17442

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี
เรื่อง

การกระจายตัวของ Dasheen Mosaic Virus ในพลูราชินีสีทอง (*Scindapsus aureus*)

Distribution of Dasheen Mosaic Viruses in Golden Queen (*Scindapsus aureus*)

โดย

T098813

นายดริส วีรธรรมจำรัส

ปัญหาพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2543

ฟพ.
ค162ก
2543
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

การกระจายตัวของ Dasheen Mosaic Virus ในพลูราชินีสีทอง (*Scindapsus aureus*)

Distribution of Dasheen Mosaic Viruses in Golden Queen (*Scindapsus aureus*)

โดย

นายคริส วีรธรรมจำรัส

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.....

(ผศ. ดร. นวลพรรณ งามยี่สุ่น)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ. ดร. วรเดช จันทรสร)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วันที่ ๓๑ เดือน พฤ พ.ศ. ๒๕๔๙

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การกระจายตัวของ Dasheen Mosaic Virus ในพลูราชินีสีทอง (*Scindapsus aureus*)

โดย : คริส วีรธรรมจำรัส

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา : ..... 30 / 5 / 2544

(ผศ. ดร. นวลพรรณ งามยี่สุ่น)

การศึกษาการกระจายตัวของเชื้อ Dasheen Mosaic Virus (DMV) ในพลูราชินีสีทองหรือพลูสีทอง (*Scindapsus aureus*) โดยนำพืชที่เป็นโรคมาตัดแบ่งเป็น 5 ส่วน ประกอบด้วย ใบอ่อน, ใบแก่, ก้านใบ, ลำต้น และราก แล้วนำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆด้วยวิธี ELISA tests พบว่าทุกส่วนของพลูราชินีสีทองมีปริมาณเชื้อใกล้เคียงกัน ยกเว้นรากมีปริมาณเชื้อน้อยที่สุด นอกจากนี้การเติม 1% PVP และ 2.5% Nicotinic acid, 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol, 1% PVP และ 0.01% Thioglycolic acid, 2% PVP และ 2.5% Nicotinic acid, 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol หรือ 2% PVP และ 0.01% Thioglycolic acid ในระหว่างการบดใบพืชไม่ช่วยให้ผลการทดสอบชัดเจนมากยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Title : Distribution of Dasheen Mosaic Viruses in Golden Queen (*Scindapsus aureus)*

By : Chris Verathamjamras

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Major field : Pest Management Technology

Advisor : N. Ngamyeesoon 30/5/2001

(Asst. Prof. Dr. Nualphan Ngamyeesoon)

Studies on the distribution of Dasheen Mosaic Virus (DMV) in Golden Queen (*Scindapsus aureus*) by cutting infected plants from 5 different parts, that included young leaves, old leaves, stalks, stems, and roots. Using ELISA tests to compared virus concentrate in each sample. In this experiment showed that all sample had the same level of virus concentrate, except roots sample that have less concentrate than other sample. To improve the effeiciency of ELISA tests, additives were mixed with extraction buffer during the grinding leaves process. The additives were 1% PVP with 2.5% nicotinic acid, 1% PVP with 0.1% 2-Mercaptoethanol, 1% PVP with 0.01% Thioglycolic acid, 2% PVP with 2.5% nicotinic acid, 2% PVP with 0.1% 2-Mercaptoethanol, or 2% PVP with 0.01% Thioglycolic acid. The result demonstrated that all additives did not increase the efficiency of ELISA test for DMV.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษฉบับนี้ สำเร็จลงได้ด้วยดีโดยได้รับความกรุณาจาก อาจารย์ ผศ.ดร. นวลพรรณ งามยิ่สุ่น อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จเรียบร้อยและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณรุ่นพี่ปริญญาโทที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือ แนะนำ และให้คำปรึกษาตลอดการทดลอง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยาที่ได้ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ

ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ในด้านปัจจัยต่างๆ ตลอดจนขอบคุณเพื่อนๆ และ น้องๆ ที่มีส่วนช่วยเกี่ยวข้องเป็นกำลังใจ และให้การช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

คริส วีรธรรมจำรัส

เมษายน 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ i

Abstract ii

คำนิยม iii

คำนำ 1

วัตถุประสงค์ 2

การตรวจเอกสาร 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 8

ผลการทดลอง 20

วิจารณ์ผลการทดลอง 35

สรุป 37

เอกสารอ้างอิง 38

ภาคผนวก 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆในการทดลองที่ 1 ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 60 นาที 20
2. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละตัวอย่างในการทดลองที่ 1 รวมทั้ง 3 ความเจือจาง ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 60 นาที 21
3. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ ในการทดลองที่ 2 ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 30 นาที 27
4. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละ Additive ในการทดลองที่ 2 ที่ความเจือจางต่างๆ ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 60 นาที 28
5. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละตัวอย่างในการทดลองที่ 2 รวมทั้ง 2 ความเจือจาง ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 30 นาที 29
6. การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละ Additiveใน การทดลองที่ 2 รวมทั้ง 2 ความเจือจาง ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 30 นาที 30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

1. แสดงลักษณะอาการด่างที่ปรากฏบนใบแก่ของพลูราชินีสีทองที่เป็นโรค 9
2. แสดงลักษณะอาการด่างที่ปรากฏบนใบแก่ของพลูราชินีสีทองที่เป็นโรค 10
3. แสดงการตัดแบ่งพลูราชินีสีทองออกเป็น 5 ส่วนเพื่อใช้ในการตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ DMV 13
4. แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA 14
5. แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA 15
6. แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทอง โดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช 18
7. แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive บัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช 19
8. แสดงค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทอง โดยวิธี Indirect ELISA 22
9. แสดงผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพืช โดยวิธี Indirect ELISA 23
10. แสดงบันทึกผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพืช โดยวิธี Indirect ELISA 24
11. แสดงผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพืช โดยวิธี Indirect ELISA 25
12. แสดงบันทึกผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพืช โดยวิธี Indirect ELISA 26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. แสดงผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช 31
14. แสดงบันทึกผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช 32
15. แสดงผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช 33
16. แสดงบันทึกผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช 34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ในอดีตมนุษย์มีความผูกพันกับธรรมชาติเป็นอย่างมาก แต่ในปัจจุบันตึกใหญ่อาคารสูงในบ้านเราทุกวันนี้ ผุดขึ้นดังดอกเห็ดป่าปลายฤดูฝน และเนื่องด้วยมนุษย์เราทุกคนยังคงมีความต้องการใกล้ชิดธรรมชาติ ไม้ประดับในอาคารจึงถือกำเนิดขึ้นเพื่อความสวยงาม และสนองตอบความต้องการของมนุษย์ในส่วนนี้ ไม้ประดับที่เป็นที่นิยมและคุ้นตาตามสำนักงานมีมากมายหลายชนิด เช่น ปาล์ม ไทร พลู และอื่นๆ

พลูราชินีสีทองหรือพลูสีทอง (*Scindapsus aureus* 'Golden Queen') เป็นไม้ในวงศ์ Araceae มีใบสีเหลืองอ่อนออกทอง นิยมใช้เป็นไม้ประดับในอาคารกันมาก ทำให้มีการผลิตออกสู่ตลาดกันอย่างกว้างขวาง Dasheen Mosaic Virus (DMV) เป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชชนิดหนึ่งที่สามารถสร้างความเสียหายให้กับพลูราชินีสีทอง ส่งผลให้พลูราชินีสีทองมีคุณค่าในแง่ของความเป็นไม้ประดับลดลง บ่อยครั้งที่พลูราชินีสีทองไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ DMV ให้เห็นในระยะใบอ่อน ทำให้การวินิจฉัยโรคเป็นไปได้ยาก การตรวจสอบการเกิดโรครวมทั้งการทดสอบต่างๆทางไวรัสวิทยา จำเป็นต้องใช้ส่วนของพืชที่มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อสูง ปัญหาพิเศษฉบับนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อจะได้ทราบว่าภายหลังจากที่พลูราชินีสีทองถูกเชื้อ DMV เข้าทำลายสร้างความเสียหายแล้ว ส่วนใดของพืชที่มีแนวโน้มต่อการพบเชื้อ DMV มากที่สุด เพื่อที่จะเป็นประโยชน์ในการนำส่วนดังกล่าวของพืชไปใช้ในการตรวจสอบการเกิดโรคได้ดีที่สุด หรืออาจนำส่วนดังกล่าวของของพืชไปใช้ในกระบวนการทางไวรัสวิทยาอื่นๆตามสมควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการตรวจสอบโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสโดยการใช้วิธี ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays)
2. เพื่อศึกษาการกระจายตัวของเชื้อ Dasheen Mosaic Virus (DMV) ในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทอง (*Scindapsus aureus* 'Golden Queen')
3. เพื่อทดสอบความแตกต่างของการเติมและไม่เติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการบดตัวอย่างพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ไม้ประดับชนิดหนึ่งที่พบเห็นได้ทั่วไปตามร้านขายต้นไม้ คือ พลูด่าง ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Scindapsus aureus* และมีชื่อสามัญในประเทศอังกฤษว่า Devil's Ivy แต่ในประเทศสหรัฐอเมริกามีชื่อสามัญว่า Golden Pothos (Hessayon, 1996) พลูด่างเป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Araceae (ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ, 2536 ; Ward and Peskett, 1973) ลักษณะโดยทั่วไปของพลูด่างจะเป็นไม้เถาเลื้อย ลำต้นอวบน้ำ มีรากยึดเกาะออกตามลำต้น ใบแตกออกเป็นข้อตามต้น ใบมนป้อม ปลายใบแหลม โคนใบเว้าเล็กน้อยมีลักษณะคล้ายรูปหัวใจ ขนาดใบกว้างประมาณ 4-6 ซม. ยาวประมาณ 5-8 ซม. (ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ, 2539) ลักษณะต้นทั่วๆไปคล้ายพวก Ivy คือเป็นไม้เถาพวกใบเท่านั้น ดอกไม่สวยงามเหมือนดอกพวก Arum มีกาบดอกห่อหุ้มเดือยของดอกอีกทีหนึ่ง (ศิริพร, 2536) พลูด่างบางสายพันธุ์ จะมีพื้นที่ใบส่วนใหญ่เป็นสีขาวหรือสีเหลืองเป็นส่วนมาก เรียก พลูราชินีหินอ่อน(*Scindapsus aureus* "Marble Queen") หรือพลูราชินีสีทอง(*Scindapsus aureus* "Golden Queen") ตามลำดับ (Hessayon, 1996) พลูราชินีสีทองมีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกับพลูด่าง ต่างกันที่พลูราชินีสีทองเป็นไม้สกุลพลูใบสีเหลืองอ่อนออกทองมีนิสัยไม่ชอบแดด หากได้รับแสงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์จะดีมาก (พานิชย์, 2539) แต่พลูด่างเป็นไม้สกุลพลูใบสีเขียวสดสลับเหลืองนวล ต้องการแสงมาก หากได้รับแสงน้อยหรือแสงไม่พอ สีของใบจะซีดไม่สวย (ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ, 2536) เนื่องจากนิสัยไม่ชอบแดด พลูราชินีสีทองจึงอยู่ได้ดีตามตึกอาคารสูงๆ ในห้องปรับอากาศ เพียงแต่ช่วงกลางวันมีแสงไฟเปิดให้ก็เป็นการเพียงพอ เพราะหากใบของไม้ชนิดนี้ได้รับแสงเกิน 70 เปอร์เซ็นต์ ใบจะมีสีเขียวไม่สวยดังเดิม สิ่งสำคัญระหว่างวางตั้งไว้ในห้องนั้นควรมีการรดน้ำให้กับพลูราชินีสีทองด้วย ใช้น้ำเพียงแก้วเดียวหยอดลงตรงหลัก น้ำจะไหลซึมลง มีกาบมะพร้าวอุ้มความชื้นไว้ หลักที่ปลูกพลูราชินีสีทองควรมีความสูง 80 ซม.ถึง 120 ซม. เมื่อยอดของพลูราชินีสีทองทอดขึ้นสุดหลัก ปลายยอดจะโน้มลงมาสวยงามมาก การใส่ปุ๋ยอาจใช้ปุ๋ยสูตร 20-20-20 โดยนำปุ๋ยมาผสมกับน้ำ อัตรา 1 ช้อนแกงต่อน้ำ 1 ลิตร หยอดให้ที่โคนต้น จะทำให้ใบมีสีสันสวยงาม (พานิชย์, 2539)

