# การศึกษาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายและการผลิตพืชปลอดเชื้อในไม้ประดับบางชนิดในวงศ์ ARACEAE

# A STUDY OF VIRUS INFECTION AND PRODUCTION OF VIRUS FREE PLANTS IN SOME ARACEAE PLANTS

วราภรณ์ ทัดพงษ์ศรีธร
VARAPRON TATPONGSRITHON

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2546

ISBN 974-324-401-8

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

# การศึกษาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายและการผลิตพืชปลอดเชื้อในไม้ประดับบางชนิดในวงศ์ ARACEAE

# A STUDY OF VIRUS INFECTION AND PRODUCTION OF VIRUS FREE PLANTS IN SOME ARACEAE PLANTS

วราภรณ์ ทัตพงษ์ศรีธร
VARAPRON TATPONGSRITHON

เลข... 47701
เลข... หมู่...
วัน, เดือน, ปี 22 ส.ค. 2546

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2546

ISBN 974-324-401-8

# A STUDY OF VIRUS INFECTION AND PRODUCTION OF VIRUS FREE PLANTS IN SOME ARACEAE PLANTS

VARAPRON TATPONGSRITHON

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

2003

ISBN 974-324-401-8

COPYRIGHT 2003
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

**บัณฑิตวิทยาลัย**

**สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง**

**ใบรับรองวิทยานิพนธ์**

---

**หัวข้อวิทยานิพนธ์** การศึกษาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายและการผลิตพืชปลอดเชื้อในไม้ประดับบางชนิดในวงศ์ Araceae

A STUDY OF VIRUS INFECTION AND PRODUCTION OF VIRUS INFECTION AND PRODUCTION OF VIRUS FREE PLANTS IN SOME ARACEAE PLANTS

**ชื่อนักศึกษา** นางสาววราภรณ์ ทัตพงษ์ศรีธร

**รหัสประจำตัว** 42066301

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

**สาขาวิชา** เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

**อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์** ผศ.ดร.นวลพรรณ งามยี่สุ่น

| คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ | | ลายมือชื่อ |
|---|---|---|
| ผศ.ดร.นวลพรรณ | งามยี่สุ่น | |
| รศ.ชวาลา | บุรณศิริ | |
| ดร.อำมร | อินทร์สังข์ | |

**วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ** 25 มีนาคม 2546 เวลา 13.00-16.00 น.

**สถานที่สอบ** ณ ห้อง A 209 อาคารเจ้าคุณทหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

**บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว**

**(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อุตชู)**

**คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย**

**วันที่** 26 **เดือน** มีนาคม **พ.ศ.** 2546

**หัวข้อวิทยานิพนธ์** การศึกษาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายและการผลิตพืชปลอดเชื้อในไม้ประดับบางชนิดในวงศ์ Araceae

**ชื่อนักศึกษา** นางสาววราภรณ์ ทัตพงษ์ศรีธร

**รหัสประจำตัว** 42066301

**ปริญญา** วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

**สาขาวิชา** เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

**พ.ศ.** 2546

**อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์** ผศ.ดร.นวลพรรณ งามยี่สุ่น

## บทคัดย่อ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างที่มีอาการ ของโรคไวรัสในไม้ประดับใบในวงศ์ Araceae บางชนิดของพืชในกลุ่มพลู ได้แก่ พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง จากตลาดต้นไม้สวนจตุจักรของปี พ.ศ. 2543 – 2544 ในช่วงการสำรวจพบว่า ใบพลูฉลุจะมีอาการม้วนงอคล้ายเชือกและมีอาการด่างร่วมด้วยเล็กน้อย ส่วนในพลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง พบเพียงลักษณะของต้นแคระแกรนและใบมีขนาดเล็กลง แต่เมื่อนำพืชเหล่านั้นมาเลี้ยงในโรงเรือนเพื่อศึกษาอาการของโรค พบพลูฉลุมีลักษณะอาการด่างที่กระจายอยู่ตามใบทั้งในใบอ่อนและใบแก่ ใบหยิกงอ ต้นแคระแกรนและใบมีขนาดเล็กลง ใบมีรูปร่างเรียวยาวผิดปกติ ส่วนในพลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง พบลักษณะอาการด่างที่กระจายอยู่ตามใบอ่อน ใบเปลี่ยนรูปไปจากเดิม ใบมีลักษณะเรียวยาวและเป็นคลื่น อาการของโรคในพืชทั้ง 4 ชนิดจะแสดงให้เห็นชัดเจนในใบอ่อนมากกว่าในใบแก่ การตรวจสอบหาอนุภาค ของเชื้อที่เข้าทำลายพืชโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ใช้วิธีการตรวจสอบด้วยวิธี Leaf-Dip สามารถมองเห็นอนุภาคของเชื้อ พบว่าเชื้อที่เข้าทำลายพืชมี 2 ชนิดคือเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) มีอนุภาคเป็นเส้นยาวคล้ายเส้นด้าย (flexuous rod) ยาวประมาณ 750 นาโนเมตร และเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) มีอนุภาคกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 นาโนเมตร การศึกษาถึงเชื้อสาเหตุของโรคด้วยวิธี indirect ELISA ในการตรวจสอบด้วยวิธีทำการสุ่มต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่แสดงอาการของโรคที่ชัดเจนโดยการตรวจสอบแบ่งเป็น 3 ระยะ ในการตรวจสอบพบเชื้อ DMV และ เชื้อ CMV เชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณเชื้อที่สูงและสูงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ส่วนเชื้อ CMV ในการตรวจสอบเดือนมิถุนายนพบเชื้อมีปริมาณที่น้อย และเพิ่มขึ้นในการตรวจสอบช่วงเดือนกันยายนและเพิ่มสูงมากที่สุดในการตรวจสอบเดือนธันวาคม จึงสรุปได้ว่าเชื้อ DMV เป็นเชื้อที่มีปริมาณสูงและปริมาณของเชื้อค่อนข้างคงที่เมื่ออยู่ในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ส่วนเชื้อ CMV เป็นเชื้อที่มีความผันแปรค่อนข้างสูงขึ้นอยู่กับสภาพอากาศ ปริมาณของเชื้อทั้ง 2 ชนิด

จะเพิ่มสูงมากในการตรวจสอบระยะที่ 3 เนื่องจากเป็นการตรวจสอบในช่วงที่มีอากาศหนาวเย็น ซึ่งเหมาะกับการเพิ่มปริมาณของเชื้อ การตรวจสอบพืชอาศัยของเชื้อโดยวิธีการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ลงในพืชอาศัยวงศ์ Leguminosae, Cucurbitaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae และ Solanaceae ผลปรากฏว่าไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ ในการผลิตพืชปลอดเชื้อโดยการใช้ความร้อนพบว่าการแช่ท่อนพันธุ์ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C และ 50 ° C เป็นเวลา 5 และ 10 นาที มีผลต่อการลดปริมาณของเชื้อไวรัสลงได้ และการแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำร้อนเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 45 °C สามารถทำให้ต้นพลูด่าง 1 ต้น และราชินีสีทอง 1 ต้นปลอดจากเชื้อ DMV ได้ ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 10 นาที สามารถทำให้ต้นราชินีสีทองปลอดเชื้อ DMV แต่เชื้อสามารถกลับเข้ามาทำลายพืชได้อีกครั้งเมื่อทำการตรวจสอบหลังจากนั้นอีก 3 เดือน แต่พบว่าเชื้อมีปริมาณที่ต่ำมาก

| | |
|---|---|
| Thesis Title | A Study of Virus Infection and Production of Virus Free Plants in Some Araceae Plants |
| Studen | Miss Varapron Tatpongsrithon |
| Studen ID. | 42066301 |
| Degree | Master of Science |
| Programme | Plant Pest Management Technology |
| Year | 2003 |
| Thesis Advisor | Asst.Prof.Dr. Nualphan Ngamyeesoon |

## ABSTRACT

Virus symptom on some ornamental pot - plants in family Araceae, namely *Monstera obliqua expilata* (Window leaf) ,*Scindapsas aureus* cultivar Silver Moon , Marble Queen and Gloden Queen from Jatujuk market was observed during 2000-2001. Light mosaic and leaf roll were found on *M. obliqua expilata.* Whereas, *S. aureus* showed stunting symptom with small leaves. All infected plants were brought to nursery in order to study on symptom development. *M. obliqua expilata* showed severe mosaic and blister on leaves , leaf curl, shoe-string like symptom and decreased in leaf size. The infected plants were very stunted in growth. On *S. aureus* cutivar Silver Moon, Marble Queen and Gloden Queen, these plants developed mosaic symptom which were easily noticed on young leaves, leaf deformation and slightly leaf curl. Severe infected plants showed very stunted symptom. Young leaves of all studied plants produced very clear symptom. Study of virus particles was done by Leaf-Dip techniques using infected plant sap. Two types of particles were found by Leaf-Dip Method, one was flexuous rod with 750 nm in length and another was isometric particle with 30 nm in diameter. The variation of DMV and CMV concentration was checked during 3 periods in June, September and December on *M. obliqua expilata* and *S. aureus* ( Silver Moon, Marble Queen and Gloden Queen) by indirect ELISA. For DMV, high virus concentration gradually increased from June to December. While, CMV was detected of low level in June but dramatically increased from September to December. Five family plants, Leguminosae, Cucurbitaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae and Solanaceae were tested for host range by mechanical sap transmission. None of the tested plants

developed virus infected symptom. Study on the production of DMV free in *M. obliqua expilata* and *S. aureus* ( Silver Moon, Marble Queen and Gloden Queen) by dipping infected bud-sticks in hot water at 45 °C and 50 °C for 5 and 10 min, revealed the decrease of virus level. Moreover, plants treated at 45 °C for 10 min got DMV free plants one of *S. aureus* ( Silver Moon ) and one of *S. aureus* (Gloden Queen). In addition, two of *S. aureus* (Gloden Queen) were virus free after being treated at 50 °C for 10 min. However after 3 months, those plants were DMV reinfected but with low concentration .

# กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นวลพรรณ งามยี่สุน ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำ ปรึกษา แนะนำ ช่วยตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้และชี้แนะในสิ่งต่างๆที่เป็นประโยชน์ ผู้วิจัยรู้สึกทราบซึ้งในความอนุเคราะห์เป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือชนิดต่างๆ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำ ในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์อย่างดียิ่ง

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ที่ช่วยให้ความรู้ และอนุเคราะห์ข้อมูลต่างๆที่เป็นประโยชน์แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืชทุกคน ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่และน้อง ที่คอยไถ่ถาม ให้กำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

คุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ทำการวิจัยขอมอบแด่ผู้ที่มีพระคุณทุกท่าน

วราภรณ์ ทัตพงษ์ศรีธร

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญภาพ.....XI

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความสำคัญและที่มา.....2

1.2 วัตถุประสงค์.....3

1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....3

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร.....4

2.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....15

3.1 อุปกรณ์.....15

3.2 วิธีการทดลอง.....17

3.3 สถานที่ทำการทดลอง.....23

3.4 ระยะเวลาในการทดลอง.....23

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....24

4.1 การสำรวจลักษณะอาการของโรค.....24

4.2 การตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืช.....30

4.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี indirect ELISA.....31

4.4 การตรวจสอบพืชอาศัยของเชื้อ.....38

4.5 การผลิตพืชปลอดเชื้อโดยการใช้ความร้อน.....41

# สารบัญ(ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....66
5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....66
5.2 ข้อเสนอแนะ.....69

บรรณานุกรม.....71

ภาคผนวก.....77
ภาคผนวก ก สารเคมี.....78
ภาคผนวก ข ตาราง.....82

ประวัติผู้เขียน.....95

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

3.1 แสดงพืชอาศัยที่ใช้ในการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง.....20

4.1 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับสีของปฏิกิริยาที่อ่านได้ในพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำคั้นพืชที่ 1:10,1:100 และ 1:1,00 ของเชื้อ DMV และ CMV ใน 3 ระยะ ที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA.....32

4.2 แสดงผลของค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาที่อ่านได้ ของพืชทั้ง4ชนิด (พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง) ใน 3 ระยะเวลาที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA.....33

4.3 แสดงผลการถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่อยู่ในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง โดยใช้พืชอาศัยและbuffer ที่แตกต่างกัน.....39

4.4 แสดงอัตราการรอดชีวิตของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 42.5 องศาเซลเซียส..... 43

4.5 แสดงอัตราการรอดชีวิตของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....44

4.6 แสดงอัตราการรอดชีวิตของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส.....45

