในที่มืด 8 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส ในที่สว่าง 16 ชั่วโมง ทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลปรากฏว่าพืชฟื้นคืนสภาพใหม่ 65-95 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปลอดจาก Potato Y virus ในกลุ่ม potyvirus , Potato S virus ในกลุ่ม carlavirus และ Potato leaf roll virus ในกลุ่ม luteovirus ได้ 93-100 เปอร์เซ็นต์

Truskinov and Rogozina (1991) ได้ทำการทดลองใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหาร MS เพื่อให้มันฝรั่งปลอดจากการติดเชื้อไวรัส โดยทดลองกับมันฝรั่ง 16 พันธุ์ ที่ติดเชื้อไวรัส 3 ชนิด ผลปรากฏว่ามีมันฝรั่ง 8 พันธุ์ที่ปลอดเชื้อไวรัสและสามารถแตกยอดได้ซึ่งพืชแต่ละพันธุ์จะทนต่อความร้อนได้แตกต่างกัน

Fawzy *et al.* (1992) นำต้นคาร์เนชั่น พันธุ์ Scania , Lena , Arther , Sim และ Safari ซึ่งติดเชื้อ Carnation mottle virus ไปเลี้ยงบนอาหาร MS (pH 5.5) ที่ 25±2 องศาเซลเซียส เวลาให้แสงสว่าง : ให้ความมืด = 16 : 8 ชั่วโมง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แล้วนำมาทำ Heat treatment ที่อุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และ 4 สัปดาห์ ซึ่งผลจากการทำ Heat treatment ทั้ง 2 ระยะเวลา พืชสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งหมดซึ่งเปรียบเทียบกับ control และเปอร์เซ็นต์ของต้นพืชที่ปลอดเชื้อ Carnation mottle virus จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มระยะการทำ Heat treatment

Ravnikarn *et al.* (1994)สร้างวิธีการที่มีประสิทธิภาพสำหรับกำจัดไวรัส โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญของกระเทียมบนอาหารซึ่งไม่มีการควบคุมการเจริญเติบโตของพืช หลังจากนั้นทำการรักษาด้วยความร้อนซึ่งเปอร์เซ็นต์ความสำเร็จในการพัฒนาจากเนื้อเยื่อเจริญไปเป็นต้นพืชเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ และผลที่ได้มีพืชที่ปลอดเชื้อ Onion yellow dwarf virus (OYDV) และ Carnation latent virus (CLV) เท่ากับ 88-100 เปอร์เซ็นต์

Knapp *et al.* (1995) ทำการศึกษาการกำจัดไวรัสในไม้ผล โดยโปรแกรมการกำจัดไวรัสของต้น Malus และ *Prunus* spp. คือการใช้วิธีรักษาด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย ซึ่งเมื่อทำวิธีดังกล่าวแล้วได้นำต้น Malus มาตรวจสอบเชื้อ ApMV (Apple mosaic virus) , ASHV (Apple stem grooving virus) และ ACLSV (Apple chlorotic leaf spot virus) ส่วนต้น Prunus มาทดสอบเชื้อ PPV (Plum pox virus) , PNRV (Prunus necrotic ringspot virus) , PDV (Prune dwarf virus) , ApMV และ ACLSV โดยวิธี ELISA และ immuno tissue-printing เชื้อ PPV พบในใบพืชหลังทำการรักษาด้วยความร้อนเป็นเวลา 20 วัน แต่ไม่พบหลังจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ เชื้อ ASGV ถูกตรวจพบหลังจากทำการรักษาด้วยความร้อนเป็นเวลา 33 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในระดับต่ำ แต่เชื้อจะเพิ่มขึ้นเมื่อนำเนื้อเยื่อเจริญไปเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 เดือน เชื้อ ACLSV ตรวจไม่พบหลังจาก thermotherapy 33 วัน และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญจะปลอดเชื้อ ACLSV หลังจาก 6 เดือน

Ravnikar *et al.* (1996) ได้ตรวจสอบไวรัสในกระเทียม โดยวิธี EM และ ELISA พบ viruses หลายชนิด คือ Onion yellow dwarf virus (OYDV , garlic strain) , Leek yellow stripe virus (LYSP , garlic strain) , Garlic common latent virus , Carnation latent virus และ Mite-borne filamentous viruses regeneration ของพืชปลอดโรค โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดร่วมกับการใช้ความร้อน ซึ่งเชื้อ OYDV และ LYSV ถูกกำจัดได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

Upadyshev (1996) ทำการศึกษาพืชตระกูลเบอร์รี่สายพันธุ์พื้นเมือง (blackberry , blackberry hybrids , raspberry hybrids , black berry , Sorbus และ สายพันธุ์ที่กินได้ของต้นสายน้ำผึ้ง) โดยสายพันธุ์ต่างๆของรัสเซีย ถูกทดสอบกับเชื้อ Arabis mosaic virus , Raspberry ringspot virus , Strawberry latent ringspot virus และ Tomato black ring virus ส่วน sorbus ถูกทดสอบกับเชื้อ Prunus necrotic ringspot virus , Plum pox virus , Apple chlorotic leaf spot virus และ Apple stem grooving virus มาทดสอบการกำจัดเชื้อไวรัส โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน และ 65 วัน จากนั้นตรวจสอบเชื้อไวรัส ซึ่งพบว่าสามารถควบคุมไวรัสได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

Bruna *et al* . (1997) ได้ทำการทดลองการผลิตกระเทียมให้ปลอดเชื้อไวรัสในประเทศชิลี โดยใช้วิธี thermotherapy และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลาย ซึ่งกระเทียมติดเชื้อ Onion yellow drwaf virus (OYDV) โดยการทดลองครั้งแรกใช้หัวของกระเทียมพันธุ์ Rosada-INIA ทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 38 องศาเซลเซียส 8 วัน ซึ่งกลุ่ม control ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 45 วัน พบว่าเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายที่เลี้ยงบนอาหาร B5 และ MS จะเจริญแยกจากเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.8 มิลลิเมตร จากนั้น 3 เดือนต่อมาทำการย้ายต้นอ่อนแล้วตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ต้นอ่อนที่เจริญจาก explant จะปลอดจาก OYDV 65 % และส่วนที่ทำการ Thermotherapy ที่ 38 องศาเซลเซียส จะทำให้ปลอดจากเชื้อ OYDV 100 % การทดลองครั้งที่ สอง ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการทดสอบต่างกัน คือ 48 , 54 , 60 , 67 และ 75 วัน จากนั้นนำมาตรวจด้วย ELISA ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถทำให้พืชปลอดไวรัส 100 เปอร์เซ็นต์ จากที่ใช้เวลา 48-75 วัน ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ซึ่งการทดลอง 48 วัน พืชจะมีชีวิตรอด 95 เปอร์เซ็นต์ และการทดลอง 75 วัน พืชจะรอดชีวิต 72 เปอร์เซ็นต์

Rankovic *et al.* (1997) ทำการตรวจสอบใบมันฝรั่งพันธุ์ Early Rose ในประเทศยูโกสลาเวีย ด้วยวิธี ELISA พบว่าพืชติดเชื้อ Potato X virus (PXV) , Potato Y virus (PYV) ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Potato M virus (PMV) , Potato A virus (PAV) , Potato S virus (PSV) และ Potato leaf roll virus ทำการกำจัดไวรัสด้วยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ หลังจากใช้ความร้อนใน thermo-chamber ที่ 37 องศาเซลเซียส นำ shoot tip เพาะเลี้ยงบนอาหารและเปลี่ยนอาหารทุก 20 วัน จากนั้นตรวจสอบพืช 7 สายพันธุ์ของต้นรุ่นใหม่ ผลปรากฏว่าทุกต้นปลอดจากเชื้อ PYV และ PLRV ส่วนเชื้อ PVA , PVM , PVX และ PVS ปลอดจากเชื้อมีจำนวน 1 , 2 , 17 และ 15 ต้นของพืชทดสอบ 37 ต้น ตามลำดับ

Bhardwaj *et al.* (1998) ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายของ apple ขนาด 0.1-1.0 มิลลิเมตร บนอาหาร MS ที่เติม benzyladenine 1 มิลลิกรัม/ลิตร IBA (Indolebutyric acid) 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร และ Ga_3 (Gibberellin) 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งทำให้เกิดเนื้อเยื่อเจริญ และ หน่อมากขึ้น เชื้อ AMV (Apple mosaic virus) ถูกพบในเนื้อเยื่อเจริญที่มีขนาดมากกว่า 0.2 มิลลิเมตร การนำมา treat ที่ความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์สามารถกำจัดเชื้อไวรัสได้อย่างสมบูรณ์