ไวรัสสร้างความสูญเสียให้กับพืชทุกปี ไวรัสต่างจากจุลินทรีย์สาเหตุโรคทั่วไปที่ตามปกติแล้วจุลินทรีย์สามารถเจริญบนอาหารสังเคราะห์และศึกษาภายนอกพืชอาศัยได้ ไวรัสไม่อาจมีกระบวนการเมทาบอลิซึมได้โดยตัวของมันเอง ต้องอาศัยความสัมพันธ์กับพืชอาศัย ไวรัสไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้ในเซลล์สังเคราะห์ ไวรัสอาจถูกจำแนกได้โดยการผ่าน Porcelain filters ซึ่งมีรูเล็กๆที่สามารถกรองแบคทีเรียได้ (Bos, 1978) Dasheen Mosaic Virus (DMV) เป็นไวรัสพืชชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนึ่งที่สามารถเข้าทำลายสร้างความเสียหายให้กับพืชที่อยู่ในวงศ์ Araceae ได้ คุณสมบัติโดยทั่วไปของเชื้อ DMV มีดังนี้ เป็นไวรัสในกลุ่ม potyvirus รูปร่างเป็นเส้นสายยาวประมาณ 750 nm. (Zettler *et. al.*, 1970 ; Abo El-Nil *et. al.*, 1977) มีรหัสพันธุกรรมเป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดนิวคลีอิก 5% โปรตีน 95% พบไวรัสในเซลล์ชั้นมีโซฟิลล์ อีพิเดอร์มิส และอาจพบในท่อลำเลียงอาหาร ไวรัสทำให้เกิด cylindrical inclusion protein รูป pinwheel ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ(Brunt *et. al*, 1995) สามารถพบการแพร่กระจายของเชื้อไวรัส DMV ได้ทั่วโลกโดยเฉพาะในเขตร้อนและเขตกึ่งร้อน (Zettler *et. al.*, 1970 ; Brunt *et. al.*, 1995) พบการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางแมลงพาหะแบบกึ่งถาวร คือเพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* และ *Aphis craccivora* สามารถถ่ายทอดผ่านการปลูกเชื้อโดยวิธีกลได้ ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ด ละอองเกสร และการสัมผัสระหว่างต้น (Brunt *et. al*, 1995 ; Zettler and Hartman, 1995) น้ำคั้นที่ได้จาก *Philodendron selloum* มีคุณสมบัติดังนี้ เชื้อจะหมดสภาพการก่อโรคเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65°c เป็นเวลา 10 นาที หรือถูกทำให้มีความเจือจาง 10^{-3}-10^{-4} หรือเก็บที่อุณหภูมิ 26°c เป็นเวลานานกว่า 75 ชั่วโมง (Alconero, 1972 ; Abo El-Nil *et. al.*, 1977 ; Brunt, 1995)

CMI/AAB (1978) รายงานว่า DMV ระบาดทั่วไปใน *Aglaonema*, *Caladium*, *Colocasia*, *Dieffenbachia*, *Xanthosoma* และ *Zantedeschia*

พืชทดสอบที่ใช้ในการวินิจฉัยโรค ได้แก่

- *Philodendron selloum* ต้นกล้าที่เจริญจากเมล็ดแสดงอาการ systemic vein chlorosis หลังปลูกเชื้อ 2-3 สัปดาห์ จากนั้นจะแสดงอาการด่างอย่างรุนแรงและใบเล็กลง
- *Caladium hortulanum, Colocasia esculenta* และ *Xanthosoma caracu* แสดงอาการใบด่างเฉพาะที่ ใบที่ติดเชื้อจำนวนมากอาจไม่แสดงอาการ
- *Dieffenbachia picta* ใบแสดงอาการด่างและมีรูปใบผิดปกติ ในบางกรณีใบที่ยังไม่คลี่อาจบิดเบี้ยว ใบแก่อาจฉีกขาดเนื่องจากอัตราการขยายตัวของเนื้อใบไม่เท่ากัน
- *Zantedeschia* ใบแสดงอาการด่างและมีรูปใบผิดปกติ

พืชที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนและเก็บรักษาเชื้อ ได้แก่

- *Philodendron selloum* โดยต้นที่เจริญจากเมล็ดใช้เป็นแหล่งของเชื้อไวรัสในการแยกเชื้อบริสุทธิ์และใช้เพื่อเป็นแหล่งเก็บรักษาเชื้อไวรัส

พืชทดสอบที่ใช้ในการเปรียบเทียบการเกิดโรค ได้แก่

- *Philodendron verrucosum* เป็นพืชอาศัยที่แสดงอาการ local lesion
- *Philodendron selloum* เป็นพืชอาศัยที่ใช้ในการทดสอบการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน (Zettler *et. al.*, 1970 ; Abo El-Nil *et. al.*, 1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกระจายตัวของเชื้อไวรัสตามส่วนต่างๆของพืชมักจะไม่เท่ากัน ดังเช่นรายงานการศึกษาต่างๆต่อไปนี้

Bellardi and Vicchi (1995) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี ELISA tests พบว่า *Gladiolus* sp. ที่ถูกเข้าทำลายโดย Bean Yellow Mosaic Virus (BYMV) มีปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนใบและดอกสูงเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนหัวใต้ดิน

Hu *et. al.* (1995) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Indirect ELISA tests พบว่าเชื้อ Dasheen Mosaic Virus ที่เข้าทำลาย *Colocasia esculenta* จะมีปริมาณสูงในส่วนใบมากที่สุดและในส่วนใบแก่มากกว่าใบอ่อน

Fillhart and Castello (1996) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี ELISA tests พบว่า *Chenopodium quinoa* ที่เจริญจากเมล็ดซึ่งปลูกโดยใช้ดินจาก Whiteface Mountain ผสมกับ sterilized Promix อัตราส่วน 1 : 1 มีการถ่ายทอดเชื้อ Tomato Mosaic Virus (ToMV) ผ่านทางราก และสามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในส่วนราก 9 จาก 59 ตัวอย่าง ขณะที่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสในส่วนใบ

James and Mukerji (1996) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Plate-trapped antigen ELISA (PTA-ELISA) พบว่าส่วนใบอ่อนและดอกเป็นเนื้อเยื่อที่ดีที่สุดในการตรวจสอบหาเชื้อ Cherry Mottle Leaf Virus (ChMLV) ที่เข้าทำลาย *Prunus tomentosa*

Li *et. al.* (1996) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี dot-blot hybridization tests พบว่ามะเขือเทศที่ถูกเชื้อ Tomato Infectious Chlorosis Virus (TICV) เข้าทำลาย สามารถพบเชื้อไวรัสมีปริมาณความเข้มข้นมากที่สุดบริเวณใบที่เจริญเต็มที่และแสดงอาการเหลือง

Wu and Langham (1996) ได้ทำการการปลูกเชื้อ Wheat Streak Mosaic Virus (WSMV) บนข้าวสาลีที่ระยะใบที่ 2 แล้วทดสอบโดยใช้วิธี Polyclonal antisera ELISA (PA-ELISA) หลังการปลูกเชื้อ 2 และ 4 สัปดาห์ พบว่าในส่วนใบมีปริมาณของเชื้อมากที่สุด

Pfeilstetter *et. al.* (1997) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี ELISA tests พบว่า *Prunus* spp. ที่ถูกเชื้อ Petunia Asteroid Mosaic Virus (PeAMV) เข้าทำลาย สามารถตรวจเชื้อไวรัสได้เฉพาะส่วนที่แสดงอาการของโรค

Chen *et. al.* (1998)ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) tests พบว่า *Polianthes tuberose* ที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ Tuberose Mild Mosaic Virus (TMMV) สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสมีปริมาณมากที่สุดในส่วน sheath leaves of flower stems.