4.7 แสดงจำนวนของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังจากนำออกจากตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37.5 และ 40 องศาเซลเซียส และแสดงจำนวนต้นและอัตราการรอดชีวิต หลังจากปลูกในสภาพปกติ เป็นเวลา 3 เดือน.....46

4.8 แสดงอัตราการรอดชีวิตของ พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ผ่านการแช่ในน้ำอุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติ เป็นเวลา 2 เดือน.....50

4.9 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ DMV ด้วยวิธีDirect ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังจากการผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน.....53

# สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.10 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ DMV ด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชินีสีทอง หลังจากการผ่านความร้อนแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือนแล้วนำไปปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน.....55

4.11 แสดงอัตราการรอดชีวิตของ พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ผ่านการแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10นาทีแล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติ เป็นเวลา 3 เดือน.....61

4.12 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ DMV ด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังที่ผ่านความร้อน 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน.....64

4.13 แสดงจำนวนต้นและเปอร์เซ็นต์ การปลอดเชื้อของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง.....64

4.14 แสดงผลการตรวจสอบหาเชื้อ DMV ด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูด่าง และ ราชินีสีทอง หลังจากที่ปลอดเชื้อแล้ว และนำเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 เดือน.....65

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ข1 แสดงผลการตรวจสอบเพื่อหาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายด้วยวิธี Indirect enzyme-linked immunorsorbent assay ( Indirect ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน.....82

ข2 แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี Direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน.....84

# สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ข3 แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี Direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน.....85

ข4 แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี Direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน.....91

# สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

4.1 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะอาการ ของต้นพลูฉลุปกติกับต้นพลูฉลุที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย.....25

4.2 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะอาการของ ต้นพลูด่างปกติกับต้นพลูด่างที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย.....26

4.3 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะอาการของต้นราชินีหินอ่อนปกติกับต้นราชินีหินอ่อนที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย.....27

4.4 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะอาการของต้นราชินีสีทองปกติกับต้นราชินีสีทองที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย.....28

4.5 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะอาการของต้นพลูฉลุในฤดูกาลต่างๆ.....29

4.6 แสดงรูปร่างลักษณะของอนุภาคเชื้อ Dasheen mosaic virus (DMV) และ Cucumber mosaic virus (CMV) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 40 เท่า โดยใช้วิธี Leaf-Dipในการตรวจสอบ..... 30

4.7 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อ DMV และ CMVในต้นพลูฉลุ และต้นพลูด่าง โดยใช้ความเข้มข้น 1:10,1:100, และ 1:1,000 ที่เจือจางกับ coating buffer ในระยะการตรวจสอบที่ 3 เดือนธันวาคม.....34

4.8 แสดงผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี Indirect ELISA ในระยะที่ 3 เดือนธันวาคมของต้นพลูฉลุและพลูด่าง.....35

4.9 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อ DMV และCMV ในต้นราชินีหินอ่อน และต้นราชินีสีทอง โดยใช้ความเข้มข้น 1:10,1:100 และ 1:1,000 ที่เจือจางกับ coating buffer ในระยะการตรวจสอบที่ 3 เดือนธันวาคม.....36

4.10 แสดงผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี Indirect ELISA ในระยะที่ 3 เดือนธันวาคมของต้นราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง.....37

4.11 แสดงลักษณะของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ปักชำในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 3 เดือน ก่อนที่จะนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ.....47

4.12 แสดงลักษณะของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองเมื่อนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ลักษณะของต้นพืชทั้ง 4 ชนิดใบและลำต้นเหี่ยวเฉา.....48

# สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.13 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่เจือจาง 1 :10 กับ extraction buffer ในต้นพืชผ่านความร้อน แบบแห้งที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส และผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที..... .....51

4.14 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณ ของเชื้อไวรัสด้วยวิธี Direct ELISAของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังผ่านความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน และปลูกไว้ในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน และต้น พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองหลังจากที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็น เวลา 2 เดือน.....52

4.15 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะท่อนพันธุ์ของพลูฉลุ .....56

4.16 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะท่อนพันธุ์ของพลูด่าง.....57

4.17 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะท่อนพันธุ์ของราชินีหินอ่อน.....58

4.18 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะท่อนพันธุ์ของราชินีสีทอง.....59

4.19 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อ DMVในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และต้นราชินีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือนก่อนที่จะนำมาตรวจสอบ.....62

4.20 แสดงผลของปฏิกิริยาที่เกิดจากการตรวจสอบ ปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน ราชินีสีทอง ที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน ก่อนที่จะนำมาตรวจสอบ.....63

4. 21 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อ DMV ในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชินีสีทอง ที่ปลอดเชื้อแล้วด้วยเทคนิค Direct ELISA (ก) แสดงผลการตรวจสอบปริมาณของ เชื้อไวรัสจากต้นพลูด่าง และราชินีสีทอง ที่ปลอดเชื้อด้วยเทคนิค Direct ELISA 3 เดือนหลังจากการตรวจสอบครั้งแรกพบเชื้อไวรัสกลับเข้ามาทำลายในปริมาณที่ต่ำ(ข).....65

# บทที่ 1
# บทนำ

## 1.1 ความสำคัญและที่มา

มนุษย์เริ่มให้ความสนใจกับพืชที่มีลักษณะผิดปกติ เนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส ประมาณ 300 ปีมาแล้ว ทิวลิปเป็นพืชชนิดแรกที่เป็นจุดเริ่มต้นของความสนใจ ต้นทิวลิปที่เป็นโรคไวรัสจะให้ดอกที่มีลักษณะด่าง ทำให้เกิดลวดลายสวยงาม ในสมัยนั้นเชื้อไวรัสยังไม่เป็นที่รู้จักและไม่มีผู้ใดศึกษา จนกระทั่งเมื่อประมาณ 100 ที่ผ่านมานี้ ได้เริ่มมีการศึกษาอย่างจริงจังถึงเชื้อสาเหตุของโรค ในปัจจุบันพบโรคพืชที่เกิดจากไวรัสกว่า 600 ชนิด โดยพบว่าเชื้อไวรัสสามารถทำให้เกิดโรคกับพืชได้ทุกกลุ่ม (ธีระ สูตะบุตร. 2535)

ในปัจจุบันการใช้ไม้ประดับภายนอกและภายในอาคาร นั้นมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในเมืองใหญ่ๆ ที่มีประชากรมากอยู่กันอย่างหนาแน่น และมีพื้นที่อยู่กันอย่างจำกัด จำเป็นที่ต้องใช้พื้นที่ที่มีอยู่อย่างคุ้มค่าและให้เกิดประโยชน์สูงสุด ทำให้พื้นที่การปลูกต้นไม้ลดลง ตามสภาพความเจริญของบ้านเมืองและสภาพเศรษฐกิจ ยังผลให้มนุษย์ห่างไกลจากธรรมชาติมากยิ่งขึ้น ดังนั้นจำเป็นต้องสร้างสภาพแวดล้อมให้ดีขึ้นด้วยการนำไม้ประดับเข้ามาประดับทดแทน เพื่อให้สภาพแวดล้อมสวยงามน่าอยู่มากยิ่งขึ้น การปรับสภาพอาคารบ้านเรือนที่อยู่อาศัยและสถานที่ทำงานให้ดูสดชื่นสดใสมากขึ้น โดยการใช้ไม้ประดับนั้นจึงมีความสำคัญมากขึ้น

พันธุ์ไม้ที่นิยมนำมาประดับส่วนมาก เป็นพวกไม้ประดับใบมากกว่าไม้ดอกและไม้ชนิดอื่นๆ เนื่องจากไม้ใบมีสีสันรูปร่างและลักษณะที่สวยงาม มีทรงต้นให้เลือกมากมายหลายชนิดหลายรูปแบบ การปลูกและดูแลรักษาง่ายเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี และที่สำคัญ คือมีความสวยงามคงทนทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายในการหาซื้อพันธุ์ไม้มาเปลี่ยน ทั้งยังประหยัดเวลาในการปลูกและการดูแลรักษาอีกด้วย ซึ่งเหมาะสมกับสภาพเศรษฐกิจ สังคม และสภาพแวดล้อมในปัจจุบันเป็นอย่างยิ่ง ไม้ในวงศ์ Araceae เป็นไม้ที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก เพราะมีคุณสมบัติครบถ้วนตามที่กล่าวมาแล้ว จึงเป็นไม้ประดับที่ถูกเลือกใช้ในการประดับตกแต่งตามอาคารสถานที่ต่างๆตัวอย่าง เช่น พลูฉลุ (*Monstera oblique expilata*) เป็นไม้ประดับใบอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยม ในการใช้ประดับตามอาคารสถานที่ต่างๆ เพื่อเพิ่มความสวยงามเนื่องจากพลูฉลุมีใบที่สวยงาม และรูปร่างแปลกแตกต่างจากใบพืชชนิดอื่นๆ ใบเป็นรูปใบพาย ปลายใบแหลม โคนใบมนและพื้นที่ใบเป็นสีเขียว และสิ่งที่แปลกมากก็คือ ใบจะมีรอยเป็นรูฉลุทั่วทั้งใบ และเรียงกันอย่างเป็นระเบียบด้วย (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2536) ซึ่งเป็นความแปลกที่สวยงามของพลูชนิดนี้ แต่ในปัจจุบันพบพลูฉลุมีรูปร่างลักษณะของ

ใบหยิกงอใบมีขนาดเล็กลง ใบมีรูปร่างเรียวยาวผิดปกติและพบอาการด่างที่ใบกระจายอยู่ทั่วไป ไม่มีขอบเขตที่แน่นอน ต้นมีขนาดเล็กและแคระแกรนมีการเจริญที่ช้า Hessayan (1996) รายงานว่าพืชจำพวก *Scindapsus (pothos)* เป็นที่นิยมใช้เป็นไม้ประดับใบตามอาคารบ้านเรือน เนื่องจากมีใบที่สวยงามมีให้เลือกหลายพันธุ์ แต่เป็นพืชที่ยังสับสนในการเรียกชื่อ พูลด่าง มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Scindapous aureus* ในประเทศอังกฤษจะเรียกชื่อสามัญว่า Devil 's Ivy ส่วนในประเทศสหรัฐอเมริกาจะเรียกว่า Golden Pothos พลูด่างจะมีหลากหลายชนิดโดยจะมีใบที่มีสีเหลือง หรือ ขาวปนในพื้นหลัง Beckett Kenneth (1995) กล่าวไว้ว่าพืชพวก *Scindapsus aureus* เป็นพืชที่มีชื่อเรียกหลากหลาย จนกระทั่งปี 1956 จึงสามารถสรุปได้ว่า พลูด่าง หรือ พลูฝรั่งมีอยู่ 3 พันธุ์ "Silvermoon" หรือเรียกว่า พลูด่างใบมีลักษณะเป็นรูปหัวใจสีเขียวสดสลับกับสีเหลืองนวล พันธุ์ "Marble Queen" หรือราชินีหินอ่อน ใบมีลักษณะเป็นรูปหัวใจ ปลายแหลมโคนใบมนเว้าเล็กน้อย พื้นที่ใบเป็นสีเขียวและจะมีลายสีขาวประไปทั่วใบ คล้ายกับลายหินอ่อน และพันธุ์ "Golden Queen" พลูราชินีสีทองใบมีลักษณะเหมือนใบของ 2 พันธุ์แรก แต่ใบจะมีสีเหลืองอ่อนออกทอง (พานิชย์ ยศปัญยา. 2539) พลูทั้ง 3 ชนิดนี้ในปัจจุบันพบว่ามีลักษณะ ของต้นแคระแกรนและใบมีขนาดเล็กลง ใบหยักเป็นคลื่นรูปร่างใบเรียวยาวผิดปกติ มีลักษณะอาการด่างร่วมด้วยแต่ไม่ชัดเจนมากนัก ซึ่งเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส

ลักษณะอาการของโรคดังกล่าว ที่พบในพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และ พลูราชินีสีทอง กำลังแพร่ระบาดอย่างรวดเร็วเนื่องจากการขยายพันธุ์ของไม้ประดับใบทั้ง 4 ชนิดนี้ใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยวิธีการปักชำท่อนพันธุ์เป็นหลักซึ่งเป็นสาเหตุ ทำให้เชื้อไวรัสกระจายได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อเชื้อเข้าทำลายในขั้นที่รุนแรงก็จะทำให้พืชเจริญเติบโตได้ช้าและตายไปในที่สุด ซึ่งในปัจจุบันนี้จะพบอาการเช่นนี้เป็นจำนวนมาก หรือแทบจะพบได้ทั้งหมดในท้องตลาดที่ได้ทำการสำรวจมา ซึ่งปัญหานี้เป็นปัญหาที่สำคัญ และยังไม่มีการศึกษาหาสาเหตุเพื่อแก้ปัญหาอย่างจริงจัง