Dong *et al.* (1998) ทำการศึกษาเทคนิคการกำจัดเชื้อ ASGV (Apple stem grooving virus) ในต้นแพร์ 13 สายพันธุ์ โดยทำการเพาะเลี้ยง shoot tip และ heat treatment กับต้นแพร์เล็กๆ ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถกำจัดเชื้อ ASGV ได้ในอัตรา 57.0 % และสูงกว่า 62.4 % ตามลำดับ และเมื่อทำการย้ายปลูกปรากฏว่าต้นแพร์ปลอดเชื้อ 70 % และ 80 % ตามลำดับ

Gella and Errea (1998) ได้ทำการกำจัดเชื้อ ilarvirus ใน 3 species ของ prunus ได้แก่ แอปริคอท , พีช และเชอร์รี่เปรี้ยว โดยนำยอดอ่อนของแอปริคอทที่ติดเชื้อ Apricot chlorotic leaf spot virus (ACLSV) , ยอดอ่อนของพีชที่ติดเชื้อ Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) กับ ACLSV และ ยอดอ่อนของเชอร์รี่เปรี้ยวที่ติดเชื้อ Prune dwarf virus (PDV) กับ ACLSV มาทำการรักษาด้วยความร้อนเพื่อกำจัดไวรัส ด้วยอุณหภูมิคงที่ที่ 37องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่ให้ความร้อนจะประยุกต์ใช้แล้วแต่พันธุ์ ซึ่งจะอยู่ระหว่าง 15-36 วัน ขอบเขตความสำเร็จในการกำจัดไวรัสจะอยู่ที่ 37-100 % ของพืชที่ปลอดเชื้อ PNRSV , 60-100 % ของพืชที่ติดเชื้อ ACLSV และ 85-100 % ของพืชที่ติดเชื้อ PDV

Zhang *et al.* (1998) ทำการขยายพันธุ์องุ่น 5 พันธุ์ โดยนำต้นองุ่นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง microapical ซึ่งตรวจพบเชื้อ GFLV (Grapevine fan leaf virus) โดยวิธี DAS-ELISA และ probe มาทำการให้ความร้อนที่ 38 องศาเซลเซียส ในตอนกลางวัน และ 35 องศาเซลเซียส ในตอนกลางคืน ผลปรากฏว่ามีประสิทธิภาพดีขึ้นในการปลอดเชื้อ GFLV และการเลี้ยงเนื้อเยื่อมากกว่า 20 รุ่น จะให้ผลปลอดเชื้อ GFLV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Torres *et al.* (2000) ทำการเพาะเลี้ยงยอดอ่อนของกระเทียม ร่วมกับการ dry heat thermotherapy ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วัน สามารถทำให้กระเทียมพันธุ์ cv. Amrante ปลอดไวรัสได้ โดยมี 70 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ต่อได้ ซึ่งในจำนวนนี้ปลอดไวรัส 77 เปอร์เซ็นต์ โดยการตรวจด้วย ISEM จากจำนวนพืชทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองนี้ได้ผลสรุปคือ มี 54 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดไวรัส และการเพิ่มอุณหภูมิมากถึง 40 องศาเซลเซียส จะทำให้การเกิดใหม่ของพืชลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่จะทำให้พืชปลอดไวรัส 90 เปอร์เซ็นต์

การตรวจสอบเชื้อไวรัส

วิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสจะใช้วิธีการทดสอบด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยาโดยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งจะใช้สำหรับเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชบางชนิดที่สามารถนำมาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เพื่อผลิตเซรุ่มได้ เทคนิคการตรวจสอบ ELISA นับว่าเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบเชื้อได้อย่างแม่นยำ และรวดเร็ว โดยที่ขั้นตอนการปฏิบัติก็ไม่ยุ่งยาก ซึ่งวิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบเมื่อมีตัวอย่างจำนวนมาก และสามารถตรวจสอบเชื้อไวรัสได้ถึงแม้ว่าเชื้อจะมีอยู่ในปริมาณต่ำ เทคนิคนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสครั้งแรกโดย Voller และ คณะ ในปี 1997 หลังจากนั้น Clark และ Adam ได้พัฒนาเทคนิคเพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

สุรภี และ กิตติศักดิ์ (2538) ทำการแยกเชื้อ CMV และ BYMV เพื่อเปรียบเทียบอาการและการแพร่ระบาดบนแกลดิโอลัส โดยใช้วิธี ELISA ตรวจตัวอย่างโรคใบด่างของแกลดิโอลัส เกิดปฏิกิริยาเป็นบวกกับแอนติซีรัมของ CMV และ BYMV ดังนั้นโรคใบด่างที่ตรวจพบมากที่สุดเกิดจากเชื้อ 2 ชนิด คือ CMV เป็นไวรัสชนิดกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 28-30 นาโนเมตร มีพืชอาศัยอยู่ในตระกูลแตงและเชื้อ BYMV เป็นไวรัชชนิดท่อนยาวดด ยาวประมาณ 720-750 นาโนเมตร มีพืชอาศัยส่วนใหญ่อยู่ในตระกูลถั่ว ซึ่งในแปลงปลูกของแกลดิโอลัสมักพบเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดเข้าทำลายร่วมกัน ทำให้แกลดิโอลัสมีอาการที่รุนแรง

จารุวรรณ และ คณะ (2540) ทำการศึกษาการผลิตพันธุ์ปลอดโรคไวรัสในกล้วยไม้สกุลออนซิเดียม โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดและเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง จำนวน 107 ชิ้น แล้วนำมาตรวจเชื้อ CyMV และ ORSV โดยวิธี ELISA พบว่าเนื้อเยื่อเจริญตาข้าง 2 ยอด มีเชื้อ CyMV และ ORSV ส่วนเนื้อเยื่อเจริญส่วนยอด 2 ชิ้นใน 8 ชิ้น ปราศจากเชื้อ CyMV เพียงอย่างเดียว และ 1 ชิ้น เท่านั้นที่ปราศจากเชื้อ CyMV และ ORMV จากยอดที่ปราศจากเชื้อ CyMV และ ORSV นำไปขยายพันธุ์ต่อ แล้วทำการสุ่มตัวอย่าง 10 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนทั้งหมดมาตรวจเชื้อ CyMV และ ORSV โดยวิธี ELISA พบว่าปราศจากเชื้อทั้งสองชนิดทุกตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ravnikar *et al.* (1996) ได้ตรวจสอบไวรัสในกระเทียม โดยวิธี EM และ ELISA พบ viruses หลายชนิด คือ Onion yellow dwarf virus (OYDV , garlic strain) , Leek yellow stripe virus (LYSP , garlic strain) , Garlic common latent virus , Carnation latent virus และ Mite-borne filamentous viruses

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองการผลิตเดหลีชนิดใบมันให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.1 ต้นเดหลีชนิดใบมันที่อยู่ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งติดเชื้อไวรัส Dasheen Mosaic Virus (DMV) อายุ 3 เดือน

1.2 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรMurashige & Skoog (MS)

- สารเคมีของอาหารสูตร MS (ภาคผนวกที่ 1)
- น้ำตาลและวุ้น
- น้ำกลั่น
- ฮอร์โมน BA (6-Benzylamino purine)
- pH meter
- beaker
- erlenmeyer flask และ volumetric flask
- graduated cylinder
- pipette และ ลูกยาง
- กระบอกตวง
- แท่งแก้วคน
- ขวดสีชา
- aluminium foil
- หม้อนึ่งความดันไอ
- เตาไฟฟ้าหรือเตาแก๊ส
- ขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และ ฝาปิด
- ตู้เย็นสำหรับเก็บสารเคมี
- หม้อ และทัพพี
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

1.3 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Incubation room)

- ชั้นสำหรับวางเครื่องแก้วเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ
- หลอดไฟฟลูออเรสเซนซ์แบบคูลไวต์ (cool white type) หรือหลอดไฟแบบพิเศษ โกรลักซ์ (grolux) ซึ่งจะให้ผลการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อที่ดีกว่า เนื่องจากมีสัดส่วนของแสงสีแดงและน้ำเงินสูง และพืชสามารถนำไปใช้ในการสังเคราะห์แสงได้โดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (25 องศาเซลเซียส)
- เครื่องควบคุมการปิด-เปิดไฟ (มืด : สว่าง = 8 : 16 ชั่วโมง)