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ได้มีรายงานการใช้กับงานวิจัยไวรัสพืชครั้งแรกในปี 1976 โดย Clark, Adams และ Barbara ศึกษาเริ่มแรกกับเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชพวกไม้ผลและมันฝรั่ง เช่น plum pox virus, prune dwarf virus และ prunus necrotic ringspot virus ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันนิยมนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบไวรัสชนิดต่างๆ ใช้ในด้านการวินิจฉัยโรค การพยากรณ์โรค การผลิตท่อนพันธุ์ปราศจากโรค และการคัดพันธุ์ต้านทาน ในทางทฤษฎี ELISA เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น ไวรัสพืชทุกชนิด แบคทีเรีย และเชื้อรา (ปราณี, 2530)

ELISA เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบและประเมินโรคไวรัสพืช และมีส่วนสำคัญยิ่งในการเพิ่มขีดความสามารถของนักไวรัสพืช ELISA กลายเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการทดสอบทางเซรุ่มวิทยาของไวรัสพืช เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย เร็ว ปรับใช้ได้หลากหลาย ความไวของปฏิกิริยาสูง และมีความแม่นยำสูง (Converse, 1990 ; Gera, 1995) ELISA นำมาใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมากๆให้ผลแน่นอนในเวลาอันรวดเร็ว สามารถตรวจหาไวรัสที่มีปริมาณน้อยและอนุภาคแตกหักที่ไม่สามารถมองเห็นได้แน่ชัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน สามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของไวรัสชนิดเดียวกันและไวรัสต่างชนิดกัน (ปราณี, 2530)

หลักการของ ELISA คือ แอนติบอดีจะถูกดูดติดอยู่ที่ผนังด้านในของหลุมเล็กๆใน microtitreplate ด้วยปฏิกิริยาทางฟิสิกส์ จำนวนแอนติบอดีจะติดมากน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและความสามารถของเนื้อวัสดุของ microtitreplate เมื่อเติมตัวอย่างทดสอบลงไป แอนติเจนในตัวอย่างจะเข้าทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงทางซีรัมวิทยากับแอนติบอดีที่มีอยู่เดิม เป็นการยึดกันอย่างเหนียวแน่น และไม่ถูกทำลายให้หลุดออกจากกันได้ง่ายๆ ถึงแม้จะล้างด้วยบัฟเฟอร์ที่มีสารพวก Detergent ผสมอยู่ เมื่อเติมแอนติบอดีเอนไซม์ (เป็น Conjugate ที่เตรียมไว้ล่วงหน้า) ก็จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีเอนไซม์อีกครั้งหนึ่ง การล้างด้วยบัฟเฟอร์จะกำจัดพวก non-specific reaction ออกไป แอนติบอดีเอนไซม์จะยังคงอยู่ใน microtitreplate ก็ต่อเมื่อมีแอนติเจนที่จะให้ส่วนของแอนติบอดีเข้าทำปฏิกิริยา ดังนั้นการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเป็นตัวกำหนดว่ามีแอนติเจนอยู่ในตัวอย่างทดสอบนั้นๆ (ปราณี, 2530)

Indirect ELISA เป็น Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA) ประเภทหนึ่ง โดยplateทดสอบจะถูกเคลือบไว้ด้วยแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีตัวแรกซึ่งเป็น Antiviral antiboby ที่ผลิตจากสัตว์ เช่น กระต่าย ต่อมาเติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งเป็น commercial antibody conjugate ที่มีขายเป็นการค้า เช่น Goat anti-rabbit ลงไปทำปฏิกิริยาจับกับแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นจึงเติม p-nitrophenylphosphate เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสีขึ้นแล้วเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาสีที่รู้แน่นอนว่ามีเชื้อและไม่มีเชื้อไวรัสชนิดที่ทดสอบ (Gera, 1995)

ในการทดสอบ ELISA tests เพื่อให้ผลของปฏิกิริยามีความชัดเจนขึ้นอาจมีการเพิ่มขั้นตอนบางขั้นตอนระหว่างการทดสอบ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rankovic and Vaksanovic (1983) รายงานว่าการเติม 2% และ 1% Polyvinylpyrrolidone ร่วมกับ 0.1% 2-Mercaptoehtanol ในขั้นตอนการบดน้ำคั้นจากตัวอย่างพืช จะให้ผลที่ดีในการตรวจสอบเชื้อ Apple Stem Grooving Virus (AGSV) จากเปลือก, ตา, ใบ, กลีบดอก, และผลแอปเปิล

Hewings and D' Arcy (1984) รายงานว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4°c หรือ 22°c เป็นเวลาข้ามคืน (18 หรือ 24 ชั่วโมง)หลังหยอด Anti-Goat IgG จะให้ผลการทดสอบชัดเจนกว่าการเก็บที่ 37°c เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือเก็บที่ 4°c หรือ16°c เป็นเวลา 1, 3 หรือ 6 ชั่วโมง ในการตรวจสอบเชื้อ Beet Western Yellow Virus (BWYV)

Takahashi *et. al.* (1996) รายงานว่าการตรวจสอบเชื้อ Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) ในใบแอปเปิลด้วยวิธี Standard ELISA การใช้สารละลาย 2.5% Nicotinic acid และ 2% Polyvinylpyrrolidone เหมาะสมที่สุดในการบดตัวอย่างใบพืช และวิธี Modified ELISA การใช้ phosphate buffered saline ที่มี 0.05% Tween-20, 2% Polyvinylpyrrolidone และ 0.05% Thioglycolic acid เหมาะสมที่สุดในการบดตัวอย่างใบพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ ได้ทำการทดลองที่ห้องทดลองโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ 2544 - เมษายน 2544 แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง โดยมีอุปกรณ์และวิธีการทดลองดังนี้

อุปกรณ์

1. ต้นพลูราชินีสีทองที่แสดงอาการของโรค Dasheen Mosaic Virus
2. ELISA plate
3. Coating buffer
4. Conjugate buffer
5. Antiserum DMV titre 1/32
6. Anti-Goat IgG (แอนติบอดีของแพะที่ผลิตในกระต่าย)
7. Substrate buffer
8. Phosphate substrate
9. PBS-Tween
10. Polyvinylpyrrolidone (PVP)
11. Nicotinic acid
12. Thioglycolic acid
13. 2-Mercaptoethanol

ลักษณะต้นพลูราชินีสีทองที่เป็นโรค

ต้นพลูราชินีสีทองที่เป็นโรคซึ่งนำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้จะพิจารณาจากอาการของโรคที่แสดงออกมา อาการของโรคที่สามารถสังเกตได้ คือ อาการด่าง โดยที่อาการด่างนี้จะไม่พบบริเวณใบอ่อน พบเฉพาะใบที่เจริญเต็มที่ ทำให้ใบที่เจริญเต็มที่ซึ่งปกติจะมีสีเหลืองนวลทั้งใบมีลายด่างสีขาวซีดปรากฏบนใบ (ภาพที่ 1, 2)และนอกจากนี้อาจปรากฏอาการใบเล็กลงด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1 แสดงลักษณะอาการด่างที่ปรากฏบนใบแก่ของพลูราชินีสีทองที่เป็นโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะอาการด่างที่ปรากฏบนใบแก่ของพลูราชินีสีทองที่เป็นโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 1

การตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA

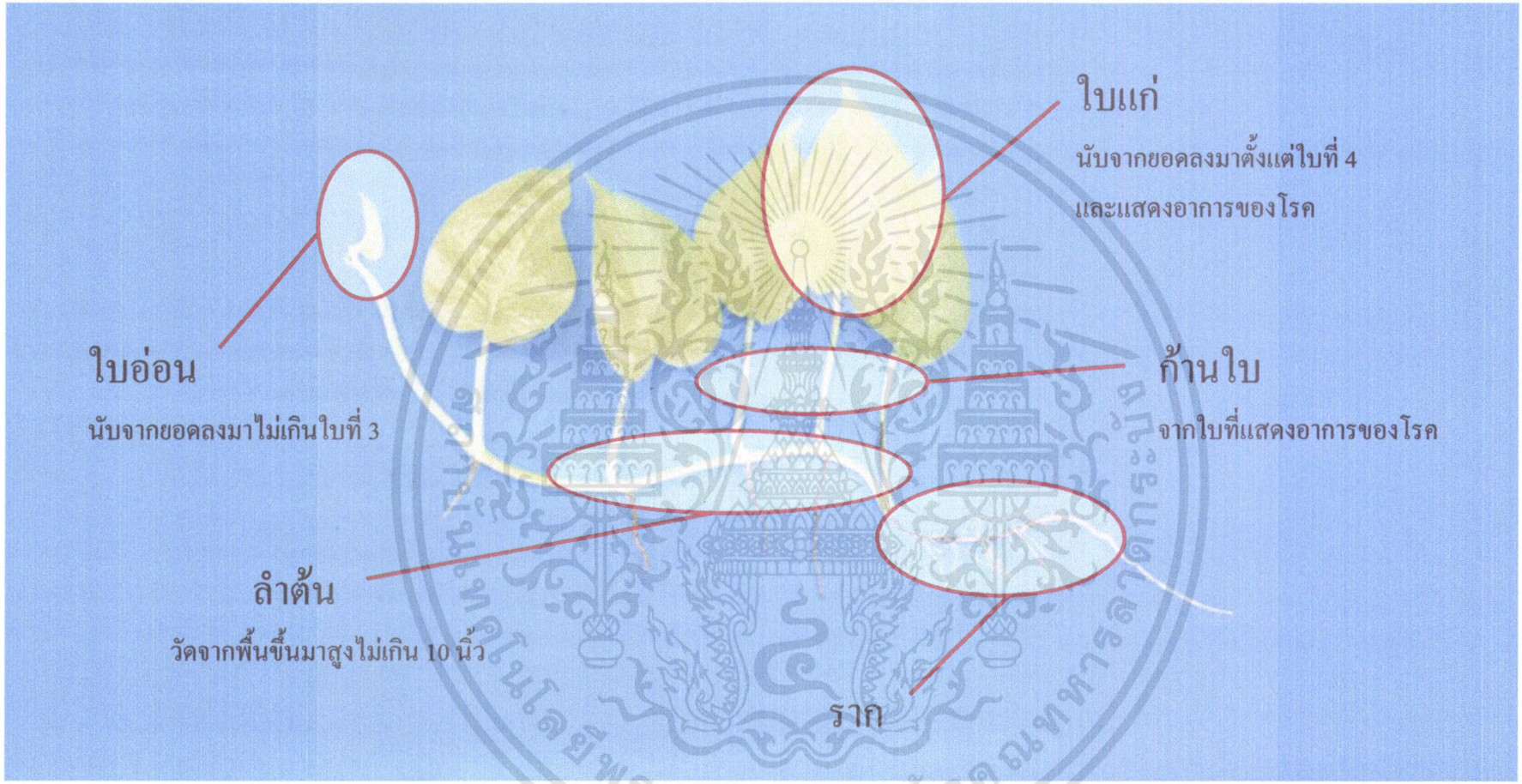
วิธีการทดลอง

1. วางแผนการตรวจสอบตัวอย่างลงบนตารางตรวจสอบและมีหลุมเปรียบเทียบคือ Substrate control (Phosphate substrate buffer อย่างเดียว)
2. ตัดแบ่งต้นพลูราชินีสีทองแต่ละต้นเป็น 5 ส่วนดังนี้ (ภาพที่ 1)
   - ใบอ่อน (นับใบจากยอดลงมาไม่เกินใบที่ 3)
   - ใบแก่ (นับใบจากยอดลงมาตั้งแต่ใบที่ 4 และแสดงอาการของโรค)
   - ก้านใบ (จากใบที่แสดงอาการของโรค)
   - ลำต้น (วัดจากพื้นขึ้นมาสูงไม่เกิน 10 นิ้ว)
   - ราก
3. ชั่งตัวอย่างพืชที่ต้องการตรวจสอบน้ำหนัก 0.1 กรัม แล้วบดโดยนำตัวอย่างพืชใส่ในถุงพลาสติกขนาดเล็ก จำนวน 1 ถุงต่อ 1 ตัวอย่าง จากนั้นหยอด Coating buffer ลงในถุงตัวอย่างให้ได้น้ำคั้นเข้มข้น 1 : 100 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
4. เจือจาง (dilute) น้ำคั้นแต่ละตัวอย่างโดยใช้ Coating buffer ให้ได้น้ำคั้นความเข้มข้น 1 : 1,000 และ 1 : 10,000 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ
5. หยอดน้ำคั้นตัวอย่างพืชทดสอบลงใน ELISA plate ปริมาณหลุมละ 100 µl. (ควรระวังการปนเปื้อนในหลุมอื่น)
6. นำ ELISA plate ใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน
7. ทำการล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที โดย
   7.1 สะบัด ELISA plate แรงๆเพื่อให้น้ำคั้นออกจากหลุม
   7.2 หยอด PBS - Tween ลงในหลุม (ควรระวังการปนเปื้อนระหว่างหลุม)
   7.3 วาง ELISA plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที เป็นการครั้งที่ 1
   7.4 ทำการล้างเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง
   7.5 เมื่อทำการล้างครบ 3 ครั้ง คว่ำ ELISA plate โดยตบแรงๆบนกระดาษซับหรือผ้า
8. หยอดแอนติซีรัม (เจือจาง ใน Conjugate buffer 1 : 10) หลุมละ 100 µl.
9. นำ ELISA plate ใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน
10. ทำการล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้ง ละ 3 นาที (ตามข้อ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. หยอด Anti-Goat IgG ที่ผ่านการใช้มาแล้ว 1 ครั้ง (เจือจาง ใน Conjugate buffer 1 : 2,000) หลุมละ 100 µl.
12. นำ ELISA plate ใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 ˚C เป็นเวลา 1 คืน
13. ดูด Anti-Goat IgG เก็บเข้าตู้เย็นเพื่อใช้ในครั้งต่อไป (ใช้ต่อเนื่องได้ 3 ครั้ง)
14. ทำการล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที (ตามข้อ 7)
15. นำ Phosphate substrate 5 มก. / 10 มล. (2 เม็ด / 1 plate) ละลายใน Substrate buffer แล้วหยอดลงใน ELISA plate หลุมละ 100 µl.
16. ทำการตรวจผลปฏิกิริยาหลังจากทิ้งไว้ 60 นาทีเพื่อรอให้สีเหลืองของปฏิกิริยาชัดเจนยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 แสดงการตัดแบ่งพลูราชินีสีทองออกเป็น 5 ส่วนเพื่อใช้ในการตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ DMV

sample	ใบอ่อน	ใบแก่	ก้านใบ	ลำต้น	ราก							
Rep.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	A	ก	ก	ก	ก	ก						
2	B	ก	ก	ก	ก	ก						
3	C	ก	ก	ก	ก	ก	@					
4	D	ก	ก	ก	ก	ก	@					
5	E	ก	ก	ก	ก	ก	@					
6	F	ก	ก	ก	ก	ก	@					
7	G	ก	ก	ก	ก	ก						
8	H	ก	ก	ก	ก	ก						

1 : 100

<u>ภาพที่ 4</u> แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพลูราชินีสีทอง โดยวิธี Indirect ELISA

- **(ก) แสดงหลุมหยอดน้ำคั้นเจือจาง 1 : 100**
- **@ แสดงหลุม Substrate control**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	sample	ใบอ่อน	ใบแก่	ก้านใบ	ลำต้น	ราก		ใบอ่อน	ใบแก่	ก้านใบ	ลำต้น	ราก	
Rep.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	A	ข	ข	ข	ข	ข		ค	ค	ค	ค	ค	
2	B	ข	ข	ข	ข	ข		ค	ค	ค	ค	ค	
3	C	ข	ข	ข	ข	ข	@	ค	ค	ค	ค	ค	@
4	D	ข	ข	ข	ข	ข	@	ค	ค	ค	ค	ค	@
5	E	ข	ข	ข	ข	ข	@	ค	ค	ค	ค	ค	@
6	F	ข	ข	ข	ข	ข	@	ค	ค	ค	ค	ค	@
7	G	ข	ข	ข	ข	ข		ค	ค	ค	ค	ค	
8	H	ข	ข	ข	ข	ข		ค	ค	ค	ค	ค	
		1 : 1,000						1 : 10,000					

<u>ภาพที่ 5</u> แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA

- **(ข) แสดงหลุมหยอดน้ำคั้นเจือจาง 1 : 1,000**
- **(ค) แสดงหลุมหยอดน้ำคั้นเจือจาง 1 : 10,000**
- **@ แสดงหลุม Substrate control**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2

การตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช

วิธีการทดลอง

1. วางแผนการตรวจสอบตัวอย่างลงบนตารางตรวจสอบและมีหลุมเปรียบเทียบคือ Substrate control (Phosphate substrate buffer อย่างเดียว)
2. ตัดแบ่งต้นพลูราชินีสีทองแต่ละต้นเป็น 4 ส่วนดังนี้ (ภาพที่ 1)
   - ใบอ่อน (นับใบจากยอดลงมาไม่เกิน 3 ใบ)
   - ใบแก่ (นับใบจากยอดลงมาตั้งแต่ใบที่ 4)
   - ก้านใบ (จากใบที่แสดงอาการของโรค)
   - ลำต้น (วัดจากพื้นขึ้นมาสูงไม่เกิน 10 นิ้ว)
3. ชั่งตัวอย่างพืชที่ต้องการตรวจสอบน้ำหนัก 0.1 กรัม แล้วบดโดยนำตัวอย่างพืชใส่ในถุงพลาสติกขนาดเล็ก จำนวน 1 ถุงต่อ 1 ตัวอย่าง จากนั้นหยอด Coating buffer ลงในถุงตัวอย่างให้ได้น้ำคั้นเข้มข้น 1 : 100 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
4. เจือจาง (dilute) น้ำคั้นโดยใช้ Coating buffer ให้ได้น้ำคั้นความเข้มข้น 1 : 100,000 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
5. ชั่งตัวอย่างพืชที่ต้องการตรวจสอบน้ำหนัก 0.1 กรัม แล้วบดโดยนำตัวอย่างพืชใส่ในถุงพลาสติกขนาดเล็ก จำนวน 1 ถุงต่อ 1 ตัวอย่าง จากนั้นหยอด Coating buffer ที่เติมสาร Additive ลงในถุงตัวอย่างให้ได้น้ำคั้นเข้มข้น 1 : 100 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยใช้สาร Additive ที่แตกต่างกันดังนี้
   - 1% PVP และ2.5% Nicotinic acid
   - 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
   - 1% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid
   - 2% PVP และ 2.5% Nicotinic acid
   - 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
   - 2% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid
6. เจือจาง (dilute) น้ำคั้นโดยใช้ Coating buffer ที่เติมสาร Additive แต่ละชนิดให้ได้น้ำคั้นความเข้มข้น 1 : 100,000 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. หยอดน้ำคั้นตัวอย่างพืชทดสอบลงใน ELISA plate ปริมาณหลุมละ 100 µl. (ควรระวังการปนเปื้อนในหลุมอื่น)
8. นำ ELISA plate ใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน
9. ทำการล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที โดย
   9.1 สะบัด ELISA plate แรงๆเพื่อให้น้ำคั้นออกจากหลุม
   9.2 หยอด PBS-Tween ลงในหลุม (ควรระวังการปนเปื้อนระหว่างหลุม)
   9.3 วาง ELISA plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที เป็นการครั้งที่ 1
   9.4 ทำการล้างเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง
   9.5 เมื่อทำการล้างครบ 3 ครั้ง คว่ำ ELISA plate โดยตบแรงๆบนกระดาษซับหรือผ้า
10. หยอดแอนติซีรัม (เจือจางใน Conjugate buffer 1 : 10) หลุมละ 100 µl.
11. นำ ELISA plate ใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน
12. ทำการล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้ง ละ 3 นาที (ตามข้อ 9)
13. หยอด Anti-Goat IgG ที่ไม่ผ่านการใช้ (เจือจาง ใน Conjugate buffer 1 : 2,000) หลุมละ 100 µl.
14. นำ ELISA plate ใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิทแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน
15. ดูด Anti - Goat IgG เก็บเข้าตู้เย็นเพื่อใช้ในครั้งต่อไป (ใช้ต่อเนื่องได้ 3 ครั้ง)
16. ทำการล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้ง ละ 3 นาที (ตามข้อ 9)
17. นำ Phosphate substrate 5 มก. / 10 มล. (2 เม็ด / 1 plate) ละลายใน Substrate buffer แล้วหยอดลงใน ELISA plate หลุมละ 100 µl.
18. ทำการตรวจผลปฏิกิริยาหลังจากทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อรอให้สีเหลืองของปฏิกิริยาชัดเจนยิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
9881