ดังนั้นการศึกษาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายไม้ประดับใบในวงศ์ Araceae บางชนิดของพืชในกลุ่มพลู จึงต้องทำการตรวจสอบเชื้อสาเหตุของโรค ศึกษาถึงลักษณะอาการของโรคที่เกิดขึ้น และวิธีการหาแนวทางในการป้องกันและกำจัดเชื้อไวรัสสาเหตุของโรค ซึ่งมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการผลิตท่อนพันธุ์หรือแม่พันธุ์ที่ปลอดเชื้อ การรักษาโดยใช้ความร้อน (heat treatment) เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการผลิตท่อนพันธุ์ปลอดโรค เนื่องจากสามารถยับยั้งและทำลายเชื้อไวรัสลงได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อ รวมถึงการผลิตท่อนพันธุ์ที่ปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์เชิงการค้า สำหรับตลาดทั้งในและต่างประเทศ

## 1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อสำรวจและศึกษาอาการที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส ในไม้ประดับในวงศ์ Araceae บางชนิดของพืชในกลุ่มพลูในท้องตลาดปัจจุบัน

1.2.2 เพื่อศึกษาข้อมูลเบื้องต้น และพืชอาศัยของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลาย ไม้ประดับในวงศ์ Araceae ของพืชในกลุ่มพลู โดยการวินิจฉัยตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA

1.2.3 การตรวจสอบอนุภาคเชื้อไวรัสสาเหตุที่เข้าทำลายพืช โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

1.2.4 การผลิตพืชที่ปลอดจากเชื้อไวรัสโดยใช้ความร้อน

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

เชื้อไวรัสเป็นสาเหตุของโรคพืชที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นจำนวนมากให้กับพืช เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชมีหลายร้อยชนิด สามารถเข้าทำลายพืชได้ทุกกลุ่ม (ธีระ สูตะบุตร. 2535) ไม้ประดับใบในวงศ์ Araceae ก็เป็นพืชกลุ่มหนึ่งที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย และทำความเสียหายให้เป็นอย่างมาก ดังนั้นในการศึกษาเพื่อหาวิธีการแก้ไข และป้องกันเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในวงศ์นี้ ต้องทำการศึกษาหาเชื้อสาเหตุที่เข้าทำลายพืช ศึกษาถึงลักษณะอาการของพืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย เพื่อทำให้ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใด การตรวจสอบเชื้อไวรัส มีหลายวิธีที่สามารถให้ผลที่ถูกต้องและเชื่อถือได้ เช่น การตรวจสอบด้วยวิธี Enzyme-linked immunorsorbent assay (ELISA) และใช้วิธีนี้ในการศึกษาและตรวจสอบปริมาณของเชื้อที่อยู่ในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน การศึกษาถึงพืชอาศัยของเชื้อโดยการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นของพืชทั้ง 4 ชนิดไปยังพืชอาศัยใน 5 วงศ์ ได้แก่ Leguminosae, Cucurbitaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae และ Solanaceae การตรวจสอบอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopy) โดยการตรวจสอบด้วยวิธี Leaf-Dip และวิธีการทำให้ต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ปลอดจากเชื้อไวรัสด้วยวิธีให้ความร้อน (heat treatment) แบบแห้งและแบบชื้น โดยหาช่วงระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สามารถทำให้พืชปลอดโรคได้

# บทที่ 2
# การตรวจเอกสาร

## 2.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไม้ดอกไม้ประดับในวงศ์ Araceae เป็นไม้ประดับที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากไม้ประดับในวงศ์นี้มีการผลิตเป็นการค้ากันอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นพืชที่มีราคาสูงเหมาะกับการผลิตเพื่อจำหน่าย ซึ่งประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิต และส่งออกสูงมีความความพร้อมของสภาพพื้นที่ปลูก ภูมิอากาศ แรงงานและการตลาด (บรรเจิด คติการ. 2534) แต่ในปัจจุบันพบว่าไม้ประดับในวงศ์ Araceae ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายและสร้างความเสียหายให้กับพืชในวงศ์นี้เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะเชื้อในกลุ่ม potyvirus เช่นเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) (Zettler *et al.* 1970) เชื้อ DMV พบครั้งแรกในปี 1970 คุณสมบัติโดยทั่วไปของเชื้อ DMV เป็นเชื้อไวรัสที่จัดอยู่ในกลุ่ม potyvirus รูปร่างเป็นเส้นสายยาว (flexuous rod) ยาวประมาณ 750 นาโนเมตร (Abo El-Nil *et al.* 1977; Zettler and Hartman 1987) มีรหัสพันธุกรรมเป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว ประกอบด้วย กรดนิวคลีอิก 5% โปรตีน 95% พบไวรัสในเซลล์ชั้นมีโซฟิลล์ อีพิเดอร์มิส และอาจพบในท่อลำเลียงอาหาร เชื้อไวรัสชนิดนี้ทำให้พืชสร้าง cylindrical inclusion protein รูป pinwheel (ล้อเกวียน) ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ที่ติดเชื้อ เชื้อ DMV ที่ได้จากน้ำคั้นของใบ *Philodendron selloum* มีคุณสมบัติดังนี้ เชื้อจะหมดสภาพการก่อโรคเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 60-65 °C เป็นเวลา 10 นาที หรือถูกทำให้มีความเจือจางที่ $10^{-3}$-$10^{-4}$ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26 °C เป็นเวลานานกว่า 75 ชั่วโมง (Bos1970 ; Alconero 1972 ) มีรายงานว่าเชื้อ DMV ทำให้พืชที่ถูกเชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำลาย จะแสดงลักษณะอาการของโรคแตกต่างกันขึ้นกับฤดูกาลเป็นอย่างมาก และเชื้อมีพืชอาศัยตามธรรมชาติ คือ *Aglaonema, Alocasia, Amorphophallu, Arisaema, Caradium* และ *Cyrtosperma spp.* เมื่อเชื้อเข้าทำลายจะแสดงอาการ ด่าง ส่วนในพืชพวก *Cryptocoryne, Dieffenbachia, Philodendron, Richardia* และ *Zantedeschia spp.* แสดงอาการ ด่างและรูปร่างใบผิดปกติ *Colocasia* และ *Xanthosoma spp.* แสดงอาการ ด่าง ใบเรียวยาวคล้ายขนนก และมีแผลแห้ง การถ่ายทอดเชื้อ สามารถถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงพาหะพวก *Myzus persicae, Aphis craccivora* และ *Aphis gossypii* แต่จะไม่ปรากฏอาการใน *Pentalonia nigronervasa* หรือ *Rhopalosiphum sp.* การถ่ายทอดเป็นแบบ non persistent สามารถถ่ายทอดโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล แต่จะไม่สามารถถ่ายทอดทางการสัมผัสระหว่างต้นพืช ทางเมล็ด และทางละอองเกสร (Brunt *et al.* 1995; CMI /AAB 1978)

การศึกษาเกี่ยวกับเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยกว้าง สามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 700 ชนิด ใน 40 วงศ์ โดยเฉพาะในพืชตระกูลแตง จะแสดงอาการด่าง และแคระแกรน นอกจากนี้ยังทำให้ผลผลิตของพืชลดลง การถ่ายทอดเชื้อสามารถถ่ายทอดโดยมีแมลงพาหะมากกว่า 60 ชนิด เช่น *Acyrthosiphon pisum* ,*Aphis craccivora* และ *Myzus persicae* การถ่ายทอดเชื้อเป็นแบบ non-persistent เชื้อ CMV มีขนาดของอนุภาคยาว 29 นาโนเมตร มีลักษณะเป็นทรงกลม (CMI / AAB 1979; Kenneth Horat 1990; Brunt *et al.* 1995)

มีการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ CMV โดย Walkey (1985) และ Dragoljub *et al.*(1999 ) รายงานว่าเชื้อ CMV อยู่ในกลุ่มของ Cucummovirus มี genomes เป็นแบบ tripartite มีรหัสพันธุกรรมเป็น RNA สายเดี่ยว อนุภาคเป็นทรงกลม(isometric)เส้นผ่านศูนย์กลางของอนุภาคยาวประมาณ 28 nm มีพืชอาศัยในธรรมชาติหลายชนิด และอาการของโรคที่พบในพืชอาศัย เช่น *Cucumis sativas* และในพืชตระกูลแตงชนิดอื่นๆ แสดงอาการด่างและแคระแกรน ผลผลิตลดลง ส่วนใน *Lycopersicon esculentum* แสดงอาการ ด่าง และแคระแกรน *Spinacia oleracea* แสดงอาการ เหลือง และแคระแกรน ที่รุนแรง การทดลองเกี่ยวกับพืชอาศัย มีมากกว่า 9 ตระกูล ที่อ่อนแอต่อเชื้อ CMV เช่น *Chenopodium amaranticolor* และ *C. quinoa* แสดงอาการ แผลจุดเหลือง *Cucumis sativas* แสดงอาการ ด่าง *Vigna unguculata* แสดงอาการ แผลจุดแห้ง *Lycopersicon esculentum, N. redwardsonii, N. glutinosa* และ *N. tabacum* แสดงอาการไม่แน่นอน ขึ้นกับสายพันธุ์ (strain) ของเชื้อไวรัส เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล (sap transmission) และสามารถถ่ายทอดเชื้อโดยเมล็ดได้ (แต่มีเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดไม่แน่นอน) การแพร่ระบาดของเชื้อ CMV มีการกระจายอยู่ทั่วโลกเป็นบริเวณกว้าง คุณสมบัติของอนุภาคในน้ำคั้นพืชเชื้อจะหมดสภาพการก่อโรคเมื่อได้รับความร้อนที่ 55-70 °C หรือถูกทำให้เจือจางที่ความเข้มข้น $10^{-4}$ ระยะเวลาที่เชื้อยังสามารถก่อโรคได้ เท่ากับ 1-10 วัน ที่อุณหภูมิ 26 °C

Hearon (1979) รายงานว่าเชื้อ CMV ก็สามารถเข้าทำลายไม้ประดับในวงศ์ Araceae เช่นกันตัวอย่างเช่นใน *Philodendron selloum* ทำให้รูปร่างของใบเหมือนถ้วยคว่ำและเส้นกลางใบเหลือง

Sabanadzovic *et al.* (1995) รายงานเกี่ยวกับเชื้อไวรัสที่มีชื่อว่า Pothos latent virus (PoLV) โดยทำการแยกเชื้อ ด้วยวิธีการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นของต้นพลูด่าง *(Scindapsus aureus)* ที่ไม่แสดงอาการของโรค พบว่าเชื้อ PoLV มีขนาดของอนุภาคมีความยาวเท่ากับ 30 nm มี genome เป็น monopatite ประกอบด้วย non-polyadenylated และมีรหัสพันธุกรรมเป็น RNA

สายเดี่ยว มีน้ำหนักโมเลกุลของอนุภาค เท่ากับ 4300 ดอลตัน คุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อ PoLV คล้ายคลึงกับเชื้อไวรัสในกลุ่ม Tombusviridae

งานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus ที่เข้าทำลายพืชในวงศ์ต่างๆ โดย Van Regenmortel (1978) รายงานว่าเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus เป็นไวรัสกลุ่มใหญ่ของไวรัสที่เข้าทำลายพืช ไวรัสในกลุ่มนี้ยังมีความใกล้ชิดกับไวรัสในกลุ่มอื่นๆ อีกประมาณ 100 ชนิด ซึ่งจะเรียกชื่อแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ คุณสมบัติทางชีววิทยา ซึ่งได้แก่พืชอาศัย อาการของโรคที่แสดงออก และควรทำการพิสูจน์โรคร่วมกันหลายๆ วิธีก่อนสรุปผล เช่น Shimoyama *et al.* (1992) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ได้จากต้น *Amorphophallus konjac* โดยพืชจะแสดงอาการด่างที่ใบ เชื้อชนิดนี้มีลักษณะคล้ายกับเชื้อ DMV เมื่อตรวจสอบพืชอาศัยโดยการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นพืชลงในพืชอาศัย 5 วงศ์ พบว่าสามารถเข้าทำลายพืชในวงศ์ Araceae ได้ และเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยแคบ อาการของโรคที่เกิดขึ้นในต้น *Philodendron selloum* มีความแตกต่างกับเชื้อ DMV และสามารถถ่ายทอดทางแมลงได้โดย *Aphis gossypii* เป็นพาหะ มีการตรวจสอบคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาโดยการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA และ การตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเป็นเชื้อไวรัสต่างชนิดกันกับเชื้อ DMVและเป็นไวรัสชนิดใหม่ ให้ชื่อว่า konjak mosaic virus (KMV)