1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนต้นเดหลีชนิดใบมัน

- ต้นเดหลีชนิดใบมันที่อยู่ในสภาพการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งติดเชื้อไวรัส
- อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS
- ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ (lamina air-flow cabinet)
- มีดผ่าตัด , ด้ามมีด และปากคีบที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- petri dishes และกระดาษกรอง
- ผ้าสะอาดที่ฆ่าเชื้อแล้ว
- ethanol 70 % และ 95 %

1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Heat treatment

- ต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (สูงประมาณ 3-5 cm.)
- ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
- แอลกอฮอล์และผ้าที่อบฆ่าเชื้อแล้ว สำหรับทำความสะอาดตู้บ่มเชื้อ

2. อุปกรณ์ที่ใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) แบบ direct ELISA

2.1 น้ำคั้นพืช (antigen)

2.2 antiserum ของเชื้อ Dasheen Mosaic Virus (DMV) titre 1 : 200 จากบริษัท Agdia ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.3 goat entiled rabbit in conjugate buffer (IgG)

2.4 coating buffer (ภาคผนวกที่ 2)

2.5 PBS-Tween (ภาคผนวกที่ 2)

2.6 extraction buffer

2.7 substrate buffer (ภาคผนวกที่ 2)

2.8 polystyrene plates

2.9 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.10 micro pipette , pipette และลูกยาง

2.11 beaker

2.12 ผ้าสะอาด

2.13 ตู้เย็นสำหรับบ่ม polystyrene plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงและการเพิ่มจำนวนแคหลีชนิดใบมันในสภาพปลอดเชื้อ

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ต้องเตรียม 2 สูตร คือ สูตร MS ปกติ และ สูตร MS ที่มีส่วนผสมของ BA (6-Benzylamino purine) ซึ่งจะใช้เมื่อเพิ่มปริมาณต้นพืช

อาหารสูตร Murashige & Skoog (MS) ปกติ

1.เตรียมสารละลายเข้มข้น (stock solutions) (ภาคผนวกที่ 1)

2. นำสารละลายเข้มข้น (stock solutions)(ภาคผนวกที่ 1) ทุกชนิดมารวมกัน

3. ปรับค่า pH โดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 1 N หรือ HCl ความเข้มข้น 1 N ให้ค่า pH อยู่ในช่วง 5.5-5.7

4. ปรับปริมาตรสารละลายอาหารให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

5. เติมวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ลงไป คน แล้วนำไปตั้งไฟอ่อนๆ เดี่ยวจนวุ้นละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายอาหาร

6. นำอาหารใส่ขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละ 20 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาให้สนิท

7. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

8. เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว ให้นำขวดอาหารมาวางแนวเอียงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว และหากมีไอน้ำหยดในขวดจะช่วยให้น้ำไหลไปทางเดียว

อาหารสูตร Murashige & Skoog (MS) ที่มีส่วนผสมของ BA (6-Benzylamino purine)

1. นำสารละลายเข้มข้น(stock solutions) แต่ละชนิดมารวมกัน และ เติมฮอร์โมน BA (6-Benzylamino purine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. ปรับค่า pH โดยใช้ NaOH ความเข้มข้น 1 N หรือ HCl ความเข้มข้น 1 N ให้ค่า pH อยู่ในช่วง 5.5-5.7

3. ปรับปริมาตรสารละลายอาหารให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. เติมวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ลงไป คน แล้วนำไปตั้งไฟอ่อนๆ เดี่ยวจนวุ้นละลายหมดเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลายอาหาร

5. นำอาหารใส่ขวดแก้วสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละ 20 มิลลิลิตร แล้วปิดฝาให้สนิท

6. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

7. เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อเสร็จแล้ว ให้นำขวดอาหารมาวางแนวเอียงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว และหากมีไอน้ำหยดในขวดจะช่วยให้น้ำไหลไปทางเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพิ่มจำนวนต้นเดหลีชนิดใบมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1. ทำความสะอาดตู้ย้ายเนื้อเยื่อ และฆ่าเชื้ออุปกรณ์ทั้งหมด

2. นำต้นเดหลีชนิดใบมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาทำการย้ายลงในอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA (6-Benzylamino purine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มจำนวน

3. บันทึกชนิดพืช ชนิดอาหาร และวัน เดือน ปี ที่ทำการเพาะเลี้ยง

4. นำขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเก็บไว้บนชั้นภายในห้องเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมความเข้มแสง (3,000-10,000 lux) ให้ช่วงแสงในแต่ละวัน มืด : สว่าง = 8 : 16 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิ ที่ 25°C เป็นเวลา 2 เดือน โดยทำการเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์

5. นำพืชที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA (6-Benzylamino purine) มาทำการตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวเลี้ยงลงในอาหาร MS ปกติ

7. ทำการเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ เพื่อเปลี่ยนอาหารให้ต้นพืช (MS ปกติ) จนต้นพืชมีขนาดความสูงประมาณ 4-5 เซนติเมตร

2. การทดลองการผลิตต้นเดหลีชนิดใบมันให้ปลอดเชื้อไวรัส โดยการใช้ความร้อน

1. ทำความสะอาดตู้ incubator โดยเช็ดตู้ด้วยแอลกอฮอล์

2. นำพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการเพิ่มปริมาณที่ทำการตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ สูงประมาณ 3-5 เซนติเมตร มาทำการ Heat treatment ในตู้ incubator โดยใช้ทั้งหมด 120 ต้น แบ่งเป็น 6 treatment treatment ละ 20 ต้น ดังนี้

Treatment 1 ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (control treatment)

Treatment 2 ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ 36°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Treatment 3 ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Treatment 4 ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ 38°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Treatment 5 ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ 39°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์

Treatment 6 ไว้ที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เนื่องจากที่อุณหภูมิ38°C และ 39°C ต้นพืชตายทั้งหมด จึงลดอุณหภูมิให้ต่ำลงซึ่ง ต้นพืชสามารถทนความร้อนได้และเพิ่มเวลาให้นานขึ้น เป็นที่คาดว่าจะมีต้นที่รอดชีวิตและปลอดจากเชื้อไวรัส

3. ควบคุมแสงในแต่ละวัน ให้ มืด : สว่าง = 8 : 16 ชั่วโมง

4. สังเกตและบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

99926

3. การตรวจสอบเชื้อไวรัส ด้วยเทคนิค ELISA แบบ Direct ELISA

1. นำพืชแต่ละ treatment ที่รอดชีวิตจากการใช้ความร้อน มาตัดใบยอด 1-2 ใบ แล้วชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ให้น้ำหนักอยู่ในช่วง 0.01-0.05 กรัม

2. วางแผนการตรวจสอบลงบนตารางของ polystyrene plate ก่อนทำการตรวจสอบจริงใน polystyrene plate

3. หยด antiserum ของเชื้อ Dasheen Mosaic Virus (DMV) ที่ทำการ dilute ใน conjugate buffer ให้เป็น 1 : 200 ลงใน polystyrene plate หลุมละ 100 µl.

4. นำ plate ไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

5. เท antiserum ทิ้ง และสะบัด plate แรงๆ แล้วทำการล้าง plate โดยการหยด PBS-Tween ลงในหลุมทิ้งไว้ 3 นาที แล้วเททิ้งโดยสะบัดแรงๆ ล้าง plate ทั้งหมด 3 ครั้ง จากนั้นคว่ำ plate และตบ plate แรงๆบนผ้าสะอาดหรือกระดาษซับ

6. นำใบพืชที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วใส่ในถุงพลาสติกขนาดเล็ก ถุงละ 1 ตัวอย่าง แล้วเติมสารละลาย extraction buffer ให้อัตราส่วน : ใบพืชเท่ากับ 1 : 10 (w/v) แล้วทำการบด

7. หยดน้ำคั้นพืช (antigen) หลุมละ 100 µl.

8. นำ plate ไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน

9. เทน้ำคั้นพืชทิ้งและสะบัด plate แรงๆ แล้วทำการล้าง plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง (วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 6)

10. หยด anti-goat IgG (antibody ของ แพะซึ่งผลิตในกระต่าย) หลุมละ 100 µl. ที่ conjugate ไว้ด้วยเอนไซม์ alkaline phosphate ซึ่ง dilute ใน conjugate buffer (ความเข้มข้น 1 : 2,000)

11. นำ plate ไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน

12. ดูด anti-goat IgG ขึ้นเก็บไว้เพราะสามารถใช้ซ้ำได้อีก 2 ครั้ง แล้วทำการล้าง plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง (วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 6)

13. หยด substrate (นำ p-nitrophenyl phosphate 10 mg. ละลายใน substrate buffer 15 ml.) หลุมละ 100 µl.

14. ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง แล้วตรวจผลของปฏิกิริยา โดยสังเกตสีที่เกิดขึ้น

15. บันทึกผลการตรวจสอบ โดยการแบ่งสีของการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลาและสถานที่ทำการทดลอง

เวลา	เริ่มการทดลอง	พฤษภาคม	2545
	สิ้นสุดการทดลอง	พฤษภาคม	2546

สถานที่ - ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

- ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. การเพิ่มจำนวนเดหลีชนิดใบมันโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการนำต้นเดหลีชนิดใบมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งต้นพืชมีขนาดประมาณ 3 เซนติเมตร (ดังภาพที่ 1) มาเพิ่มปริมาณโดยการย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มีฮอร์โมน BA (6-Benzylamino purine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าเมื่อเลี้ยงได้ 1 เดือน ต้นพืชจะแตกยอดสีเขียวอ่อน ลำต้นมีลักษณะอวบน้ำ ใบเรียวแหลม เมื่อเลี้ยงได้ 2 เดือน ต้นพืชมีการแตกยอดมากขึ้น ใบพืชมีลักษณะเรียวแหลม และเมื่อครบ 3 เดือน ต้นพืชจะมีขนาดสูงประมาณ 3-4 เซนติเมตร ต้นพืชมีสีเขียวเข้ม ใบมีขนาดใหญ่ขึ้นและแสดงอาการด่าง (ดังภาพที่ 2) หลังจากนั้นแยกเป็นต้นเดี่ยวๆนำมาเลี้ยงในอาหาร MS ปกติเพื่อปรับสภาพพืช เมื่อเลี้ยงได้ 1 เดือน ต้นพืชเจริญเติบโตมีความสูงประมาณ 4-5 เซนติเมตร และมีอาการด่าง (ดังภาพที่ 3)

2. การผลิตต้นเดหลีชนิดใบมันให้ปลอดเชื้อไวรัสโดยใช้ความร้อน

จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเดหลีชนิดใบมันจนได้ต้นที่มีความสูง 4-5 เซนติเมตร แล้วทำการแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ จากนั้นนำมาทำ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิ 25°C , 36°C , 37°C , 38°C และ 39°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และทำ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ซึ่งผลการทำ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิ 25°C , 36°C , 37°C , 38°C และ 39°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 1

จากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า การทำ Heat treatment เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยที่ระดับอุณหภูมิ 25°C (Control) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 100 % และต้นพืชมีสีเขียวเข้ม ใบมีอาการด่างสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้มและต้นพืชเจริญเติบโตเป็นปกติ (ดังภาพที่ 4) ที่ระดับอุณหภูมิ 36°C มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 45% ต้นพืชมีลักษณะลำต้นและใบล่างมีสีเหลือง-น้ำตาล ส่วนใบบนและปลายยอดมีสีเขียวปกติ ใบมีลักษณะม้วนงอ (ดังภาพที่ 5) ที่ระดับอุณหภูมิ 37°C มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 5% ต้นพืชมีลักษณะลำต้นมีสีน้ำตาลเข้มก้านใบเป็นสีเหลืองส่วนที่ใบเป็นสีเขียวเข้ม (ดังภาพที่ 6) ส่วนที่ระดับอุณหภูมิ 38°C และ 39°C มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต 0% ต้น พืชมีลักษณะอาการตายนึ่ง (ดังภาพที่ 7-8) เนื่องจากไม่สามารถทนความร้อนได้

และผลการทดลองการผลิตเดหลีชนิดใบมันให้ปลอดเชื้อไวรัสโดยใช้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 2

จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่า การทำ Heat treatment เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ที่ระดับอุณหภูมิ 35°C มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเท่ากับ 70 % ต้นพืชที่รอดชีวิตมีลักษณะเป็นสีเขียวปกติทั้งต้น ไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18997

อาการเหี่ยวเป็นจำนวน 3 ต้น (ดังภาพที่ 9) และลำต้นและใบล่างมีสีเหลือง ใบยอดมีสีเขียวมีอาการเหี่ยวเฉาเป็นจำนวน 11 ต้น (ดังภาพที่ 10)

ส่วนต้นเดหลีชนิดใบมันที่ตายที่ทุกระดับอุณหภูมิ คือ 35°C , 36°C , 37°C , 38°C และ 39°C มีลักษณะอาการคล้ายกัน คือ ต้นพืชมีอาการเหี่ยวเฉา มีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้นและใบซึ่งอาการจะเกิดขึ้นที่ใบล่างก่อน คือ ลำต้น ก้านใบ ใบล่าง และใบยอด โดยที่ลำต้นและก้านใบล่างที่เหลืองจะมีอาการเหี่ยวเฉาและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเข้มแล้วลุกลามไปจนถึงส่วนยอดของต้นพืช ทำให้ต้นพืชเกิดการทรุดโทรมและตายซึ่งเป็นลักษณะของการตายนึ่ง (ดังภาพที่ 11)

3. การตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA โดยวิธี direct ELISA

จากการทำ Heat treatment ต้นพืช แล้วนำต้นพืชแต่ละ treatment ที่รอดชีวิต มาทำการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA แบบ direct ELISA โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทำให้เกิดระดับสีที่แตกต่างกัน ซึ่งได้แบ่งปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีแตกต่างกันเป็น 4 ระดับ ได้แก่

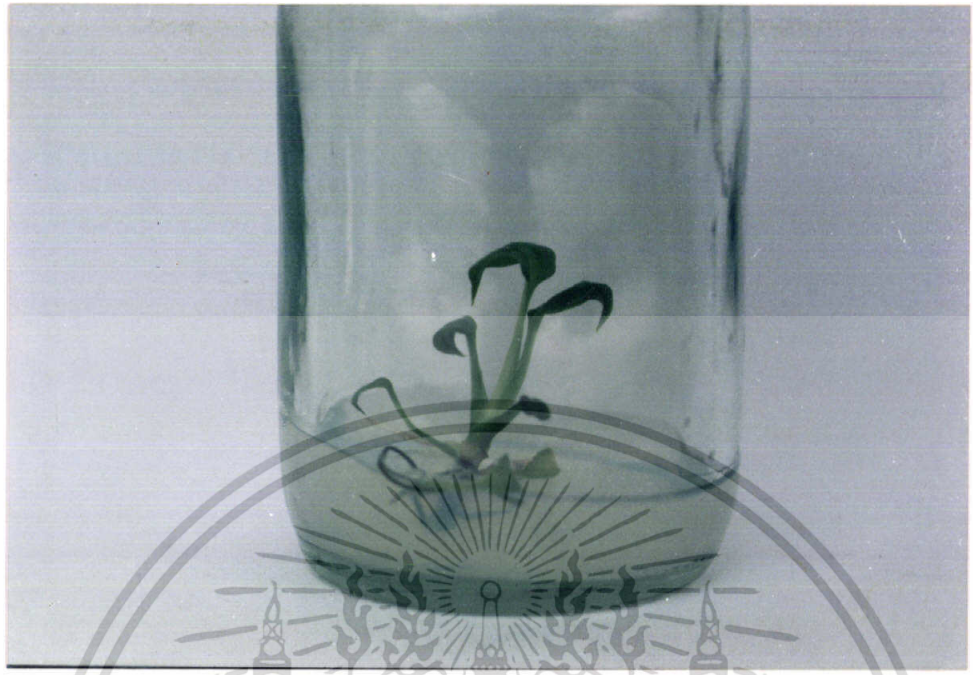
ระดับ 0	ไม่เกิดสี	หมายถึง	ไม่มีเชื้อไวรัส
ระดับ 1	สีเหลืองอ่อน	หมายถึง	มีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำ
ระดับ 2	สีเหลือง	หมายถึง	มีปริมาณเชื้อไวรัสปานกลาง
ระดับ 3	สีเหลืองเข้ม	หมายถึง	มีปริมาณเชื้อไวรัสสูง