	Rep.	ใบอ่อน		ใบแก่		ใบอ่อน		ใบแก่					
		1	2	1	2	1	2	1	2				
Additive		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	A									@			
II	B									@			
III	C									@			
IV	D									@			
V	E									@			
VI	F									@			
VII	G									@			
	H												

1 : 10,000

ภาพที่ 6 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช

- @ แสดงหลุม Substrate control
- Additive I = ไม่เติมสาร Additive
- Additive II = เติมสาร Additive 2% PVP และ 2.5% Nicotinic acid
- Additive III = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
- Additive IV = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid
- Additive V = เติมสาร Additive 1% PVP และ 2.5% Nicotinic acid
- Additive VI = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
- Additive VII = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rep.		ใบอ่อน 1	ใบอ่อน 2	ใบแก่ 1	ใบแก่ 2	ใบอ่อน 1	ใบอ่อน 2	ใบแก่ 1	ใบแก่ 2				
Additive		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	A									@			
II	B									@			
III	C									@			
IV	D									@			
V	E									@			
VI	F									@			
VII	G									@			
	H												

1 : 100,000

<u>ภาพที่ 7</u> แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช

- @ แสดงหลุม Substrate control
- Additive I = ไม่เติมสาร Additive
- Additive II = เติมสาร Additive 2% PVP และ 2.5% Nicotinic acid
- Additive III = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
- Additive IV = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid
- Additive V = เติมสาร Additive 1% PVP และ 2.5% Nicotinic acid
- Additive VI = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
- Additive VII = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

ตรวจสอบผลการทดลองทั้งสองการทดลองโดยดูจากระดับสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซึ่งสามารถแบ่งได้ตามความเข้มสีเป็น 4 ระดับ คือ

0 = ไม่เกิดสี

1 = สีเหลืองอ่อน

2 = สีเหลือง

3 = สีเหลืองเข้ม

<u>การทดลองที่ 1</u>

จากการทดสอบ ELISA เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทอง โดยดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหลังจากหยอด Phosphate substrate buffer พบว่า น้ำคั้นที่ความเจือจางต่างๆ มีค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ ในการทดลองที่ 1 ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 60 นาที

ตัวอย่างพืช	ค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาที่ความเจือจางต่างๆ [1]		
	1 : 100	1 : 1,000	1 : 10,000
ใบอ่อน	2.875	2.875	2.250
ใบแก่	3.000	2.875	2.125
ก้านใบ	3.000	2.625	2.000
ลำต้น	3.000	2.250	2.000
ราก	3.000	2.000	1.000

<u>1</u>/ ค่าเฉลี่ยจาก 8 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยารวมทั้ง 3 ความเจือจาง (ตารางที่ 2) พบว่า ใบอ่อน ใบแก่ ก้านใบ และลำต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD แต่เมื่อเปรียบเทียบกับรากพบว่า มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD แสดงให้เห็นว่า ต้นพลูราชินีสีทองที่เป็นโรค Dasheen Mosaic Virus จะมีการกระจายตัวของเชื้อไวรัส DMV ในส่วนต่างๆใกล้เคียงกันยกเว้นในส่วนของราก ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อ DMV น้อยกว่าส่วนอื่นๆของต้นพลูราชินีสีทอง

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละตัวอย่างในการทดลองที่ 1 รวมทั้ง 3 ความเจือจาง ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 60 นาที [1]

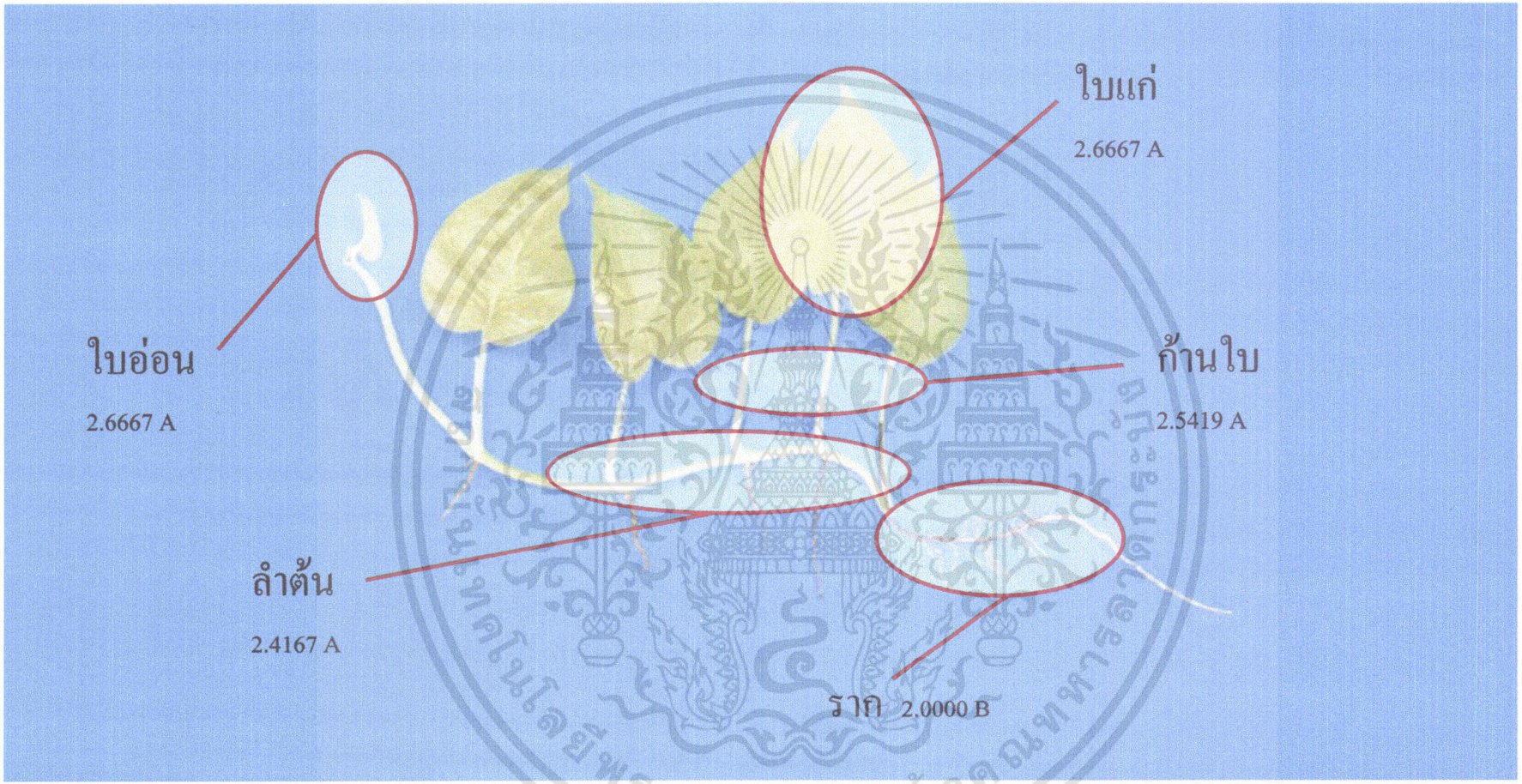
ตัวอย่างพืช	ค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยารวมทั้ง 3 ความเจือจาง [2]
ใบอ่อน	2.6667 A
ใบแก่	2.6667 A
ก้านใบ	2.5417 A
ลำต้น	2.4167 A
ราก	2.0000 B
CV. %	24.13