Hill and Daphne (1980) รายงานว่าต้น *Dieffenbachia picta* พันธุ์ Schott ถูกเชื้อไวรัส เข้าทำลายส่งผลให้พืชอ่อนแอลงกว่าต้นพืชปกติ และแสดงอาการแผลเป็นวงแหวน (chlorotic) แคระแกรน เมื่อนำต้นพืชไปตรวจสอบหาเชื้อโรคด้วยวิธี leaf-dip และใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเชื้อมีลักษณะเป็นเส้นยาวคดงอ (flexuous filamentous) ขนาดของอนุภาคยาว 750 นาโนเมตร อยู่ในกลุ่มของ potyvirus ทำให้ทราบว่าเชื้อสาเหตุที่เข้าทำลายพืชคือเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) เชื้อ DMV สามารถเข้าทำลายพืช 13 ตระกูลในวงศ์ Araceae ตัวอย่าง เช่น *Aglaonema, Anthurium, Caladium, Dieffenbachia, Philodendron* และ *Zantedeschia* เชื้อไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโดยน้ำคั้น และมีแมลง (เพลี้ยอ่อน) เป็นพาหะ

Chase and Zettler (1982) กล่าวว่าอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ DMV เข้าทำลายต้น *Dieffenbachia* 14 พันธุ์ จะแสดงออกแตกต่างกันเช่น ใน *Dieffenbachia maculata* พันธุ์ Perfection แสดงอาการด่างที่ใบและใบบิดเบี้ยวอย่างชัดเจน แต่ใน *Dieffenbachia* พันธุ์ Memoria -Corsii และ *Dieffenbachia* พันธุ์ Bausei Exhibited จะไม่แสดงอาการของโรค

Kositratana *et al.* (1983) รายงานว่าต้น *Aglaonema commutatum* ที่อยู่ในเรือนเพาะชำของรัฐ California ประเทศสหรัฐอเมริกา พบอาการแผลจุดเหลือง ต้นแคระแกรน ใบบิดเบี้ยวและด่าง การตรวจสอบอนุภาคของเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจากวิธี Leaf-Dip พบ

อนุภาคเป็นเส้นยาว (flexuous rod) คดงอคล้ายเส้นด้าย ความยาวขนาด 750 nm จากนั้นทำการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นของต้น *A. commutatum* ไปยังต้น *Philodendron selloum* ในระยะ 6-7 ใบ พืชจะแสดงอาการเหลืองที่เส้นกลางใบ ตามด้วยอาการด่างที่ใบอย่างรุนแรง และในใบอ่อนใบจะเปลี่ยนรูปไปจากเดิม หลังจากการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 2-3 สัปดาห์ จากนั้นทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดนี้โดยให้ทำปฏิกิริยากับ antiserum ของเชื้อ DMV ด้วยวิธี Immuno-double diffusion ปรากฏว่าเกิดปฏิกิริยาร่วมกัน เชื้อไวรัสที่เข้าทำลายต้น *A. commutatum* น่าจะเป็นเชื้อ DMV เนื่องจากการแสดงอาการบนพืชอาศัยที่ใช้ในการทดสอบมีลักษณะเหมือนกัน จึงสรุปได้ว่าเชื้อ DMV เป็นเชื้อที่เข้าทำลายต้น *A. commutatum*

Bellardi and Bertaccini (1993) รายงานว่าพบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลาย พืชประดับใบในประเทศอิตาลีที่เข้าทำลายพืชในวงศ์ Araceae เช่น Croton *(Codiaeum pittosposporum)* Poinsettia *(Euphorbia pulcherrima )* และ Yucca วิธีการที่ดีในการป้องกันและควบคุมเชื้อไวรัส ที่จะเข้าทำลายพืชอาศัยได้โดยการตรวจสอบลักษณะของความแข็งแรงของพืช เช่นการตรวจสอบท่อนพันธุ์ก่อนใช้ขยายพันธุ์ การกำจัดพาหะของโรค ( เช่น เพลี้ยอ่อน ไส้เดือนฝอย และเพลี้ยไฟ) และวัชพืชระหว่างการทำการเพาะปลูกในโรงเรือน

Liang (1994) ได้ทำการตรวจสอบและวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้อ dasheen mosaic virus โดยใช้วิธี Immunolabelling ในพืช 10 ชนิด ( *Anthurium andreaeanum, Caladium hortulanum, Philodendron selloum, Zantedeschia elliottiana, Z. aethiopica, Aglaonema commutatum, Alocasia macrorrhiza, Colocasai esculenta, Dieffenbachia maculata* และ *D. amoena*) ในวงศ์ Araceae

Chen *et al.* (1996) รายงานว่าไวรัสที่เป็นเส้นยาว (filamentous) จะทำปฏิกิริยารุ่นแรงกับ antiserum ของเชื้อ dasheen mosaic virus ที่แยกมาจากต้น *Pinelli cordata* ใน มณฑล Zhejiang ประเทศจีน ในการทำการปลูกเชื้อลงในพืชทดสอบ 12 วงศ์ มีเพียง *Philodendron selloum, Pinellia cordata* และ *P. tenata* ที่เชื้อสามารถเข้าทำลายได้

Fawzy (1996) รายงานว่าได้ทำการแยก (isolates) เชื้อ dasheen mosaic virus ที่เข้าทำลายพืชพวก *Dieffenbachia* และ *Aglaonema* ในสภาพธรรมชาติได้สำเร็จโดยถ่ายทอดลงในพืชอาศัย

Gunna (1997) รายงานว่า การตรวจสอบเชื้อไวรัส พืชในวงศ์ Araceae ในพื้นที่ 3 แห่งของ Wahhi valley ในพื้นที่สูงทางตะวันตกของหมู่เกาะ Papua New Guinea พบเชื้อ alomae bobone complex (ABVC) โดยจะพบอนุภาคของเชื้อเป็นท่อน (bacilliform) ขนาดเล็กและใหญ่ และพบเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) เข้าทำลายร่วมกันในพืชที่ทำการตรวจสอบของพื้นที่ทั้งหมด

Valverde *et al.* (1997) ได้ทำการทดลองผลิต *white cocoyam* ให้ปลอดจากเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) แล้วเลือกพื้นที่ในการตรวจสอบพืชหลังจากที่ปลอดจากเชื้อ 2 พื้นที่ที่มีความแตกต่างกัน พื้นที่แรกให้พืชเจริญในสภาพแวดล้อมที่เป็นแหล่งของเชื้อ DMV สูง ส่วนในพื้นที่ที่สอง ให้พืชเจริญในพื้นที่ที่มีแหล่งของเชื้อต่ำมากๆ หรือในพื้นที่ที่ไม่มีพืชที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ DMV ผลปรากฏว่ามีการ กลับเข้ามาทำลายพืชอีกครั้งของเชื้อโรคในพืชที่ปลูกในสภาพแรก แต่ผลผลิตของพืชในรุ่นที่สองยังสูงอยู่ ส่วนในพื้นที่ที่สอง ปรากฏว่าไม่มีการกลับเข้ามาทำลายซ้ำของเชื้อ DMV ในพืช และยังให้ผลผลิตสูงหลังจากรุ่นที่สองด้วย

การศึกษาอาการของโรคไวรัสที่ปรากฏในฤดูต่างๆโดย Rana and Vovlas (1983) ทำการศึกษาและพบว่า ต้น *Richardia africana* จะแสดงอาการด่าง และใบเหลือง จะแสดงอาการชัดเจนขึ้นในใบอ่อนระหว่างช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ผลิ

การวินิจฉัยเชื้อไวรัสโดยวิธีการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา ทำได้หลายวิธีเช่น การตรวจสอบปฏิกิริยาการตกตะกอนระหว่าง แอนติเจน และ แอนติบอดี การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และการตรวจสอบที่นิยมใช้และให้ผลที่น่าเชื่อถือ ได้วิธีหนึ่งคือ วิธีการตรวจสอบโดย Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ในปัจจุบันนิยมนำมาใช้เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบไวรัสชนิดต่างๆ ใช้ในด้านการวินิจฉัยโรค การพยากรณ์โรค การผลิตท่อนพันธุ์ปราศจากโรค และการคัดพันธุ์ต้านทาน ในทางทฤษฎี ELISA เป็นวิธีที่สามารถตรวจหาเชื้อสาเหตุโรคพืชได้หลายชนิด เช่น ไวรัสพืชทุกชนิด แบคทีเรีย และเชื้อรา ELISA เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพ ในการตรวจสอบและประเมินโรคไวรัสพืช และมีส่วนสำคัญยิ่งในการเพิ่มขีดความสามารถของนักไวรัสพืช ELISA กลายเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการทดสอบทางเซรุ่มวิทยาของไวรัสพืช เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย เร็ว ปรับใช้ได้หลากหลาย ความไวของปฏิกิริยาสูง และมีความแม่นยำสูง สามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของไวรัสชนิดเดียวกัน และไวรัสต่างชนิดกัน (ปราณี ฮัมเมอร์ลิ่งค์. 2530)

โดย Hampton (1990) รายงานว่าการใช้วิธี ELISA หรือ EIA มีการประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบเชื้อไวรัสครั้งแรกโดย Avramas ได้มีรายงานการใช้กับงานวิจัยไวรัสพืชครั้งแรกในปี 1976 โดย Clark, Adams และ Barbara ศึกษาเริ่มแรกกับเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชพวกไม้ผลและมันฝรั่ง เช่น plum pox virus, prune dwarf virus และ prunus necrotic ringspot virus ต่อมา Clark and Adams (1977) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA) โดยเติมแอนติซีรัมของเชื้อที่ต้องการจะตรวจสอบ แล้วใส่น้ำคั้นของพืชลงไป เติมเอนไซม์เลเบลแอนติบอดี จากนั้นเติมเอนไซม์ซับสเตรดลงไป จะสังเกตเห็นปฏิกิริยาสีเหลืองถ้าพืชที่ใช้ตรวจสอบมีเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี Indirect ELISA ซึ่งเป็น Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA) ประเภทหนึ่ง โดย plate ทดสอบจะถูกเคลือบไว้ด้วยแอนติเจน แล้วเติมแอนติบอดีตัวแรกซึ่งเป็น antibody ที่ผลิตจากสัตว์ เช่น กระต่าย ต่อมาเติมแอนติบอดีตัวที่สองซึ่งเป็น commercial antibody conjugate ที่มีขายเป็นการค้า เช่น Goat anti-rabbit ลงไปทำปฏิกิริยาจับกับแอนติบอดีตัวแรก จากนั้นจึงเติม p-nitrophenyl phosphate เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาสีขึ้นแล้วเปรียบเทียบกับปฏิกิริยาสีที่รู้แน่นอน ว่ามีเชื้อและไม่มีเชื้อไวรัสชนิดที่ทดสอบ ในการทดสอบ ELISA tests เพื่อให้ผลของปฏิกิริยามีความชัดเจนขึ้น อาจมีการเพิ่มขั้นตอนบางขั้นตอนระหว่างการทดสอบ เช่น Hewings and D' Arcy (1984) รายงานว่าการเก็บ plate ที่อุณหภูมิ 4 °C หรือ 22 °C เป็นเวลาข้ามคืน (18 หรือ 24 ชั่วโมง) หลังหยอด Anti-Goat IgG จะให้ผลการทดสอบชัดเจนกว่าการเก็บที่ 3 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือเก็บที่ 4 °C หรือ16 °C เป็นเวลา 1, 3 หรือ 6 ชั่วโมง ในการตรวจสอบเชื้อ beet western yellow virus (BWYV)

การตรวจสอบโดยวิธี ELISA นี้สามารถบอกถึงปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่เข้าทำลายพืชได้และสามารถใช้ตัวอย่าง ของพืชส่วนใดก็ได้ในการตรวจสอบ และนิยมใช้เป็นวิธีการวินิจฉัยเชื้อเริ่มแรกในการตรวจสอบเชื้อไวรัสชนิดใหม่ๆ งานทดลองที่เกี่ยวข้องกับการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA โดย Zettler *et al.* (1970) รายงานว่าการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบน้ำคั้นของพืชวงศ์ Araceae ที่มีเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ได้แก่ต้น *Diffenbachia picta* และ *Philodendron selloum* จากการอ่านผลที่เกิดขึ้นพบว่า *D. picta* มีปริมาณของเชื้อ DMVที่สูงกว่าใน *P. selloum*