โดยทำการเปรียบเทียบกับสีของ disease control ซึ่งผลการตรวจสอบแต่ละ treatment ได้ผลดังตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 แสดงผลการเกิดปฏิกิริยาของการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสโดยเทคนิค ELISA หลังจากการทำ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ โดย ที่ระดับอุณหภูมิ 25°C (control) จำนวนพืชทดสอบที่รอดชีวิตและนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสเท่ากับ 20 ต้น ซึ่งเกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 3 ทั้ง 20 ต้น แสดงให้เห็นว่าทั้ง 20 ต้นมีปริมาณเชื้อไวรัสสูง ที่ระดับอุณหภูมิ 35°C จำนวนพืชทดสอบที่รอดชีวิตและนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสเท่ากับ 14 ต้น ซึ่งเกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 1 ทั้ง 14 ต้น แสดงให้เห็นว่าทั้ง 14 ต้นมีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำ ที่ระดับอุณหภูมิ 36°C จำนวนพืชทดสอบที่รอดชีวิตและนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสเท่ากับ 9 ต้น ซึ่งเกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 1 เป็นจำนวน 4 ต้น และเกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 2 เป็นจำนวน 5 ต้น แสดงให้เห็นว่า มี 4 ต้น ที่มีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำ และมี 5 ต้น มีปริมาณเชื้อไวรัสปานกลาง ตามลำดับ ที่ระดับอุณหภูมิ 37°C จำนวนพืชทดสอบที่รอดชีวิตและนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสเท่ากับ 1 ต้น ซึ่งเกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 1 แสดงให้เห็นว่า มีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำ และ ที่ระดับอุณหภูมิ 38°C และ 39°C จำนวนพืชทดสอบที่รอดชีวิตและนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสเท่ากับ 0 (ดังภาพที่ 12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง



ภาพที่ 1 ต้นเดหลีชนิดใบมันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งต้นพืชมีขนาดประมาณ 3 เซนติเมตร

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะต้นพืชที่นำมาเพิ่มปริมาณโดยการย้ายมาเลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่มี ฮอร์โมน BA (6-Benzylamino purine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/ลิตร เป็นเวลา 3 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3 แสดงลักษณะต้นพืชที่แยกเป็นต้นเดี่ยวๆนำมาเลี้ยงในอาหาร MS ปกติเพื่อปรับสภาพพืช เมื่อเลี้ยงได้ 1 เดือน

ภาพที่ 4 แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 25°C (Control) ต้นพืชมีสีเขียวเข้ม ใบมีอาการด่างสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้มและต้นพืชเจริญเติบโตปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และลักษณะต้นพืชหลังจากการ Heat treatment ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 4 สัปดาห์

อุณหภูมิที่ใช้ทดลอง	จำนวนต้นที่ตาย	จำนวนต้นที่รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%)	ลักษณะต้นพืชหลังจากทำการ Heat treatment
25°C (control)	0	20	100	ต้นที่รอดชีวิตมีสีเขียวเข้ม ใบมีอาการด่างสีเขียวอ่อนสลับเขียวเข้ม ต้นพืชเจริญปกติไม่มีอาการเหี่ยว ต้นที่ตายมีอาการเหี่ยวเฉา มีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้นและใบ
36°C	11	9	45	ต้นที่รอดชีวิต ลำต้นและใบล่างมีสีเหลือง-น้ำตาล ส่วนใบบนและปลายยอดมีสีเขียวปกติ ใบมีลักษณะม้วนงอ ต้นที่ตายมีอาการเหี่ยวเฉา มีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้นและใบ
37°C	19	1	5	ต้นที่รอดชีวิต ลำต้นมีสีน้ำตาลเข้มก้านใบเป็นสีเหลืองส่วนที่ใบเป็นสีเขียวเข้ม ต้นที่ตายมีอาการเหี่ยวเฉา มีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้นและใบ
38°C	20	0	0	ต้นที่ตายมีอาการเหี่ยวเฉา มีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้นและใบ
39°C	20	0	0	ต้นที่ตายมีอาการเหี่ยวเฉา มีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้นและใบ

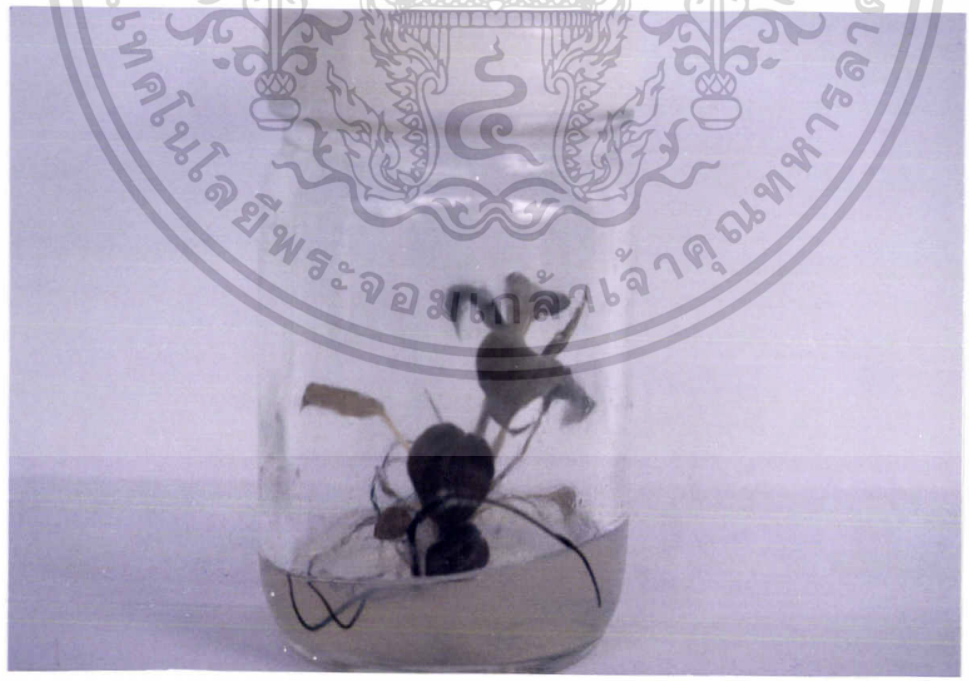
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5 แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 36°C ต้นต้นพืชมีลักษณะลำต้นและใบล่างมีสีเหลือง-น้ำตาล ส่วนใบบนและปลายยอดมีสีเขียวปกติ ใบมีลักษณะม้วนงอ

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะอาการต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 37°C ต้นพืชมีลักษณะลำต้นมีสีน้ำตาลเข้ม ก้านใบเป็นสีเหลือง ส่วนที่ใบเป็นสีเขียวเข้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 7 แสดงลักษณะต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 38°C ต้นพืชมีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้น มีอาการทรุดโทรมและเกิดการตายนึ่ง



ภาพที่ 8 แสดงลักษณะต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 39°C ต้นพืชมีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้น มีอาการทรุดโทรมและเกิดการตายนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และลักษณะต้นพืชหลังจากการทำ Heat treatment ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์

อุณหภูมิที่ใช้ทดลอง	จำนวนต้นที่ตาย	จำนวนต้นที่รอดชีวิต	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (%)	ลักษณะต้นพืชหลังจากทำการ Heat treatment
35°C	6	14	70	ต้นพืชที่รอดชีวิตมีลักษณะเป็นสีเขียวปกติทั้งต้น ไม่มีอาการเหี่ยวเป็นจำนวน 3 ต้น และลำต้นและใบล่างมีสีเหลือง ใบยอดมีสีเขียวมีอาการเหี่ยวเฉาเป็นจำนวน 11 ต้น ต้นที่ตายมีอาการเหี่ยวเฉา มีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้นและใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ต้นพืชที่รอดชีวิตมีลักษณะเป็นสีเขียวปกติทั้งต้น ไม่มีอาการเหี่ยว

ภาพที่ 10 แสดงลักษณะต้นพืชที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ต้นพืชที่รอดชีวิตมีลักษณะลำต้นและใบล่างมีสีเหลือง ใบยอดมีสีเขียวมีอาการเหี่ยวเฉา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะต้นเดหลีชนิดใบมันที่ตายที่ทุกระดับอุณหภูมิซึ่งมีลักษณะอาการคล้ายกัน คือ ต้นพืชมีอาการเหี่ยวเฉา มีสีน้ำตาลทั่วทั้งต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนตัวอย่างพืชที่เกิดปฏิกิริยาที่ระดับต่าง ซึ่งได้จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค ELISA แบบ direct ELISA

อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง	จำนวนต้นพืชที่นำมาตรวจสอบ	จำนวนตัวอย่างพืชที่เกิดปฏิกิริยา			
		ระดับ 0	ระดับ 1	ระดับ 2	ระดับ 3
25°C(control)*	20	0	0	0	20
35°C**	14	0	14	0	0
36°C*	9	0	4	5	0
37°C*	1	0	1	0	0
38°C*	0	-	-	-	-
39°C*	0	-	-	-	-