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 24 ซ้ำ

2/ ตัวเลขค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD

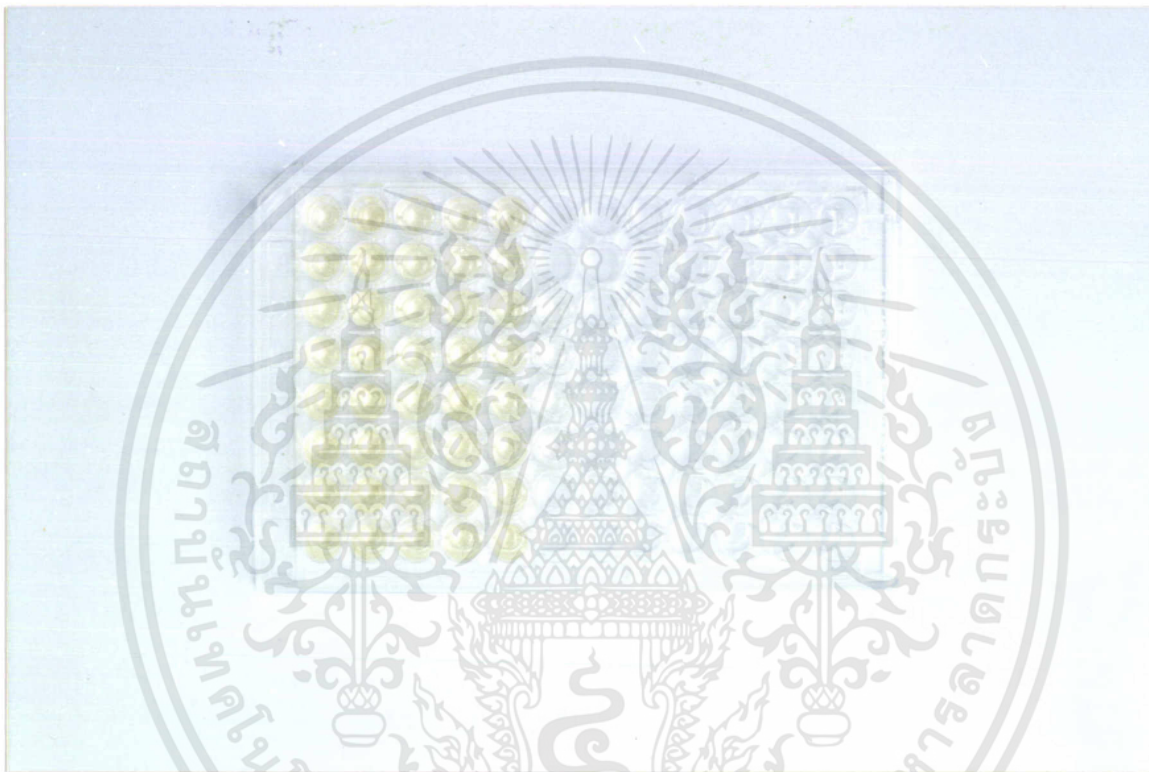
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ เฉลิมพระเกียรติ



ภาพที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทอง โดยวิธี Indirect ELISA

เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



ภาพที่ 9 แสดงผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพืช โดยวิธี Indirect ELISA

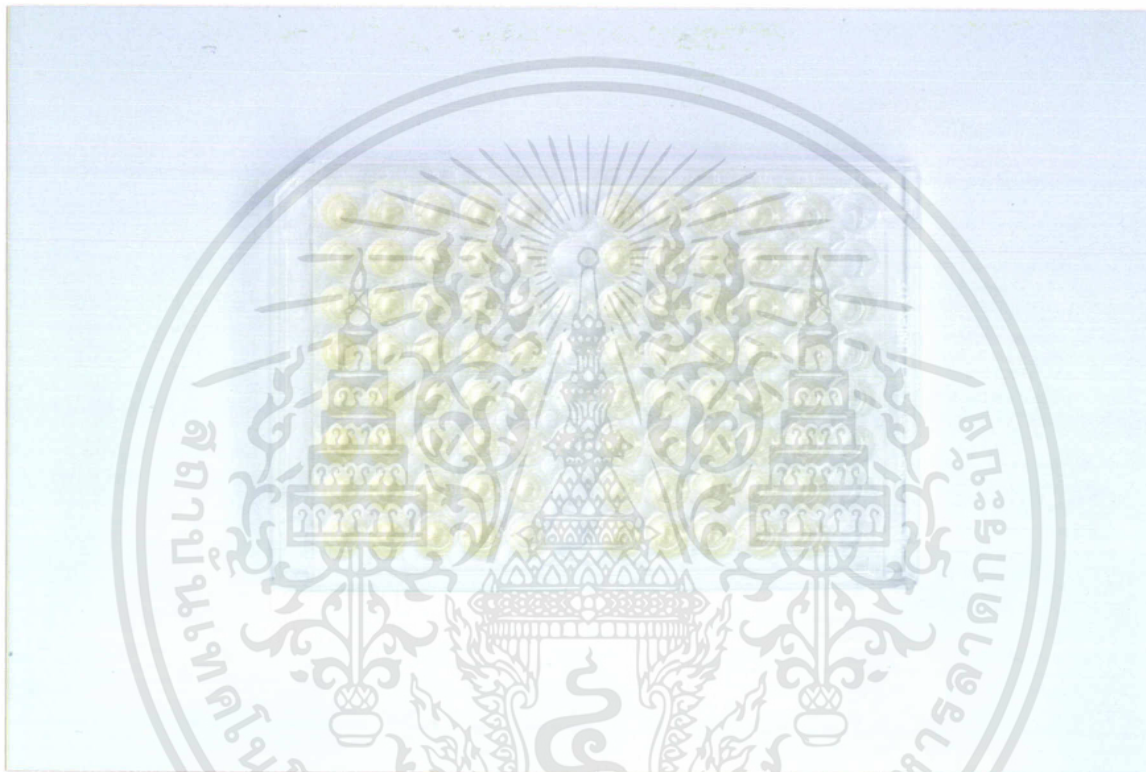
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rep.	sample	1 ใบอ่อน	2 ใบแก่	3 ก้านใบ	4 ลำต้น	5 ราก	6	7	8	9	10	11	12
1	A	2	3	3	3	3							
2	B	3	3	3	3	3							
3	C	3	3	3	3	3	0						
4	D	3	3	3	3	3	0						
5	E	3	3	3	3	3	0						
6	F	3	3	3	3	3	0						
7	G	3	3	3	3	3							
8	H	3	3	3	3	3							

1 : 100

<u>ภาพที่ 10</u> แสดงบันทึกผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพืช โดยวิธี Indirect ELISA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 แสดงผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพืช โดยวิธี Indirect ELISA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	sample	ใบอ่อน	ใบแก่	ก้านใบ	ลำต้น	ราก		ใบอ่อน	ใบแก่	ก้านใบ	ลำต้น	ราก	
Rep.		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	A	3	3	3	3	2		3	2	2	2	1	
2	B	2	3	3	2	2		3	2	2	2	1	
3	C	3	3	2	2	1	0	2	2	2	2	1	0
4	D	3	2	3	3	3	0	2	2	2	2	1	0
5	E	3	3	2	2	2	0	2	2	2	2	1	0
6	F	3	3	2	2	2	0	2	2	2	2	1	0
7	G	3	3	3	2	2		2	2	2	2	1	
8	H	3	3	3	2	2		2	3	2	2	1	
		←—— 1 : 1,000 ——→						←—— 1 : 10,000 ——→					

<u>ภาพที่ 12</u> แสดงบันทึกผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพืช โดยวิธี Indirect ELISA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2

จากการทดสอบ ELISA เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทอง โดยดูปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหลังจากหยอด Phosphate substrate buffer พบว่า น้ำคั้นที่ความเจือจางต่างๆ มีค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ ในการทดลองที่ 2 ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 30 นาที

ตัวอย่างพืช	ค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาที่ความเจือจางต่างๆ [1]	
	1 : 10,000	1 : 100,000
ใบอ่อน	1.786	1.357
ใบแก่	1.714	1.357
ก้านใบ	1.714	1.286
ลำต้น	1.714	1.286

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 14 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบ ELISA เพื่อเปรียบเทียบผลของการเติมและไม่เติมสาร Additive ใน Coating buffer โดยดูปฏิกิริยาหลังจากหยอด Phosphate substrate buffer พบว่าน้ำคั้นที่ความเจือจางต่างๆ มีค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละ Additive ในการทดลองที่ 2 ที่ความเจือจางต่างๆ ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 60 นาที

ตัวอย่างพืช [2]	ค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาที่ความเจือจางต่างๆ [1]	
	1 : 10,000	1 : 100,000
I	3.000	2.000
II	1.000	1.000
III	1.125	1.000
IV	1.000	1.000
V	2.000	1.625
VI	2.000	1.375
VII	2.000	1.250

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 8 ซ้ำ

2/ ตัวอย่างพืช

I = ไม่เติมสาร Additive

II = เติมสาร Additive 2% PVP และ 2.5% Nicotinic acid

III = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol

IV = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid

V = เติมสาร Additive 1% PVP และ 2.5% Nicotinic acid

VI = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol

VII = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยารวมทั้ง 2 ความเจือจาง (ตารางที่ 5, 6) พบว่าใบอ่อน ใบแก่ ก้านใบ และลำต้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD และผลของการเติมและไม่เติมสาร Additive ใน Coating buffer มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD แสดงให้เห็นว่า ต้นพลูราชินีสีทองที่เป็นโรค Dasheen Mosaic Virus จะมีการกระจายตัวของเชื้อไวรัส DMV ในส่วนต่างๆ คือ ใบอ่อน ใบแก่ ก้านใบ และลำต้นใกล้เคียงกัน และการเติม 1% PVP และ 2.5% nicotinic acid, 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol, 1% PVP และ 0.01% Thioglycolic acid, 2% PVP และ 2.5% nicotinic acid, 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol หรือ 2% PVP และ 0.01% Thioglycolic acid ใน Coating buffer ระหว่างการบดใบพืช ทำให้การเกิดสีของปฏิกิริยามีความชัดเจนลดลง

ตารางที่ 5 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละตัวอย่างในการทดลองที่ 2 รวมทั้ง 2 ความเจือจาง ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 30 นาที [1]

ตัวอย่างพืช	ค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยารวมทั้ง 2 ความเจือจาง [2]
ใบอ่อน	1.5714 A
ใบแก่	1.5357 A
ก้านใบ	1.5000 A
ลำต้น	1.5000 A
CV. %	41.72