Clark (1981) ได้ทำการทดลองใช้ antigen และ labeled antibody ผสมกันแล้วทำการบ่มจะเป็นการกระตุ้นให้ antibody ทำงานได้ดีกว่าวิธีปกติ วิธีการนี้ได้ประยุกต์ใช้กับโรค apple chlorotic leafspot virus และให้ผลที่ดีกับโรคพืชชนิดอื่นๆ

Hu *et al.* (1994) ได้ทำการตรวจเชื้อ DMV ในต้นเผือก (*Colocasia esculenta*) 54 สายพันธุ์ ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยการใช้วิธี ELISA พบว่าเชื้อ DMV เข้าทำลายต้นเผือก 36 พันธุ์ จากนั้นทำการผลิตพืชปลอดโรคโดยการนำไปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เมื่อสามารถผลิตพืชปลอดจากเชื้อ DMV ได้แล้ว ทำการตรวจสอบโรคอีกครั้งด้วยวิธี ELISA ก่อนที่จะนำต้นเผือกไปขยายพันธุ์ต่อไป

การศึกษาการกระจายตัวของเชื้อไวรัส ในพืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายโดย Bellardi and Vicchi (1995) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี ELISA tests พบว่า *Gladiolus* sp. ที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ bean yellow mosaic virus (BYMV) มีปริมาณเชื้อไวรัสในส่วนใบและดอกสูงเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆ

Hu *et al.* (1995) รายงานว่าการใช้วิธี indirect ELISA เป็นการพัฒนาเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ของต้นเผือกในรัฐ Hawaiian โดยใช้ใบของเผือกเพียง 0.01 มิลลิกรัม การกระจายตัวของเชื้อไวรัสชนิดนี้ พบว่าเชื้อจะมีปริมาณมากในใบ และมากกว่าในส่วนของก้านใบ และหัว ปริมาณของเชื้อจะเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลา

James and Mukerji (1996) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Plate-trapped antigen ELISA (PTA-ELISA) พบว่าส่วนใบอ่อนและดอกเป็นเนื้อเยื่อที่ดีที่สุดในการตรวจสอบหาเชื้อ cherry mottle leaf virus (ChMLV) ที่เข้าทำลายต้น *Prunus tomentosa*

Li *et al.* (1996) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี ELISA พบว่ามะเขือเทศที่ถูกเชื้อ tomato infectious chlorosis virus (TICV) เข้าทำลาย สามารถพบเชื้อไวรัสมีปริมาณความเข้มข้นมากที่สุดบริเวณใบที่เจริญเต็มที่ และแสดงอาการของโรคอย่างชัดเจน

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 สามารถตรวจเชื้อไวรัสได้เฉพาะส่วนที่แสดงอาการของโรคเท่านั้น

Chen *et al.* (1998) ได้ทำการทดสอบโดยใช้วิธี Double antibody sandwich ELISA (DAS-ELISA) tests พบว่าต้น *Polianthes tuberose* ที่ถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ tuberose mild mosaic virus (TMMV) สามารถตรวจพบเชื้อไวรัสมีปริมาณมากที่สุดในส่วน sheath leaves of flower stems.

Freitas Astus *et al.* (1999) ได้ทำการทดลองตรวจสอบหาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายกล้วยไม้ โดยใช้กล้วยไม้มากกว่า 1,777 ตัวอย่าง เลือกชนิดที่มีความแตกต่างกันและลูกผสมในการตรวจสอบหาเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) โดยใช้วิธี PAT-ELISA และ การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ในการตรวจสอบครั้งนี้

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืช และฤดูกาลในการตรวจสอบ Almeida *et al.* (2001) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายข้าวโพด เชื้อไวรัสชนิดนี้อยู่ในกลุ่ม potyvirus ก่อให้เกิดอาการด่าง และเป็นเชื้อที่ส่งผลกระทบต่อข้าวโพดเป็นอย่างมาก โดยใช้วิธี dot- ELISA ในการตรวจสอบ ระหว่างเดือนมีนาคม ปี 1997 ถึง เดือนกุมภาพันธ์ ปี 1998 พบว่าเชื้อจะส่งผลกระทบกับพืชสูงถ้าอากาศเย็นขึ้น

Pourrahim (2001) รายงานว่าเขาได้ใช้วิธี ELISA ในการตรวจสอบเชื้อ TSWV ในต้นมันฝรั่ง โดยเลือกอาการด่างเหลือง (necrosis) ที่แสดงอาการอย่างรุนแรงที่ใบและลำต้น ในพันธุ์ Agria, Ajaxs และ Arinda ในประเทศอิหร่าน ระหว่างฤดูร้อนของปี 1998

Wangia *et al.* (2001) รายงานว่าได้ใช้วิธี Double antibody sandwhich ELISA ในการตรวจสอบหาเชื้อ tomato spotted wilt virus (TSWV) ที่เข้าทำลายต้นมะเขือเทศ ในระหว่างเดือนพฤษภาคม ปี 1999 ถึง เดือนมีนาคม 2000 ในระยะการเจริญเติบโตช่วงต่างๆ ของต้นมะเขือเทศในประเทศเคนยาและเป็นรายงานแรกที่พบว่าเชื้อ TSWV เข้าทำลายมะเขือเทศ

Bertozzi *et al.* (2002) ได้รายงานถึงความแม่นยำของวิธีการตรวจสอบโดยวิธี ELISA ในการตรวจสอบเชื้อ Prunus necrotic ringspot virus (PNRSV) ในแอลมอลล์ โดยใช้ส่วนของกลีบดอกและใบอ่อนของพืช การใช้วิธี ELISA สามารถตรวจสอบพบเชื้อไวรัสได้ถึงแม้ว่าจะเป็นช่วงที่มีการสะสมเชื้อไวรัสน้อย โดยการใช้กลีบดอกและใบของพืช และการตรวจสอบในช่วงฤดูก่อนการให้ผลผลิตจะมีความแม่นยำมาก

ในการผลิตพืชปลอดโรคสามารถทำได้โดย การให้ความร้อนกับพืชเป็นระยะเวลาหนึ่ง การให้ความร้อนกับพืชมีทั้งความร้อนแบบแห้ง (dry heat treatment) และการให้ความร้อนแบบชื้น (moist heat treatment) การให้ความร้อนแบบแห้งมีผู้ทำการวิจัยโดย Kenneth Horst (1990) รายงานว่า เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดจากเชื้อไปยังพืช โดยผ่านทางแมลงพาหะ ไร เชื้อรา และไส้เดือนฝอย ถ่ายทอดโดยวิธีกล การทาบกิ่ง (grafting) และการปักชำชิ้นส่วนของพืชที่มีเชื้อไวรัส การควบคุมโรคโดยเริ่มจากการใช้ชิ้นส่วนของพืชที่ใช้ในการขยายพันธุ์ที่ปราศจากโรค การทำให้พืชปลอดจากโรคโดยการใช้ความร้อน (heat treatment) แล้วให้พืชเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูงหลายอาทิตย์ หรือ หลายเดือน ทำการตรวจสอบพืชที่ผ่านการให้ความร้อนจะใช้วิธีทางชีววิทยา และ/หรือ วิธีทางเซรุ่มวิทยา ก่อนที่นำชิ้นส่วนพืชไปขยายพันธุ์ต่อไป

Mortersen (1991) รายงานความแตกต่างของไม้ประดับในวงศ์ Araceae 15 สายพันธุ์ที่สามารถเลี้ยงเป็นไม้กระถางที่อุณหภูมิช่วง 15 – 33 °C และศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการให้ผลิตผล มากที่สุด ผลผลิตที่ได้จะมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของพืช สามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม 1. พืชอุณหภูมิต่ำ พืชสามารถให้ผลผลิตได้เมื่อได้รับอุณหภูมิที่น้อยกว่า 21 °C เช่น (*Begonia rex – cultorum*, *Nematanthus radicans* [*N. gregarious*] และ *Sexifraga stolonifera*) 2. พืชอุณหภูมิปานกลาง 21-24 ° C เช่น *Fatsai japonica*, *Peperomia caperata* และ *P.obtusifolia* 3. พืชอุณหภูมิสูงอุณหภูมิ 24-27 °C เช่น *Aglaonema commutatum*, *Chlorophytum comosum*, *Codiaeum veriegatum*, *Pracaena fragrans*, *Monstera deliciosa*, *Philodendron scanden*, *Radermachera sinica*, *Spathiphyllum wallisii* และ *Syngonium podophyllum* ส่วนต้น *S. podophyllum* และ *R. simica* จะสามารถ

ให้ผลผลิตได้เมื่อได้รับสูงกว่า 27 ° C และที่อุณหภูมิประมาณ 30 ° C จะพบว่าใบจะได้รับความเสียหายเป็นจำนวนมากและในบางชนิดตายไป

Xu and Niimi (1999) รายงานว่าผลของการใช้สารเคมี และ/หรือ การใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 35 ° C ในการผลิตพืชปลอดเชื้อของหัว *Lilium longiflorum* พันธุ์ Georgia และ ลูกผสมของ *Lilium* พันธุ์ Casablanca ที่เข้าทำลายโดยเชื้อ lily symptomless virus (LSV), tulip breaking virus (TBV – L) และ cucumber mosaic virus (CMV) หัวของพืชที่ผ่านความร้อนที่ 35 ° C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะแสดงอาการของโรคน้อยกว่า control โดยเฉพาะในพันธุ์ Georgia และผลของการใช้ความร้อนจะมีผลทำให้จำนวนของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายหัวของพืชลดลงด้วย

Macias (2000) ได้ทำการเก็บเกี่ยวเมล็ดแตงกวา จากต้นที่มีการติดเชื้อไวรัส (CGMMV) ในช่วงปี 1997-1998 โดยนำเมล็ดไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 ° C เป็นเวลา 3วัน การใช้วิธีนี้จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้

Torres *et al.* (2000) รายงานว่าการเพาะเลี้ยงยอดกระเทียม ในสภาพปลอดเชื้อร่วมกับการใช้ความร้อน (heat treatment) ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 35 วัน ทำให้พืชปลอดจากเชื้อไวรัส 70 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อใช้ความร้อนสูงถึง 40 °C จะทำให้พืชพัฒนาไปเป็นต้นลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถทำให้พืชปลอดจากเชื้อได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์

Oh *et al.* (2001) รายงานการศึกษาการกำจัดเชื้อไวรัส แบบวิธีผสมผสาน โดยทำการทดลองกับต้นแพร์ 6 สายพันธุ์ และพบว่าเชื้อที่ทำให้เกิดจุดสีดำที่ใบของต้นแพร์สามารถ ยับยั้งได้โดยการใช้ความร้อนในการรักษา โดยใช้เวลา 3 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 40 ° C (กลางวัน) และที่อุณหภูมิ 32 ° C (กลางคืน) หรือใช้เวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 37 ° C (กลางวัน) และที่อุณหภูมิ 30 ° C (กลางคืน) แต่อัตราการรอดชีวิตของพืชต่ำ และปรากฏว่าหลังจากนั้นในปีแรกพบว่าเชื้อไวรัสสามารถเข้าทำลายพืชได้

Makkouk and Atter (2001) รายงานถึงผลกระทบของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อเชื้อ berley stripe mosaic virus (BSMV) โดยเก็บเมล็ดไว้ในที่เย็นและให้ความร้อน โดยการประเมินค่าจากเมล็ดของข้าวบาเลย์ที่ยังถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย โดยเก็บเมล็ดไว้ในที่เย็นเป็นเวลา 5 ปี ผลปรากฏว่าไม่มีผลต่อเชื้อไวรัสและเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ด แต่เมื่อนำเมล็ดไปไว้ที่อุณหภูมิ 80 ° C เป็นเวลา 3, 5, 10, 12, 15 และ 17 วัน พบว่าเชื้อลดปริมาณลง 33-35 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับวิธีการ ถ้าเลือกวิธีการที่ให้เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อไวรัสลดลง ก็จะมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การงอกของเมล็ดลดลงด้วย และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 85 ° C เป็นเวลา 10 วัน ทำให้เชื้อไวรัสลดลงจาก 59 เปอร์เซ็นต์เป็น 25 เปอร์เซ็นต์ แต่ความงอกของพืชลดลงจาก 94 เปอร์เซ็นต์เป็น 53 เปอร์เซ็นต์