* Heat treatment เป็นเวลา 4 สัปดาห์

** Heat treatment เป็นเวลา 5 สัปดาห์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 12 แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาของการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสโดยเทคนิค ELISA หลังจากการทำ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ โดยที่

A2-A11 และ B2-B11 คือ ตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (control)

C2-C10 คือ ตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส

D2 คือ ตัวอย่างพืชที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

D3-D6 คือ Disease control

D7-D8 คือ Enzyme control

D9-D10 คือ Substrate control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองการกำจัดเชื้อไวรัสในเดหลีชนิดใบมันโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิ 25 , 36 , 37 , 38 และ 39 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าต้นพืชที่อุณหภูมิ 36 และ 37 องศาเซลเซียส มีต้นที่มีชีวิตรอด 45 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ส่วนใหญ่จะตาย ส่วนที่อุณหภูมิ 38 และ 39 องศาเซลเซียส ต้นพืชมีลักษณะตายนึ่งทั้งหมด เนื่องจากพืชไม่สามารถทนต่อความร้อนสูงได้ ดังนั้นจึงได้ทำการลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ 35 องศาเซลเซียส พบว่าต้นพืชสามารถทนต่อความร้อนได้นานมากขึ้น จึงสามารถให้ความร้อนได้นานขึ้นเป็น 5 สัปดาห์ และมีต้นที่รอดชีวิตเพิ่มขึ้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพืชในกลุ่ม control ที่ให้อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตเป็นปกติและรอดชีวิต 100 % จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเดหลีชนิดใบมันไม่สามารถทนต่อความร้อนที่มากกว่า 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ได้ และไม่สามารถทนต่อความร้อนนานเกินกว่า 5 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสได้ ซึ่งความสามารถในการทนต่อความร้อนของพืชจะแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นพืชในกลุ่มเดียวกันก็ตาม ความสามารถในการทนต่อความร้อนจะขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ตัวอย่างเช่นการทดลองของ Stace-Smite and Mellor (1968) พบว่าเชื้อ Potato Virus S (PVS) ในต้นมันฝรั่งสามารถกำจัดได้ยาก เพราะระยะเวลาการให้ความร้อนต่อพืชต้องเป็นจุที่เหมาะสม เนื่องจากการให้ความร้อนที่มากเกินไปจะมีผลที่ไม่ดีต่อเนื้อเยื่อพืช เช่นเดียวกับการทดลองของ จารุวรรณ และ คณะ (2540) ได้ทำการกำจัดเชื้อไวรัสในกล้วยไม่สกุลออนซิเดียมโดยใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เพื่อผลิตพืชปลอดโรค แต่การใช้ความร้อนเช่นนี้ไม่เหมาะกับการกำจัดเชื้อไวรัสในออนซิเดียม เพราะหน่ออ่อนไม่สามารถทนต่อความร้อนที่ 40 องศาเซลเซียส ได้นานเกิน 1 สัปดาห์ จากการทดลองอบหน่ออ่อน 20 หน่อ ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ หน่ออ่อนจะเหลืองและบริเวณเนื้อเยื่อเจริญจะตายนึ่งถึง 17 หน่อ ส่วนที่เหลือ 3 หน่อ สามารถตัดเนื้อเยื่อเจริญได้ แต่จะตายในเวลาต่อมา จิราพร (2545) พบว่าการใช้ความร้อนกับต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่อุณหภูมิ 25 , 30 และ 35 องศาเซลเซียส ต้นพืชไม่แสดงอาการตาย ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเมื่อทำการทดลองได้ 3 วันใบล่างจะแสดงอาการเหลืองตรงปลายใบ และต้นพืชจะมีอาการเหี่ยวเล็กน้อย หลังจากนั้น 7 วัน ต้นพืชมีลักษณะการตายนึ่งทั้งต้น โดยใบที่เหลืองจะมีอาการเหี่ยวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำ ซึ่งอาการจะเกิดที่ก้านใบล่างแล้วลุกลามไปจนถึงส่วนยอดของต้นพืช ทำให้ต้นพืชทรุดโทรมและตายในที่สุด

จากการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA กับใบพืชที่ได้จากต้นที่รอดชีวิตที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อที่ระดับ 3 ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่างจากที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียสที่มีปริมาณเชื้อที่ระดับ 2 และระดับ 1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อที่ระดับ 1 แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 36 และ 37 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสในพืชได้ ดังที่ Conci *et al.* (1997) รายงานว่า การรักษาโดยการใช้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 หรือ 40 วัน ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายจะทำให้ปลอดเชื้อ OYDV (Onion yellow dwarf virus) ได้ 62 เปอร์เซ็นต์ และ Torres *et. al.*, (2000) ทำการเพาะเลี้ยง shoot tip ของกระเทียม ร่วมกับการรักษาโดยใช้ความร้อนแห้ง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 วัน สามารถทำให้กระเทียมพันธุ์ Amrante ปลอดไวรัสได้ โดยมี 70 เปอร์เซ็นต์ ที่สามารถดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ต่อได้ ซึ่งในจำนวนนี้ปลอดไวรัส 77 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลอง พืชที่รอดชีวิตที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส มี 9 ต้น สามารถทำให้เชื้อไวรัสมีปริมาณลดลงในระดับปานกลางถึงระดับต่ำ และที่ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีเพียง 1ต้น ที่รอดชีวิตซึ่งมีปริมาณเชื้อไวรัสในระดับต่ำ จึงเป็นอุณหภูมิที่ยังไม่เหมาะสมในการใช้ผลิตพืชปลอดโรคไวรัสในต้นเดหลีพันธุ์ใบมัน จึงได้ลดอุณหภูมิในการทำ heat treatment ลงมาที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเพิ่มระยะเวลาเป็น 5 สัปดาห์ ซึ่งคาดหวังว่าจะสามารถผลิตพืชปลอดโรคไวรัสได้ ดังรายงานของ Faccioli and Colombarini (1996) ได้ทำการตรวจสอบการติดเชื้อ Potato virus S (PVS) และ Potato virus M (PVM) ของมันฝรั่ง จากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 26 วันแล้วตรวจผลด้วยวิธี ELISA พบว่าปลอดเชื้อไวรัส 85 เปอร์เซ็นต์ และ จิราพร (2545) รายงานว่า การผลิตต้นเดหลี (*Spathiphyllum wallisii*) ให้ปลอดโรคไวรัสโดยใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยการทำ Thermotherapy ที่ระดับอุณหภูมิ 25 , 30 , 35 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งแต่ละอุณหภูมิจะใช้เวลา 3 สัปดาห์ แล้วตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ทำให้การติดเชื้อไวรัสลดลง

เมื่อทำการ Heat treatment ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 สัปดาห์ และนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA พบว่ามีจำนวนต้นพืชรอดชีวิตและนำมาตรวจ ELISA 14 ต้น ซึ่งทั้งหมดมีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำ คือ อยู่ในระดับ 1 แม้ว่าผลการทดลองยังไม่สามารถทำให้พืชปลอดโรคได้แต่สามารถทำให้มีจำนวนต้นพืชที่รอดชีวิตเพิ่มมากขึ้นและมีปริมาณเชื้ออยู่ในระดับต่ำทั้งหมด ซึ่งในอนาคตควรมีการศึกษาต่อไป เพื่อผลิตต้นเดหลีพันธุ์ใบมันให้ปลอดเชื้อไวรัส โดยอาจจะลดอุณหภูมิแล้วเพิ่มระยะเวลาการใช้ความร้อน หรืออาจใช้อุณหภูมิสูงสลับอุณหภูมิต่ำเนื่องจากความร้อนอุณหภูมิสูงสลับอุณหภูมิต่ำนอกจากจะยับยั้งการเพิ่มปริมาณหรือทำให้เชื้อเสื่อมสภาพแล้ว ยังขัดขวางการเคลื่อนที่ของเชื้อไปยังส่วนต่างๆของพืช เมื่อนำมาใช้ประกอบกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อย่อมทำให้มีโอกาสตัดชิ้นส่วนพืชที่ปราศจากเชื้อมาเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้มากขึ้น (นวลพรรณ, 2539) ดังรายงานของ Paet and Zamora (1990) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ shoot ของมันฝรั่ง 8 สายพันธุ์ร่วมกับการใช้ความร้อน โดย heat treatment ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส ในที่มืด 8 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส ในที่สว่าง 16 ชั่วโมง ทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ผลปรากฏว่า พืชฟื้นคืนสภาพใหม่ 65-95 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปลอดจาก Potato virus Y , Potato virus S และ Potato leaf roll virus ได้ 93-100 เปอร์เซ็นต์ และรายงานของ Zhang *et al.* (1998) ทำการขยายพันธุ์องุ่น 5 พันธุ์ นำต้นองุ่นที่ได้จากการเพาะเลี้ยง microapical ซึ่งตรวจพบเชื้อ GFLV (Grapevine fan leaf virus) โดย DAS-ELISA และ probe มาทำการ treat ด้วยความร้อนที่ 38 องศาเซลเซียส ในตอนกลางวัน และ 35 องศาเซลเซียส ในตอนกลางคืน ผลปรากฏว่ามีประสิทธิภาพดีขึ้นในการปลอดเชื้อ GFLV และการเลี้ยงเนื้อเยื่อมากกว่า 20 รุ่น จะให้ผลปลอดเชื้อ GFLV