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 28 ซ้ำ

2/ ตัวเลขค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาระหว่างแต่ละ Additive ในการทดลองที่ 2 รวมทั้ง 2 ความเจือจาง ภายหลังหยอด Phosphate substrate buffer 30 นาที [1]

ตัวอย่างพืช [3]	ค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยารวมทั้ง 2 ความเจือจาง [2]
I	2.5000 A
II	1.0000 C
III	1.0625 C
IV	1.0000 C
V	1.8125 B
VI	1.6875 B
VII	1.6250 B
CV. %	24.39

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 16 ซ้ำ

2/ ตัวเลขค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD

3/ ตัวอย่างพืช

I = ไม่เติมสาร Additive

II = เติมสาร Additive 2% PVP และ 2.5% Nicotinic acid

III = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol

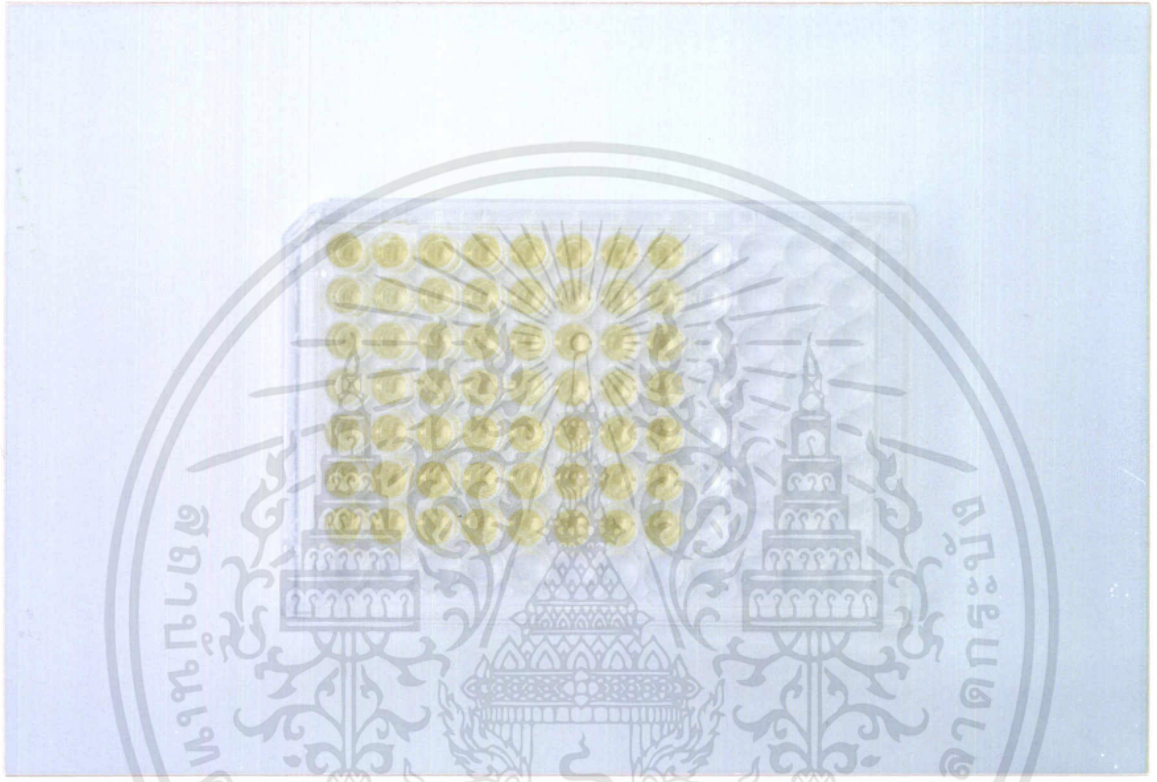
IV = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid

V = เติมสาร Additive 1% PVP และ 2.5% Nicotinic acid

VI = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol

VII = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 13 แสดงผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Rep.		ใบอ่อน 1	ใบอ่อน 2	ใบแก่ 1	ใบแก่ 2	ใบอ่อน 1	ใบอ่อน 2	ใบแก่ 1	ใบแก่ 2				
Additive		**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
I	**A**	3	3	3	3	3	3	3	3	@			
II	**B**	1	1	1	1	1	1	1	1	@			
III	**C**	2	1	1	1	1	1	1	1	@			
IV	**D**	1	1	1	1	1	1	1	1	@			
V	**E**	2	2	2	2	2	2	2	2	@			
VI	**F**	2	2	2	2	2	2	2	2	@			
VII	**G**	2	2	2	2	2	2	2	2	@			
	H												

1 : 10,000

<u>ภาพที่ 14</u> แสดงบันทึกผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 1 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช

- Additive I = ไม่เติมสาร Additive
- Additive II = เติมสาร Additive 2% PVP และ 2.5% Nicotinic acid
- Additive III = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
- Additive IV = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid
- Additive V = เติมสาร Additive 1% PVP และ 2.5% Nicotinic acid
- Additive VI = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
- Additive VII = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 15 แสดงผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	Rep.	ใบอ่อน		ใบแก่		ใบอ่อน		ใบแก่					
		1	2	1	2	1	2	1	2				
Additive		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	A	2	2	2	2	2	2	2	2	@			
II	B	1	1	1	1	1	1	1	1	@			
III	C	1	1	1	1	1	1	1	1	@			
IV	D	1	1	1	1	1	1	1	1	@			
V	E	1	1	1	2	2	2	2	2	@			
VI	F	2	2	2	1	1	1	1	1	@			
VII	G	2	1	2	1	1	1	1	1	@			
	H												

1 : 100,000

<u>ภาพที่ 16</u> แสดงบันทึกผลการตรวจสอบ ELISA plateที่ 2 ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช

- Additive I = ไม่เติมสาร Additive
- Additive II = เติมสาร Additive 2% PVP และ 2.5% Nicotinic acid
- Additive III = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
- Additive IV = เติมสาร Additive 2% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid
- Additive V = เติมสาร Additive 1% PVP และ 2.5% Nicotinic acid
- Additive VI = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol
- Additive VII = เติมสาร Additive 1% PVP และ 0.05% Thioglycolic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA ที่ความเจือจางน้ำคั้น 1 : 1,000 จะเห็นได้ว่าพืชทดสอบซ้ำที่ 4 มีระดับสีของปฏิกิริยาใกล้เคียงกันทั้ง 5 ส่วน ในขณะที่พืชทดสอบซ้ำอื่น จะมีระดับสีของปฏิกิริยาในส่วนรากจะน้อยกว่าส่วนอื่นๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกิดความผิดพลาดขึ้นในการทดลอง เช่น อาจมีการปนเปื้อนของเชื้อไวรัสจากหลุมอื่น ในระหว่างการหยอดน้ำคั้นหรือระหว่างการล้างเชื้อไวรัสส่วนเกินด้วย PBS - Tween นอกจากนี้การหยอดหลุมผิดก็อาจเป็นเหตุผลหนึ่งให้เกิดความผิดพลาดขึ้น

จากการเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช จะเห็นได้ว่าการไม่เติมสาร Additive จะให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าการเติม Additive ทั้ง 6 แบบ และจะสังเกตได้ว่าการเติม 2% PVP และ 2.5% Nicotinic acid, 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol หรือ 2% PVP และ 0.01% Thioglycolic acid ให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกัน ขณะที่การเติม 1% PVP และ 2.5% Nicotinic acid, 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol, 1% PVP และ 0.01% Thioglycolic acid ให้ผลการทดสอบที่ไม่แตกต่างกันเช่นกัน อาจเป็นเพราะมีตัวแปรสำคัญอยู่ที่เปอร์เซ็นต์ของ PVP โดยที่เปอร์เซ็นต์ของ PVP ยิ่งมากจะยิ่งทำให้ระดับสีของปฏิกิริยาจางลง ซึ่งตรงกันข้ามกับการทดสอบของ Rankovic and Vaksanovic (1983) ที่รายงานว่าการเติม 2% และ 1% Polyvinylpyrrolidone ร่วมกับ 0.1% 2-Mercaptoehtanol ในขั้นตอนการบดน้ำคั้นจากตัวอย่างพืช จะให้ผลที่ดีในการตรวจสอบเชื้อ Apple Stem Grooving Virus (AGSV) จากเปลือก, ตา, ใบ, กลีบดอก, และผลแอปเปิล ; และ Takahashi *et. al.* (1996) รายงานว่าการตรวจสอบเชื้อ Apple Chlorotic Leaf Spot Virus (ACLSV) ในใบแอปเปิลด้วยวิธี Standard ELISA การใช้สารละลาย 2.5% Nicotinic acid และ 2% Polyvinylpyrrolidone เหมาะสมที่สุดในการบดตัวอย่างใบพืช และวิธี Modified ELISA การใช้ phosphate buffered saline ที่มี 0.05% Tween-20, 2% Polyvinylpyrrolidone และ 0.05% Thioglycolic acid เหมาะสมที่สุดในการบดตัวอย่างใบพืช นอกจากนี้การเติม 2.5% Nicotinic acid, 0.1% 2-Mercaptoethanol และ 0.05% Thioglycolic acid ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างในด้านผลกระทบต่อระดับสีของปฏิกิริยา

ในการทดลองนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากความเจือจางน้ำคั้น 1 : 10,000 ในการทดลองตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA และหลุมที่ไม่เติมสาร Additive ในการทดลองเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช มีค่าระดับสีของปฏิกิริยาต่างกัน โดยหลุมที่ไม่เติมสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Additive ในการทดลองเปรียบเทียบการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยการเติมสาร Additive ในบัฟเฟอร์ที่ใช้บดตัวอย่างพืช มีแนวโน้มให้ระดับสีเข้มกว่าการทดลองตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆ ของพลูราชินีสีทองโดยวิธี Indirect ELISA คาดว่าอาจจะเกิดขึ้นจากการใช้ Anti - Goat IgG ที่ต่างกัน โดย Anti - Goat IgG ที่ผ่านการใช้มาแล้ว 1 ครั้งจะให้ระดับสีของปฏิกิริยาจางกว่า Anti - Goat IgG ที่ยังไม่ผ่านการใช้ ดังนั้นจึงควรมีการทดสอบความแตกต่างของการใช้ Anti - Goat IgG ที่ต่างกัน นอกจากนี้ยังควรมีการทดสอบเปรียบเทียบปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนต่างๆที่ความเจือจางน้ำคั้นสูงกว่า 1 : 100,000 เพื่อหาส่วนที่มีปริมาณเชื้อไวรัสสูงที่สุด นอกจากนี้ในการทดลองนี้ไม่มีหลุมเปรียบเทียบ Disease control และ Healthy control เนื่องจากใช้พืชที่วินิจฉัยแล้วว่าเป็นโรคจึงไม่ได้ทำหลุมเปรียบเทียบทั้งสอง สำหรับผู้ต้องการทำการทดลองต่อจากการทดลองนี้อาจจะมีการวางแผนทำหลุมเปรียบเทียบทั้งสองด้วยเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่มีความแน่นอนมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

การทดลองหาปริมาณเชื้อไวรัส DMV ที่กระจายอยู่ตามส่วนต่างๆของต้นพลูราชินีสีทองที่เป็นโรค ได้แก่ ใบอ่อน ใบแก่ ก้านใบ ลำต้น และราก โดยใช้วิธี Indirect ELISA เริ่มจากการตัดแบ่งต้นพลูราชินีสีทองที่เป็นโรคออกเป็น 5 ส่วน คือ ใบอ่อน ใบแก่ ก้านใบ ลำต้น และราก แล้วทำการบดใน Coating buffer แล้วเจือจางให้ได้น้ำคั้นความเจือจางต่างๆ นำไปหยอดหลุมในจานทดสอบ แล้วหยอดตามด้วย buffer ต่างๆ จะเกิดปฏิกิริยาสีเหลืองขึ้น โดยที่ความเข้มของสีขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อไวรัสที่มีอยู่ในหลุม ทำให้ทราบว่า ต้นพลูราชินีสีทองที่เป็นโรค Dasheen Mosaic Virus จะมีการกระจายตัวของเชื้อไวรัส DMV ในส่วนต่างๆใกล้เคียงกัน ยกเว้นในส่วนของรากจะมีปริมาณเชื้อ DMV น้อยกว่าส่วนอื่นๆของต้นพลูราชินีสีทอง เนื่องจากค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาของส่วนราก น้อยกว่าส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD ในขณะที่ส่วนอื่นๆมีค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD

การทดสอบสาร Additive บางชนิดโดยการเติมลงใน Coating buffer ระหว่างการบดใบพืช ได้แก่ 1% PVP และ 2.5% nicotinic acid, 1% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol, 1% PVP และ 0.01% Thioglycolic acid, 2% PVP และ 2.5% nicotinic acid, 2% PVP และ 0.1% 2-Mercaptoethanol, และ 2% PVP และ 0.01% Thioglycolic acid โดยใช้วิธี Indirect ELISA เริ่มด้วยการนำส่วนของต้นพลูราชินีสีทองที่เป็นโรคส่วนใดส่วนหนึ่งมาบดใน Coating buffer แล้วเจือจางให้ได้น้ำคั้นความเจือจางต่างๆ นำไปหยอดหลุมในจานทดสอบ เปรียบเทียบกับน้ำคั้นที่ได้จากการบดส่วนของพืชที่มีการเติม Additive ต่างๆ แล้วหยอดตามด้วยบัฟเฟอร์ต่างๆ จะเกิดปฏิกิริยาสีเหลืองขึ้น โดยที่ความเข้มของสีขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อไวรัสที่มีอยู่ในหลุม ทำให้ทราบว่า การเติม Additive ต่างๆในการทดลองนี้ทำให้การเกิดสีของปฏิกิริยามีความชัดเจนลดลง เนื่องจากค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาของการเติมสาร Additive ต่างๆน้อยกว่าการไม่เติมสาร Additive อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเป็นไปได้ 0.05 โดยวิธี CRD

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ. 2536 คู่มือไม้ประดับภายในอาคาร. สำนักพิมพ์ยูไนเต็ดบุ๊คส์. กรุงเทพมหานคร. 168 หน้า.

ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ. 2539. ไม้ประดับมงคล. บริษัทเจเนอร์รัลบุ๊คส์ จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 230 หน้า.

ปราณี ยัมเมอร์ลิ่งค์. 2530. เอกสารประกอบการอบรมซีรัมวิทยา ด้าน ELISA, ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

พานิชย์ ยศปัญญา. 2539. ไม้ประดับเศรษฐกิจ. สำนักพิมพ์มติชน. กรุงเทพมหานคร. 164 หน้า.

ศิริพร เบญจศรีอักษร. 2536. ไม้ประดับในอาคาร. โรงพิมพ์มิตรสยาม. กรุงเทพมหานคร. 141 หน้า.

Alconero, R. 1972. Hot water treatments of corms of *Xanthosoma* spp. Infected with dasheen mosaic virus. Plant Disease Reporter. 56 : 320-321.

Abo El-Nil, M. M., F. W. Zettler, and E. Hiebert. 1977. Purification, serology, and some physical properties of dasheen mosaic virus. Phytopathology. 67(12) : 1445-1450.

Bellardi, M. G. and V. Vicchi. 1995. Applicability of the ELISA technique for identifying bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) in gladiolus corms. Sementi Elette. 41(1) : 19-21.

Bos, L. 1978. Symptoms of Virus Disease in Plants. Centre for Agricultural Publishing and Documentation. Netherlands. 225 pp.

Brunt, A. A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, A.J. Gibbs and L. Watson (eds.) 1995. Viruses of Plants. University Press. UK. 1484 pp.

Chen, C. C., F. L. Chiang and C. A. Chang. 1998. Distribution of tuberose mold mosaic potyvirus in tuberose (*Polianthes tuberose* L.). Plant Protection Bulletin Taipei. 40(3) : 199-207.

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

Fillhart, R. C. and J. D. Castello. 1996. Detection of tomato mosaic tobamovirus in soil from whiteface mountain, New York. Phytopathology(supplement). 86(11) : S88.

Hampton, R., E. Ball and S. De Boer. (eds.) 1990. Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. APS Press. USA. 389 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hessayon, D.G. 1996. The House Plant Expert. Expert Books, a division of Transworld Pubilshers Ltd. 256 pp.

Hewings, A. D. and C. J. D' Arcy. 1984. Maximizing the detection capability of a beet western yellow virus ELISA system. Journal of Virological Method. 9(2) : 131-142.

Hu, J. S., S. Meleisea, M. Wang, M.A. Shaarawy and F.W. Zettler. 1995. Dasheen mosaic potyvirus in Hawaiian taro. Australasian Plant Pathology 24(2) : 112-117.

James, D. and S. Mukerji. 1996. Comparison of ELISA and immunoblotting for the detection of cherry mottle leaf virus. Annals of Applied Biology. 129(1) : 13-23.

Li, R. H., G.C. Wisler, H.Y. Liu and J.E. Duffus. 1996. Comparison of diagnostic techniques for detecting tomato infectious chlorosis virus. Phytopathology(supplement). 86(11) : S12.

Loebenstein, G., R. H. Lawson and A. A. Brunt. 1995. Virus and Virus-Like Diseases of Bulb and Flower Crops. John Wiley & Sons. UK. 543 pp.

Pfeilstetter, E., L. Kunze and V. Zinkernagel. 1997. Detection and distribution of petunia asteroid mosaic virus (PeAMV) in sweet cherry trees affected by viral twig necrosis. Gartenbauwissenschaft. 62(3) : 106-112.

Rankovic, M., S. Vuksanovic. 1983. The use of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the diagnosis of viruses of apple. Zastita Bilja. 34(2) : 257-264.

Takahashi, T., T. Ohara, H. Tanaka, K. Kurihara and K. Shimizu. 1996. Detection of apple chlorotic leafspot virus in apple leaves by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Research Bulletin of the Plant Protection Service, Japan. 32 : 103-109.

Ward, F. and P. Peskett. 1973. Indoor Plants. Trewin copplestone publishing Ltd. UK. 144 pp.

Wu, Z. and M. A. C. Langham. 1996. Distribution of wheat streak mosaic virus in winter wheat plants. Phytopathology(supplement). 86(11) : S73.

Zettler, F.W. and R. D. Hartman. 1985. Dasheen mosaic virus and its control in cultivated aroids. Virus Diseases of Horticultural Crops in the Tropics and Subtropics, FFTC Book Series No. 33. Food and Fertilize Technology Centre for the Asian and Pacific Region. Republic of China. 193 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมบัฟเฟอร์

1. **PBS (pH 7.4) ประกอบด้วย**

   0.8 กรัม NaCl

   0.2 กรัม KH_2PO_4

   2.9 กรัม Na_2HPO_4 . 12 H2O

   0.2 กรัม KCL

   0.2 กรัม NaN_3

   ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

2. **PBS - Tween ประกอบด้วย**

   0.5 มล. Tween 20 ใน PBS 1 ลิตร

3. **Coating buffer ประกอบด้วย**

   1.59 กรัม Na_2CO_3

   2.93 กรัม $NaHCO_3$

   0.2 กรัม NaN_3

   ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. **Conjugate buffer ประกอบด้วย**

   2 เปอร์เซ็นต์ PVP และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ อัลบูมิน ใน PBS - Tween

5. **Substrate buffer**

   97 มล. Diethanolamine

   0.2 กรัม NaN_3

   ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

   ปรับ pH ให้ได้ 9.8 โดยใช้ HCL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้