การผลิตพืชปลอดโรคโดยการให้ความร้อนแบบชื้น มีผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้โดย สุเม อรัญนารถ. (2539) ทำการศึกษาและรายงานว่าการเลี้ยง meristem โดยการใช้ apical shoot และ root meristem ซึ่งเป็นส่วนที่มีไวรัสน้อยหรือเกือบไม่มีเลย ดังนั้นการตัดเอาส่วน meristem ที่มีขนาด 0.1 – 1 มิลลิเมตร มาเลี้ยงจะได้ต้นที่ปราศจากไวรัส มีวิธีการอีกอันหนึ่งที่ใช้ร่วมกับ meristem culture ในการขจัดไวรัส คือการใช้ ความร้อน (heat therapy หรือ heat treatment) ไวรัสบางชนิดอาจตายได้ในอุณหภูมิสูงขึ้น โดยที่อุณหภูมินั้นไม่เป็นอันตรายต่อพืช โดยการนำส่วนของพืช เช่น กิ่งชำ, หัว และลำต้นใต้ดิน ที่นำมาแช่ในน้ำร้อน หรืออบที่อุณหภูมิ 50-52 ° C นาน 10 - 30 นาที หรือการใช้ส่วนของพืชทั้งต้นที่ปลูกในอุณหภูมิ 32-40 ° C นาน 4-30 สัปดาห์

Alconero (1972) ได้ทำการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการใช้ความร้อน (heat treatment) เพื่อทำให้พืชปลอดจากเชื้อไวรัส พบว่า หัวของ *Xanthosoma* spp. 4 พันธุ์ ที่ทำการผลิตเป็นการค้าโดยการแช่น้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 35-95 ° C เป็นเวลา 10 นาที โดยทำการเว้นช่วงอุณหภูมิ 10 ° C และที่ 35 -65 ° C เป็นเวลา 5 นาที โดยเว้นช่วงอุณหภูมิ 10 ° C พบว่าถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 65 ° C จะไม่มีผลต่อเชื้อ DMV และถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 65 ° C จะทำให้หัวของพืชสูญเสียความงอก จุดที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อไม่มีผลต่อการก่อโรคในน้ำคั้นของต้น *Philodendron selloum* คืออยู่ระหว่าง 60-65 ° C

Koepp (1992) รายงานการทดลองโดยนำใบขอต้น พลูด่าง (*Scindapsus aurea*) ใส่ไว้ที่อุณหภูมิแตกต่างกันหลายๆ อุณหภูมิโดยใช้เวลา 5 นาที แล้วนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาทีก่อนที่จะให้แสง fluorescence กับแสง pulse amplitude modulation (PAM) ปรากฏว่าช่วงอุณหภูมิ 46-49 °C ที่พืชได้รับเป็นเวลา 5 นาที ทำให้พืชสร้าง chlorophyll ในปริมาณที่สูงขึ้น

Cheema *et al.* (1999) ได้ทดลองนำ bud – stick ของต้น kinnow ที่ติดเชื้อ citrus ring spot virus โดยแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 50 ° C เป็นเวลา 30, 60 และ120 นาที พบว่าอุณหภูมิช่วง 40-50 °C จะมีผลต่อการลดปริมาณของเชื้อไวรัสลงได้ โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 ° C เป็นเวลา 30 นาทีขึ้นไป และที่ 45 °C เป็นเวลา 120 นาที จะมีผลในการกำจัดเชื้อไวรัสได้ดีที่สุด แต่อัตราการรอดชีวิตของ bud - stick ที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 30, 60 และ 120 ° C เป็น 30, 25 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 45 ° C เป็นเวลา 120 นาที มีอัตราการรอดชีวิต 40 เปอร์เซ็นต์ การให้อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 35 °C จะไม่มีผลต่อการลดปริมาณของเชื้อไวรัส

Bertaccini *et al.* (2001) รายงานว่าในระหว่างปี 1997-1999 ได้ทำการปักชำกิ่งขององุ่น (3 สายพันธุ์) แล้วนำไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 53 ° C เป็นเวลา 20 นาที และที่ 50 ° C เป็นเวลา 40 นาที ในการทดลองครั้งนี้ใช้ส่วนของข้อปล้อง (nosted) ที่ทำการทาบกิ่ง (grafting) แล้วนำไปปักชำ พบว่าส่วนของรากที่เกิดจากการปักชำได้รับความเสียหาย จากการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ

ดังกล่าว การใช้อุณหภูมิที่ต่ำลงเป็นการลดความเสียหายของพืชลงได้ ซึ่งค่าเฉลี่ยของอัตราการรอดชีวิตของพืช ที่ไม่ได้ผ่านการแช่ในน้ำร้อนมีค่าเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ ส่วนพืชที่ผ่านการแช่ในน้ำร้อนจะมีค่าเฉลี่ยของอัตราการรอดชีวิต 67 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อัตราการรอดชีวิตขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของพืชด้วย

Runia *et al.* (2001) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้อุณหภูมิที่มีความแตกต่างกัน ในการลดการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส โดยการนำเชื้อไปแช่ในน้ำร้อน ในการทดลองใช้ เวลาและอุณหภูมิที่หลากหลาย เพื่อตรวจสอบดูความสามารถในการทำลายของเชื้อ tomatomosaic virus (ToMV) เช่น ให้ความร้อนที่ 95 ° C เป็นเวลา 15 วินาที ซึ่งให้ผลการทดลองออกมาเหมือนกับการให้ความร้อนที่ 87 ° C เป็นเวลา 15 วินาที จะให้ผลในการทำลายเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์

การผลิตพืชปลอดเชื้อโดยให้ความร้อนปัญหาที่พบ คือถ้าให้ความร้อนที่สูงและระยะเวลาที่นานเกินไปไม่เหมาะกับพืชที่ต้องการผลิตพืชปลอดเชื้อ ก็จะมีผลกระทบกับพืชทำให้พืชตายเช่นเดียวกับ Chartisathia (1997) พบว่าการให้ความร้อนไม่เหมาะกับการใช้ กำจัดเชื้อไวรัสในออนซิเดียม เพราะหน่ออ่อนไม่สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 40 °C ได้นานเกิน 1 สัปดาห์ หน่ออ่อนจะเหลืองและตายนึ่งถึง 85 เปอร์เซ็นต์ และส่วนอีก 15 เปอร์เซ็นต์ก็จะตายในเวลาต่อมา

# บทที่ 3
# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ได้จากการสำรวจในตลาดต้นไม้สวนจตุจักรแต่ละช่วงเวลาของปี 2543-2544

3.1.2 อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบ ลักษณะของอนุภาคของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน (Electronmicroscopy)

- phosphate (pH 7.4 ) สารละลาย buffer ใช้ในการผสมบดกับตัวอย่าง
- uranyl acetate (UA) 2%
- antiserum ของเชื้อ DMV และเชื้อ CMV
- กริดขนาด 300mesh ที่เคลือบด้วย ฟอร์มวา 2% และ คาร์บอน
- น้ำกลั่น
- พาราฟิล์ม
- กระดาษกรองสำหรับซับน้ำที่ติดกับกริด
- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3.1.3 อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธี ELISA

- ELISA plate
- micropipet และ tip
- buffer PBS (pH 7.4) และ PBS ผสม Tween 20
- coating buffer (pH 9.6)
- extraction buffer
- conjugate buffer
- substrate buffer
- anti-Goat IgG
- น้ำคั้นพืช
- antiserum ของเชื้อ DMV titre 1:128 และ CMV titre 1:256 ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มหน่วยงานไวรัสกรมวิชาการเกษตร
- p - nitrophenyl phosphate 5mg / 10 ml ละลายใน substrate buffer
- โกร่งบด และที่บด
- เครื่องวัด pH

- สารละลาย NaOH 1 N และ HCl 1N (สำหรับปรับ ค่า pH)
- beaker, cylender, pipet, จุกยาง

3.1.4 อุปกรณ์และสารเคมีในการตรวจสอบพืชอาศัย (host range) ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และ ราชินีสีทอง

- sodium citrate buffer 0.1 M (pH 6.5)
- potassium phosphate buffer 0.1 M (pH 7.5)
- โกร่ง และที่บด
- celite 545
- น้ำแข็ง
- กระติกเก็บความเย็น
- label
- กระดาษหนังสือพิมพ์

พืชทดสอบที่ใช้ Family Solanaceae

- ยาสูบใบเล็ก *Nicotiana glutinosa*
- ยาสูบใบใหญ่ *N. tabacum*
- ลำโพง *Datura stramonium* L.

Family Leguminosae

- ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr.
- ถั่วเขียว *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek
- ถั่วแดง *Phaseolus coccineus* L.

Family Cucurbitaceae

- แตงกวา *Cucumis sativas* L.
- ฟักทอง *Cucurbita moschata*

Family Amaranthaceae

- บานไม่รู้โรย *Gomphrena globosa* L.

Family Chenopodiaceae

- *Chenopodium amaranticolor*
- *C. quinoa*

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง


3.1.5 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตพืชปลอดโรคโดยใช้ความร้อน

- ท่อนพันธุ์ของ พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
- water bath
- นาฬิกาจับเวลา
- อ่างน้ำเย็น
- กะบะเพาะชำสำหรับปักชำพืช
- ดินใช้สำหรับการปลูกพืช

*หมายเหตุ การเตรียมสารเคมีชนิดต่างๆอยู่ในภาคผนวก

## 3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การสำรวจลักษณะและอาการ

การสำรวจลักษณะและอาการ ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และ ราชินีสีทอง ในแต่ละช่วงเวลาของปี 2543-2544 ที่ตลาดต้นไม้สวนจตุจักร โดยทำการเลือกต้นที่แสดงอาการคล้ายการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส แล้วนำมาเปลี่ยนกระถางเพาะเลี้ยงไว้ในเรือนทดลองไว้ในเรือนทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร ทำการเพาะเลี้ยง สังเกตอาการที่เกิดขึ้นในฤดูต่างๆ บันทึกอาการ

3.2.2 ตรวจสอบลักษณะของอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำการตรวจสอบโดยการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี Leaf Dip

โดยนำใบพลูฉลุที่แสดงอาการชัดเจนไปบดใน phosphate buffer pH 7.4 โดยใช้อัตราส่วน 1:10 (w / v) บดพอประมาณไม่ต้องละเอียดมากเพราะจะทำให้เศษพืชออกมามาก หลังจากนั้นนำน้ำคั้นพืช ไปหยดใน plate ที่มีพาราฟิล์มรองพื้น แล้วนำกริดที่เคลือบด้วยฟอร์มวาและคาร์บอนวางบนหยดน้ำคั้นพืช โดยนำด้านที่มีคาร์บอนเคลือบวางลงทิ้งไว้ 10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซับน้ำออกเบาๆโดยใช้กระดาษกรองซับที่ขอบกริด หลังจากนั้นย้อมสีด้วยสารละลาย uranyl acetate (UA) 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง แล้วนำกริดไปตรวจดูอนุภาคของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืช ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

47701

3.2.3 วิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

การตรวจสอบพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองด้วยวิธี ELISA แบ่งการตรวจสอบเป็น 3 ระยะเพื่อศึกษาปริมาณของเชื้อในระยะต่างๆ โดยระยะที่หนึ่งทำการตรวจสอบเดือนมิถุนายน ระยะที่สองเดือนกันยายน และระยะที่สามเดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2543 ทำการสุ่มพืช (พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง) ที่แสดงอาการของโรคที่ค่อนข้างชัดเจนมาทำการตรวจสอบ

ขั้นตอนและวิธีการในการตรวจสอบเชื้อไวรัส การตรวจสอบโดยวิธี Indirect ELISA มีขั้นตอนดังนี้

- วางแผนการทดลองเพื่อตรวจสอบตัวอย่าง ลงบนตารางตรวจสอบและหลุมเปรียบเทียบ ตามความเหมาะสม
- บดตัวอย่างพืชที่ต้องการตรวจสอบ โดยนำตัวอย่างใส่โกร่งบด โกร่งละ 1 ตัวอย่าง จากนั้นหยด coating buffer ลงในโกร่ง ให้ได้ความเข้มข้น 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ( w / v) หยดตัวอย่างตามแผนที่ออกแบบเอาไว้
- หยดน้ำคั้นตัวอย่างพืชทดสอบที่บดใน coating buffer ลงใน plate ปริมาณ 100 µl ต่อหลุม ควรระวังการปนเปื้อนในหลุมอื่นๆ ที่อยู่ใน ELISA plate
- นำ plate ใส่ในถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิทแล้ววางบนพื้นเรียบ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน เมื่อครบกำหนดเวลาในการบ่ม ELISA plate เทน้ำคั้นของพืชทิ้งโดยสะบัด plate แรงๆ เพื่อให้น้ำคั้นออกจากหลุม
- ล้าง ELISA plate ด้วย PBS - Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที โดยหยด PBS - Tween ลงในหลุม ควรระหว่างการปนเปื้อนระหว่างหลุม
- วาง ELISA plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาทีเป็นการล้างครั้งที่ 1 ทำการล้างเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง
- เมื่อล้างครบ 3 ครั้ง คว่ำ plate โดยตบแรงๆบนกระดาษซับหรือผ้าที่สะอาด
- หยด antiserum 1:50 ของ DMV และ antiserum 1:200 ของ CMV ลงใน ELISA plate ตามแผนที่วางไว้
- จากนั้นนำ ELISA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 ° C ข้ามคืนโดยเก็บไว้ในตู้เย็น
- ทำการล้าง ELISA plate ด้วย PBS -Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ตามวิธีการล้างเหมือนครั้งแรก เป็นการล้างครั้งที่ 2