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการผลิตต้นเดหลีชนิดใบมันให้ปราศจากเชื้อไวรัส DMV โดยให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 36°C , 37°C , 38°C และ 39°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าการทำ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิสูงจะทำให้ต้นไม้เสื่อมโทรมและตาย โดยในการทดลองการใช้ความร้อนกับต้นเดหลีชนิดใบมันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ต้นไม้ไม่สามารถทนต่อระดับอุณหภูมิที่มากกว่า 37°C ได้ เนื่องจากที่ระดับอุณหภูมิ 38°C และ 39°C ต้นพืชตายทั้งหมด ซึ่งจากผลการทดลองการทำ Heat treatment แสดงให้เห็นว่าการใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตต่ำลงเรื่อยๆและการใช้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิที่ต่ำลงจะสามารถยืดเวลาการทำ Heat treatment ให้ยาวนานขึ้น โดยที่ต้นพืชยังมีชีวิตรอด

ด้านการตรวจสอบปริมาณการติดเชื้อไวรัส หลังจากการทำ Heat treatment ด้วยเทคนิค ELISA แบบ direct ELISA แสดงให้เห็นว่ายังไม่สามารถทำให้ต้นเดหลีชนิดใบมันปราศจากเชื้อไวรัสโดยวิธี Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิ 36°C , 37°C , 38°C และ 39°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ได้ โดยที่อุณหภูมิ 38°C และ 39°C ต้นพืชตายทั้งหมด และการ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ สามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถทำให้ต้นพืชปราศจากเชื้อไวรัสได้ จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การทำ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิ 36°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถทำให้พืชมีปริมาณเชื้อไวรัสลดลงอยู่ในระดับปานกลางและระดับต่ำ ที่ระดับอุณหภูมิ 37°Cเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถทำให้พืชมีปริมาณเชื้อไวรัสลดลงอยู่ในระดับต่ำ และ การทำ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 5 สัปดาห์ สามารถทำให้พืชมีปริมาณเชื้อไวรัสลดลงอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งการทำ Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิสูงขึ้นสามารถทำให้ปริมาณเชื้อไวรัสลดลงได้ แต่จะทำให้ต้นไม้ตายมากขึ้น ส่วนการลดอุณหภูมิลงเล็กน้อย และเพิ่มระยะเวลาการใช้ความร้อนมากขึ้น จะสามารถลดปริมาณเชื้อไวรัสได้เช่นกัน และยังสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของต้นพืชได้มากขึ้นอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

คำนูณ กาญจนภูมิ. 2542. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท ด่านสุทธาการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพ. 162 หน้า.

จารุวรรณ จาติเสถียร, สุรภี กีรติยะอังกูร และ สิริลักษณ์ โล่ห์สวัสดิ์. 2540. การกำจัดเชื้อวิสาในกล้วยไม้สกุลออนซิเดียมโดยใช้ความร้อนและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อผลิตพันธุ์ปลอดโรค. วารสารวิชาการเกษตร 15(2) : 136-143.

จิราพร ศรีศาลา. 2544. การผลิตเดหลีพันธุ์ใบมันให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. 39 หน้า.

ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ. 2536. ไม้ประดับในอาคาร. บริษัทไนเต็ดท์บุ๊ค, กรุงเทพมหานคร. 168 หน้า.

ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ. 2539. ไม้ประดับในอาคาร. บริษัทไนเต็ดท์บุ๊ค, กรุงเทพมหานคร. 179 หน้า.

บุญยืน กิจวิจารณ์. 2544. เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 2. หจก. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา, ขอนแก่น. 207 หน้า.

ปิยะ เฉลิมกลิ่น. 2540. ไม้ดอกหอมเล่ม 1. บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนพับลิชชิ่ง จำกัด (มหาชน). กรุงเทพมหานคร. 172 หน้า.

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

นวลพรรณ งามยิ่สุ่น. 2539. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสและไวรอยด์ . ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. 120 หน้า.

สุรภี กีรติยะอังกูร และ กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร . 2538. การจำแนกเชื้อ CMV และ ByMV เพื่อเปรียบเทียบอาการและการแพร่ระบาดบนแกลดิโลลัส. หน้า 117-122. ใน : รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร.

อารีย์ วรัญญวัฒก์. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อการปรับปรุงพันธุ์. โรงพิมพ์อักษรรัตน์, กรุงเทพมหานคร. 133 หน้า.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bhardwaj, S.V., S.J.Rai., P.D.Thakur., A.Handa. and A.Hadidi. 1998. Meristem tip culture and heat therapy for production of apple mosaic virus free plants in India. Pp. 135-140. In : Proceedings of the 17th international symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruit crops, fruit tree diseases. USA.

Bruna, A., J.I. Burba and C.R.Galmarini. 1997. Effect of thermotherapy and meristem tip culture on production of virus free garic in Chile. Pp. 631-634. In : Proceedings of the First International Symposium on Edible Alliaceae. Argentina.

Brunt, A.A., K.Crabtree, M.J.Dallwitz, A.J.Gibbs and L.Watson. 1995. Virus of Plant. University press. UK. 1484 pp.

Clark, M.F. and A.N.Adams. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of General Virology 34 : 475-483.

Chagas, C.M., A.Colariccio., S.R.Galleti. and E.W.Kitajima. 1993. Natural infection of Amorphophallus konjac with dasheen mosaic virus in Brazil. (Abstract). Fitopatologia-Brasileira 18(4) : 551-554.

Conci, V.C., J.L.Burba. and C.R.Galmarini. 1997. An overview of allium viruses in argentina. Pp. 593-600. In : Proceedings of the First International Symposium on Edible Alliaceae. Argentina.

Dong, Y.F., J.M. Yu., Y. Hong., Z.P. Zhang., S.Y. Zhang. And G.P. Wang. 1998. Study on the techniques of eliminating apple stem grooving capillovirus in pear trees. (Abstract). China-Fruits 4 : 8-10.

Faccioli, G. And A. Colombarini. 1996. Correlation of potato virus S and virus content of potato meristem tips with the percenttage of virus free plants produces in vitro. (Abstract). Potato-Research 39 : 2, 129-140.

Earle, E.D. and Langhans, R.W. 1974a. Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. I. Multiple plantlets from shoot tips and estsblishment of tissue cultures. (Abstract). J. Am. Soc. Hortic. Sci 99 : 128-132.

Earle, E.D. and Langhans, R.M. 1974b. Propagation of *Chrysanthemum* in vitro. II. Production, growth, and flowering of plantlets from tissue cultures. (Abstract). J. Am. Soc. Hontic. Sci 99 : 352-358.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fawzy, R.N., L.R.Rizkalah., A.I.I.Fiki.El. and A.E.Badr. 1992. Virus-free carnation plants through tissue culture technique. Annals-of Agricultural-Science 30(1) : 211-220.

Gautheret, R. J. 1985. History of plant tissue and cell culture : A persoonal account. *In* Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vasil, I. K. (ed.), Academic Press, Orlando. 1232 pp.

Gella , R. and P.Errea. 1998 . Application of in vitro therapy for ilarvirus elimination in three Prunus species. Journal-of-Phytopathology 146 : 445-449.

Gomez, L., M.Monge., R.Valverde., O.Arias. and T.Thorpe. 1989. Micropropagation of 3 virus- free edible aroids. (Abstract). Turrialba 39(2) : 155-161.

Hartman, R.D. and F.W.Zettler. 1974. Effect of dasheen mosaic virus on yield of *Caladium*, *Dieffenbachia* and *Philodendron*. Phytopathology 64 : 763.

Henny, R.J., A.R. Chase. and L.S. Osborne. 1991. Spathiphyllum Production Guide. [Online]. Available : http://www.mrec.ifas.ufl.edu/Foliage/folnotes/spathiph.htm.