- หยด anti-Goat IgG (แอนติบอดีของแพะผลิตในกระต่าย) หลุมละ 100 µl ที่ conjugate ไว้ด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่ dilute ใน conjugate buffer (ความเข้มข้น 1:2,000 โดยเก็บไว้ใช้ต่อเนื่องได้ 3 ครั้ง)
- นำ ELISA plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืนโดยเก็บไว้ในตู้เย็น ดูด anti-Goat IgG เก็บเข้าตู้เย็นเพื่อเก็บใช้ในครั้งต่อไป
- ล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที คว่ำ plate โดยตบแรงๆ บนกระดาษซับหรือผ้า
- นำ p - nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 5 mg / 10 ml ( 2 เม็ด / 1 plate ) ละลายใน substrate buffer แล้ว หยด substrate ลงใน ELISA plate หลุมละ 100 µl ทำการตรวจผล ปฏิกิริยาหลังจากทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้สีของปฏิกิริยาชัดเจนยิ่งขึ้น
- การตรวจสอบปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น มีข้อสังเกตดังนี้ คือ เห็นสีเหลืองซึ่งแสดงว่าหลุมที่หยดตัวอย่างเป็นโรคไวรัส และสำหรับหลุมเปรียบเทียบ (disease control) จะต้องมีปฏิกิริยาเกิดสีเหลืองเสมอ

  ระดับของปฏิกิริยาสีเหลืองที่เกิดขึ้นแบ่งเป็น 5 ระดับสี ดังนี้

  0 = ไม่เกิดสีเหลือง แสดงว่าไม่มีเชื้อไวรัส

  1 = เกิดสีเหลืองอ่อนมาก แสดงว่ามีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำมาก

  2 = เกิดสีเหลืองอ่อน แสดงว่ามีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำ

  3 = เกิดสีเหลืองปานกลาง แสดงว่ามีเชื้อไวรัสในปริมาณที่ปานกลาง

  4 = เกิดสีเหลืองเข้ม แสดงว่ามีเชื้อไวรัสในปริมาณที่สูง

3.2.4 การตรวจสอบพืชอาศัยของเชื้อไวรัส ที่เข้าทำลายพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ทำการปลูกต้นพืชชนิดต่างๆ เตรียมไว้ เพื่อนำไปใช้ในระยะ (stage) ที่เหมาะสมของพืชแต่ละชนิด ในการถ่ายทอดเชื้อ (inoculate) ผ่านทางน้ำคั้นพืช ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3.1

การถ่ายทอดเชื้อ ต้องคลุมพืชอาศัยที่ต้องการจะถ่ายทอดเชื้อ ด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ก่อนเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อทำให้พืชอ่อนแอลงและง่ายต่อการติดเชื้อ จากนั้นนำใบพืชที่แสดงอาการของโรคชัดเจนแต่ละชนิด (พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และ ราชินีสีทอง) มาบดกับ potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M (pH 7.5) และ sodium citrate buffer ความเข้มข้น 0.1 M (pH6.5) เพื่อเปรียบเทียบ buffer ที่เหมาะสมและสามารถถ่ายทอดเชื้อได้ ในอัตราส่วน 1:4 (w/v) ให้ละเอียดและแยกเศษพืชออก ใส่ celite 545 ในอัตราส่วน 2 % ต่อปริมาตร นำน้ำคั้นพืชแต่ละชนิดที่ได้ ไปทาบนใบพืชที่ต้องการจะถ่ายทอดเชื้อลง โดยใช้มือทาต้องระวังการปนเปื้อนระหว่างพืช และพืชอาศัยแต่ละชนิดนำต้นพืชที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อเสร็จแล้วไปล้างน้ำโดย

การสลัดน้ำใส่เพียงเล็กน้อย เพื่อเป็นการล้างสารพิษบางอย่างออกไป ปัก label นำต้นพืชที่ผ่านการล้างน้ำแล้วใช้กระดาษหนังสือพิมพ์ชุบน้ำหมาดๆคลุม 1 คืน แล้วนำกระดาษหนังสือพิมพ์ออกในวันต่อมา สังเกตอาการที่เกิดขึ้นภายใน 7-14 วัน บันทึกอาการ

**ตารางที่**3.1 แสดงพืชอาศัยที่ใช้ในการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง

| วงศ์ | ชื่อวิทยาศาสตร์ | ระยะที่เหมาะสมในการถ่ายทอดเชื้อ |
|---|---|---|
| Solanaceae | *Nicotiana glutinosa* (ยาสูบใบเล็ก) | ใบแท้ 4-5 ใบ |
| | *N. tabacum* (ยาสูบใบใหญ่) | ใบแท้ 4-5 ใบ |
| | *Datura stramonium* (ลำโพง) | ใบแท้ 4-5 ใบ |
| Leguminosae | *Glycine max* (L.) Merr. (ถั่วเหลือง) | ใบแท้คู่แรก |
| | *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek (ถั่วเขียว) | ใบแท้คู่แรก |
| | *Phaseolus coccineus* L. (ถั่วแดง ) | ใบแท้คู่แรก |
| Cucurbitaceae | *Cucumis sativas* L.(แตงกวา) | ใบเลี้ยง |
| | *Cucurbita moschata* (ฟักทอง) | ใบเลี้ยง |
| Amaranthaceae | *Gomphrena globosa* L. (บานไม่รู้โรย) | ใบแท้คู่แรก |
| Chenopodiaceae | *Chenopodium amaranticolor* | ใบแท้4-5 ใบ |
| | *C. quinoa* | ใบแท้4-5 ใบ |

3.2.5.การผลิตพืชปลอดจากเชื้อไวรัสโดยการใช้ความร้อน (heat treatment)

3.2.5.1 การให้ความร้อนแบบแห้ง (dry heat treatment)

ปักชำพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ลงในกะบะเพาะชำจนกระทั่งมีใบอ่องอกออกมา นำต้นพืชแต่ละชนิด ที่ปักชำในกะบะจำนวนอย่างละ 20 ต้น เข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37.5, 40 และ 42.5 °C บันทึกลักษณะอาการ และ หาอัตราการรอดชีวิตของพืช ทั้ง 4 ชนิดที่อุณหภูมิต่างๆ เพื่อหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับพืชแต่ละชนิด นำต้นพืชที่รอดชีวิตไปเลี้ยงที่สภาวะปกติ เพื่อปรับสภาพและฟื้นฟูต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง เป็นเวลา 3 เดือนนำต้นพืชไปตรวจสอบหาพืชปลอดจากเชื้อไวรัสด้วยวิธี direct ELISA

3.2.5.2 การให้ความร้อนแบบชื้น (moist heat treatment)

นำต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง มาตัดใบออกและตัดเป็นท่อนขนาด 1.5 นิ้ว โดยในแต่ละท่อนจะต้องมีตาข้างติดอยู่ด้วย ใช้ท่อนพืชแต่ละชนิด ชนิดละ 20 ท่อน ในแต่ละช่วงอุณหภูมิ นำท่อนพันธุ์ของพืชแต่ละชนิด ไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 °C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที บันทึกลักษณะอาการของพืชแต่ละชนิดหลังจากการผ่านความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ นำพืชแต่ละชนิดที่ผ่านความร้อนแล้ว ไปปักชำในสภาวะปกติจนกระทั่งมีการงอกของใบอ่อน (ใช้เวลา 2 เดือน) ศึกษาช่วงอุณหภูมิที่มีแนวโน้มเหมาะสมที่จะสามารถทำให้ผลิตพืชปลอดจากเชื้อไวรัสได้ และอัตราการรอดชีวิตของพืชแต่ละชนิด เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำการทดลองต่อไป นำต้นพืชที่รอดชีวิตในแต่ละอุณหภูมิ ไปตรวจสอบหาช่วงอุณหภูมิที่สามารถทำพืชปลอดเชื้อไวรัส และต้นพืชยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยใช้วิธี direct ELISA

การผลิตท่อนพันธุ์ปลอดเชื้อ เมื่อทราบช่วงอุณหภูมิที่มีแนวโน้มจะสามารถทำให้พืชแต่ละชนิดปลอดเชื้อได้และต้นยังสามารถมีชีวิตรอดได้ ทำการทดลองซ้ำในช่วงอุณหภูมินั้นๆโดยเพิ่มปริมาณของท่อนพันธุ์พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ในการทดลองให้มากขึ้น และเพิ่มเวลาในการแช่น้ำร้อนในอุณหภูมิที่อุณหภูมิดังกล่าว จาก 5 นาทีเป็น 10 นาที นำท่อนพันธุ์ที่ผ่านการแช่ในน้ำร้อนไปปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน นำต้นพืชที่ได้ไปตรวจสอบหาเชื้อไวรัสด้วยวิธี direct ELISA อีกครั้ง จากนั้นนำต้นพืชที่ปลอดเชื้อเลี้ยงต่อในสภาพธรรมชาติเป็นเวลา 3 เดือน เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสซ้ำอีกครั้งด้วยวิธี direct ELISA

3.2.5.3 การตรวจสอบโดยวิธี direct ELISA มีขั้นตอนดังนี้

- วางแผนการทดลองเพื่อตรวจสอบตัวอย่าง ลงบนตารางตรวจสอบและหลุมเปรียบเทียบ ตามความเหมาะสม
- หยด antiserum ของเชื้อ DMV ที่ละลายกับ coating buffer อัตราส่วน 1:200 ลงใน ELISA plate ตามแผนที่วางไว้
- นำ ELISA plate ใส่ในถุงพลาสติกปิดปากถุงให้สนิทแล้ววางบนพื้นเรียบ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืน
- เมื่อครบกำหนดเวลาในการบ่ม ELISA plate แล้วล้าง ELISA plate ด้วย PBS - Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที โดย
- สะบัด ELISA plate แรงๆ เพื่อให้ antiserum ของเชื้อ DMV ส่วนเกินที่ไม่ได้เกาะติดอยู่กับ ELISA plate ออกจากหลุม
- หยด PBS ผสม Tween ลงในหลุม ควรระหว่างการปนเปื้อนระหว่างหลุมใน ELISA plate
- วาง ELISA plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาทีเป็นการล้างครั้งที่ 1 ทำการล้างเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง
- บดตัวอย่างพืชที่ต้องการตรวจสอบ โดยนำตัวอย่างใส่โกร่งบด จำนวน 1 ตัวอย่างต่อ โกร่ง จากนั้นหยด extraction buffer ลงในโกร่ง ให้ได้ความเข้มข้น 1:10 ( w /v) หยดตัวอย่างตามแผนที่ออกแบบเอาไว้
- หยดน้ำคั้นตัวอย่างพืชทดสอบที่บดใน extraction buffer ลงใน plate ปริมาณ 100 µl ต่อหลุม ควรระวังการปนเปื้อนระหว่างหลุมภายใน ELISA plate จากนั้นนำ ELISA plate ไปบ่มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C
- ทำการล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เหมือนกับการล้างครั้งที่ 1 เป็นการล้างครั้งที่ 2
- หยด anti-Goat IgG (แอนติบอดีของแพะผลิตในกระต่าย) หลุมละ 100 µl ที่ conjugate ไว้ด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ที่ dilute ใน conjugate buffer (ความเข้มข้น 1:2000 โดยเก็บไว้ใช้ต่อเนื่องได้ 3 ครั้ง)
- นำ ELISA plate ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ข้ามคืนโดยเก็บไว้ในตู้เย็น
- ดูด Anti-Goat IgG เก็บเข้าตู้เย็นเพื่อเก็บใช้ในครั้งต่อไป
- ล้าง ELISA plate ด้วย PBS-Tween 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เมื่อล้างครบ 3 ครั้งแล้วคว่ำ plate โดยตบแรงๆบนกระดาษซับหรือผ้าที่สะอาด