Hollings, M. 1965. Disease control through virus-free stock. Ann. Rev. Phytopathol. 3 : 387-396.

Hollings, M. And Stone, O.M. 1964. Investigation of carnation viruses. I. Carnation mottle. Ann. Biol. 53 : 103-118.

Hu, J.S., D.M.Sether., D.E.Ullman., B.E.Lockhart., P.Prevel.Martin,(ed.). and R.Hugon. 1997. Mealybug wilt of pineapple: pineapple viruses and two-step heat treatment of pineapple crowns. Pp.485-492. In : Proceedings of second international pineapple symposium. Martinique.

Knapp, E., V.Hanzer., H.Weiss., A.da.Machado.Camara., B.Weiss., Q.Wang., H.Katinger., M.Machado.Canara.da.Laimer. and A.Machado.camara.Da. 1995. New aspects of virus elimination in fruit trees. (Abstract). XVIth International Symposium on fruit tree diseases 386 :409-418.

Kuniyuki , H. , J.A.Betti. and A.S.Costa. 1994 . Prolonged heat-treatment hinders production of virus-free grapevines by means of propagation of shoot tips. (Abstract). Fitopatologia-Brasileira 19(2) : 209-213 .

Kuniyuki, H., G.B.Kuhn., V.A.Yuki. and A.S.Costa. 1997. Occurrence, transmission and thermotherapy of the grapevine vein necrosis in the state of Sao Paulo, Brazil. (Abstract). Fitopatologia-Brasileira 22(2) : 186-190.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Langhans, R.W., Horst, R.K. and Earle, E.D. 1977. Disease-free plants via tissue culture propagation. HortScience, 12 : 149-150.

Leonhardt, W., C.Wawrosch., A.Auer., B.Kopp. and A.C.Cassells. 1998. Monitoring of virus diseases in Austrian grapevine varieties and virus elimination using in vitro thermotherapy. Second international symposium on bacterial and bacteria-like contaminants of plant tissue culture. 52 : 1-2, 71-74.

Matthews, C.G., K.S. Milne., R.L.S. Forster., H.F. Neilson., G. Loebenstein., J. Hammond., A. Gera., A.F.L.M. Derks. and V.A. Zaayen. 1996. Comparison of four potyvirus isolates infecting aroid species. (Abstract). Ninth international symposium on virus diseases of ornamental plants 432 : 354-362.

Murashige, T., 1980. Plant Growth Substances in Commercial uses of Tissue Culture. Plant Growth Substances 1979. Springer-Verlag, Berlin. 765 pp.

Paet, C.N. and A.B.Zamora. 1990. Efficacy of thermotherapy and group culture of isolate potato meristem for the elimination of single and mixed infection of potato virus Y, potato virus S, potato leaf roll virus. Phoilippine Journal of Crop Science 15(2) : 113-118.

Quak, F., 1977. Meristem culture and virus-free plants. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin, pp. 598-615.

Rankovic , M. D.Ruzic., S.Paunovic., S.Jevtic (ed) and B.Lazic. 1997. Health status and recovery of potato cv. Early Rose. Pp. 357-362. In : Proceedings of the first Balkan symposium on vegetables and potatoes. Yugoslavia .

Ravnikar, M.., I.Plaper., R.Ucman., J.Zel.,B.Javornik(ed.)., B.Bohanec,(ed.) and I.Kreft. 1994. Establishment of an efficient method for virus elimination in meristem cultures and regeneration of high quality plants. Pp.97-102. In : Proceedings of the International Colloquim on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture. Slovenia.

Ravnikar, M., I.Mavric., R.Ucman., S.Ivanovic., M.Kus. and J.Zel. 1996. Viruses of garlic (*Allium sativum* L. cv. Ptujski Spomladanski) and breeding of healthy plants in tissue culture. (Abstract). Novi izzivi v poljeddelstvu'96. Slovenia. 189-193.

Shiboleth, Y.M., A.On.Gal., M.Koch., H.D.Rabinowitch., and R.Salomon. 2001. Molecular characterization of Onion yellow dwarf virus (OYDV) infecting garlic (*Allium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sativum L.) in Israel : thermotherapy inhibits virus elimination by meristem tip culture. Annals-of Applied-Biology 183(2) : 187-195.

Shishida, Y., J.Shimoyama. and M.Ushiama. 1991. Elimination of DasMv and KMV and mass multiplication through shoot tip culture in konjak plants. Gunma-Journal-of-Agricultural Research 8 :1-10.

Stace-Smith, R. And Mellor, F.C., 1968. Eradication of potato viruses x and s by thermotherapy and axillary bud culture. Phytopathology. 58 : 199-203.

Thankappan, M. 1993. Tuber crops are vulnerable to viruses. India-Horticulture 38(3) : 25-26.

Torres, A.C., T.V.M.Fajardo.,A.N.Dusi.,R.de. O.Resende. and J.A.Buso. 2000. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free of garlic. (Abstract). Horticultura-Brasileira 18(3) : 192-195.

Truskinov, E.V. and E.V. Rogozina. 1991. Use of heat therapy combined with tissue culture in freeing potato from virus infection. (Abstract). Nauchno-Tekhnicheskii-Byulleten'-Vsesoyuznogo-Ordena-Lenina-i-Ordena-Druzhby-Narodov-Nauchno-Issledovatel'skogo-Instituta-Rastenievodstva No.214 : 48-51.

Upadyshev, M.T. 1996. Sanitation and propagation of non-traditional berry and fruit crops. (Abstract). Sadovodstvo-i-Vinogradarstvo. : 15-17.

Uskov, A.I. and V.V.Boiko. 1997. Details of obtaining healthy starting material of potato cultivars. (Abstract). Kartofel'-i-Ovoshchi 2 : 29.

Walkey, D.G.A. and Cooper, V.C. 1972. Some factors affecting the behaviour of plant viruses in tissue culture. Physiol Plant Pathol 2 : 259-264.

Wand-JiFang., Cai-Lin., Jia-ChunLan. and Zhu-DeWei. 1995. Effect of 6-BA on the commodity characteristic of tissue cultured floribundum spathiphyllum F1. (Abstract). International symposium on cultivar improvement of horticultural crops, Part III : flowers 404 : 157-160.

Watson, L., and M.J. Dallwitz. 1992. The Families of Flowering Plants Description, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. [Online]. Available : http:// biodiversity. uno.edu/delta/.

Zettler, F.W., M.M.Abo El-Nil and R.D. Hartman. 1978. Dasheen mosaic virus commonwealth Mycological Institute / Assoc. Appl. Biological. Description of Plant Viruses 191 : 4.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zhang-YuMan., YanTing-Tian., XiaoFang-Luo., Y.M.Zhang., Y.T.Tian. and X.F.Luo. 1998 . Micropical culture of grapevine and detection of grapevine fan leaf virus by ELISA and probe. (Abstract). Journal-of-Beijing-Forestry-University 20(4) : 54-58.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร Murashig & Skoog (MS) (1962)

สารเคมี	ปริมาณสาร (mg/l)
Major inorganic nutrient	
Stock 1 NH_4NO_3	1650
Stock 2 KNO_3	1900
Stock 3 $CaCl_2.2H_2O$	440
Stock 4 $MgSO_4.7H_2O$	370
Stock 5 KH_2PO_4	170
Trace element	
Stock 6 $MnSO_4.4H_2O$	22.3
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6
H_3BO_4	6.2
KI	0.83
$Na_2MoO_4.7H_2O$	0.25
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Iron Soure	
Stock 7 $FeSO_4.7H_2O$	27.8
$Na_2.EDTA.2H_2O$	37.3
Organic supplement	
Stock 8 Thamine HCl	0.1
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Glycine	2
Inositol	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ 2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ตรวจสอบหาปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การเตรียม buffer

Coating buffer (pH 9.6)

Na_2CO_3	1.59	g.
$NaHCO_3$	2.00	g.
NaN_3	0.20	g.
เติมน้ำให้ครบ	1.00	l.

PBS (pH 7.4)

NaCl	8.00	g.
KH_2PO_4	0.20	g.
$Na_2HPO_4.12H_2O$	2.90	g.
KCl	0.20	g.
NAN_3	0.20	g.
เติมน้ำให้ครบ	1.00	l.

PBS-Tween

หยด Tween 20 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงใน PBS 1 ลิตร

Substrate buffer

Diethanolamine	97	ml.
H_2O	800	ml.
NAN_3	0.20	g.

ปรับ pH ให้เท่ากับ 9.8 และเติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้