- นำ p-nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 5 mg / 10 ml ( 2 เม็ด / 1 plate ) ละลายใน substrate buffer แล้ว หยด substrate ลงใน ELISA plate หลุมละ 100 µl ทำการตรวจผลปฏิกิริยาหลังจากทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมง เพื่อรอให้ปฏิกิริยาเกิดสีเหลืองชัดเจนยิ่งขึ้น
- การตรวจสอบปฏิกิริยามีข้อสังเกตดังนี้คือ เห็นสีเหลืองชัดเจนซึ่งแสดงว่าหลุมที่หยดตัวอย่างมีโรคไวรัสและสำหรับหลุมเปรียบเทียบ (disease control) จะต้องเกิดปฏิกิริยาเห็นสีเหลืองเสมอ

ระดับปฏิกิริยาสีเหลืองที่เกิดขึ้นแบ่งเป็น 5 ระดับสี ดังนี้

0 = ไม่เกิดสีเหลือง แสดงว่าไม่มีเชื้อไวรัส

1 = เกิดสีเหลืองอ่อนมาก แสดงว่ามีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำมาก

2 = เกิดสีเหลืองอ่อน แสดงว่ามีปริมาณเชื้อไวรัสต่ำ

3 = เกิดสีเหลืองปานกลาง แสดงว่ามีเชื้อไวรัสในปริมาณที่ปานกลาง

4 = เกิดสีเหลืองเข้ม แสดงว่ามีเชื้อไวรัสในปริมาณที่สูง

## 3.3 สถานที่ทำการทดลอง

3.3.1 ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีเจ้าพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3.2 โรงเรือนเพาะเลี้ยงของภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3.3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และปฏิบัติการกลาง สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## 3.4 ระยะเวลาในการทดลอง

การสำรวจและทดลองเริ่มปี พ.ศ.2543 สิ้นสุดปี พ.ศ. 2545

# บทที่ 4
# ผลการทดลอง

## 4.1 การสำรวจลักษณะอาการของโรค

การสำรวจลักษณะอาการของโรค ที่เกิดจากเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายใน พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ตลาดนัดต้นไม้สวนจตุจักร ในปี พ.ศ. 2543 -2544 ในแต่ละช่วงเวลาต่างๆ โดยสังเกตอาการที่พบในพลูฉลุ จะพบอาการใบหยิกและม้วนงอคล้ายเชือกผูกรองเท้าเป็นจำนวนมาก พร้อมกับมีอาการด่างขาวกระจายอยู่ตามใบร่วมด้วยเล็กน้อย แต่เมื่อนำต้นลักษณะอาการดังกล่าวมาเลี้ยงในโรงเรือน อาการใบหยิกและม้วนงอของใบเริ่มคลี่ออก แต่อาการด่างขาวตามใบยังปรากฏอยู่ อาการด่างจะพบในใบอ่อนมากกว่าใบแก่ และใบอ่อนจะแสดงอาการด่างขาวอย่างชัดเจนกระจายอยู่ทั่วทั้งใบของพืชมีขอบเขตไม่แน่นอน ในการไปสำรวจในระยะต่อมาจะพบว่า อาการของพลูฉลุจะมีอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสมีหลายๆอาการ แตกต่างกันไปในแต่ละต้น และในแต่ละสวนก็จะมีอาการที่แตกต่างกันไป เช่น แสดงอาการใบหยิกงอ ใบหยิกงอร่วมกับอาการด่างขาวกระจายอยู่ตามใบขอบเขตไม่แน่นอน อาการใบหยิกงอร่วมกับอาการด่างและต้นแคระแกรน, ใบด่างและรูปร่างของใบเรียวยาวผิดปกติ (ภาพที่ 4.1) ส่วนในพลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองในการสำรวจระยะแรก พบอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสไม่ชัดเจนนัก พบเพียงต้นที่แสดงอาการแคระแกรน ส่วนอาการด่างสังเกตได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากธรรมชาติของพืชดังกล่าวมีลักษณะด่างอยู่แล้ว แต่เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในโรงเรือนและไปสำรวจในช่วงเวลาต่อมา จะพบต้นพลูด่างที่ยังแสดงอาการแคระแกรนและ อาการด่างเขียวเข้มสลับกับเขียวอ่อนกระจายอยู่ตามใบขอบเขตไม่แน่นอน ใบเปลี่ยนรูปไปจากเดิม (ภาพที่ 4.2) ราชินีหินอ่อน พบอาการต้นแคระแกรนใบมีขนาดเล็ก ใบเปลี่ยนรูปไปจากเดิมโดยใบเรียวยาวผิดปกติ ใบเป็นคลื่นและงอเล็กน้อย (ภาพที่ 4.3) และในราชินีสีทอง พบต้นแคระแกรนใบมีขนาดเล็ก ใบด่างขาวกระจายอยู่ตามใบมีขอบเขตไม่แน่นอน ใบเปลี่ยนรูปไปจากเดิมและเป็นคลื่น (ภาพที่ 4.4) อาการด่างที่กระจายอยู่ตามใบจะสังเกตได้ง่ายขึ้นถ้าอากาศหนาวเย็น จากการสำรวจโรคในตลาดจตุจักร และการนำพืชมาเพาะเลี้ยงในโรงเรือน พบว่าพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองในฤดูหนาวอากาศหนาวเย็น จะแสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายอย่างชัดเจนมากกว่า ในฤดูร้อนและในฤดูฝน โดยเฉพาะในพลูฉลุจะสังเกตเห็นได้ค่อนข้างชัดเจน ( ภาพที่ 4.5)

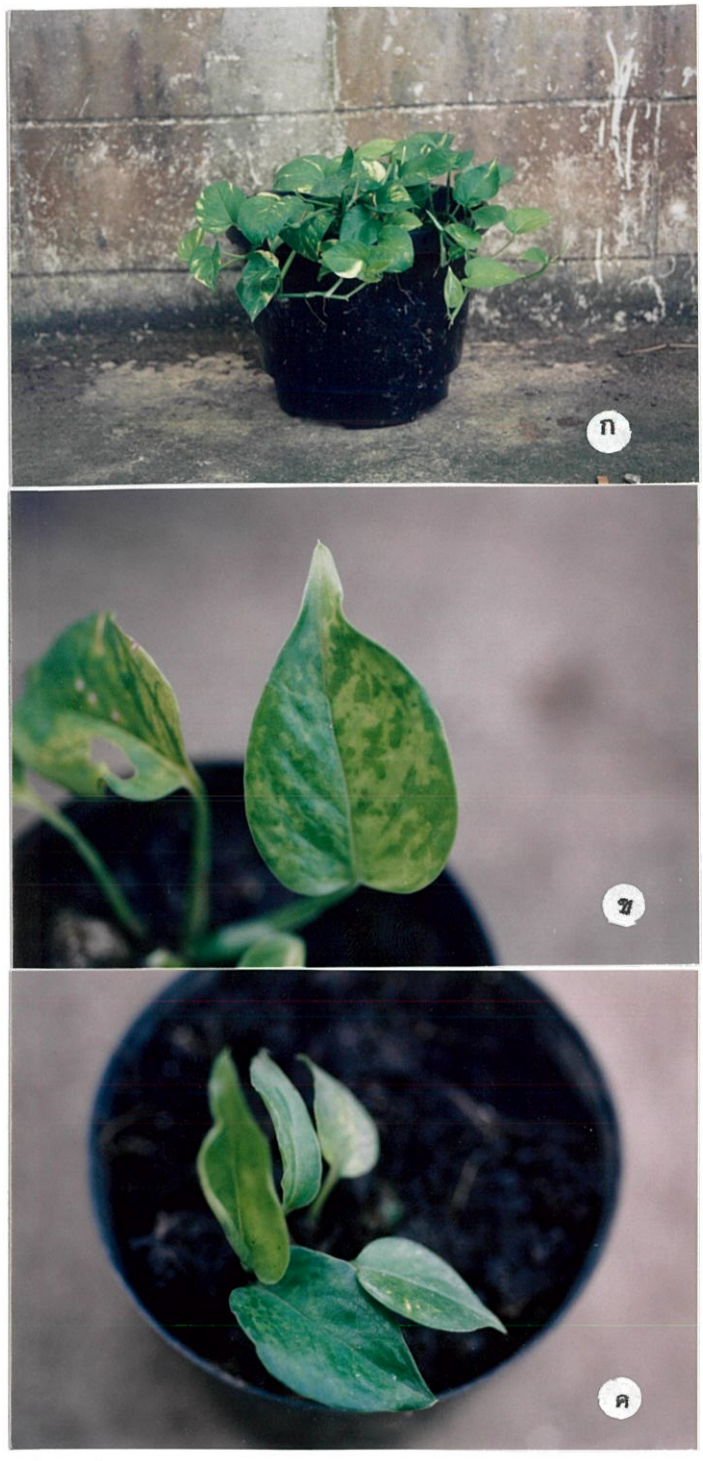
**ภาพที่4.1** แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของต้นพลูฉลุปกติ กับที่ต้นพลูฉลุที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ก. พลูฉลุที่ไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ข. พลูฉลุแสดงอาการใบด่างขาวกระจายอยู่บนใบขอบเขตไม่แน่นอน เนื่องจากถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ค. พลูฉลุแสดงอาการใบหยิกงอร่วมกับอาการด่างและต้นแคระแกรน เนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ง. พลูฉลุแสดงอาการใบด่างขาวกระจายอยู่ตามใบ และรูปร่างของใบเรียวยาวผิดปกติ เนื่องจากถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

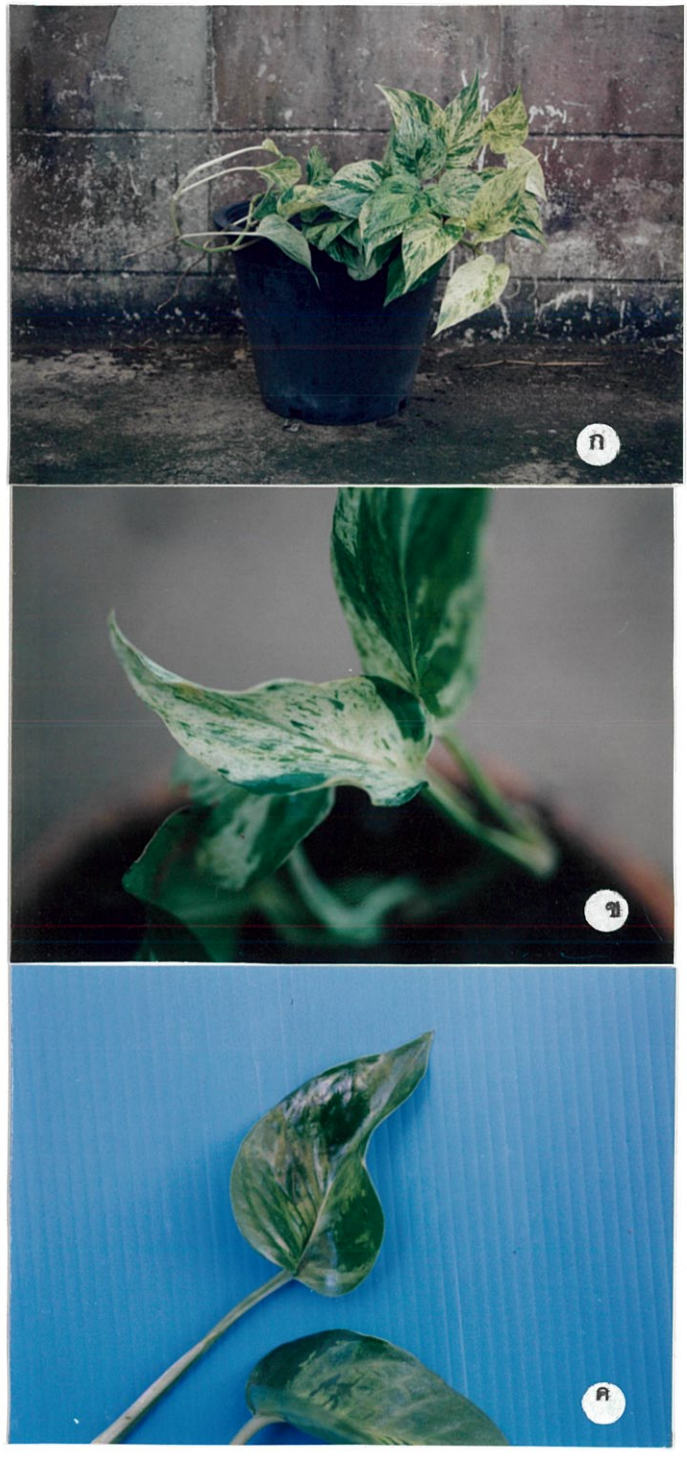



**ภาพที่4.2** แสดงการเปรียบเทียบลักษณะอาการของ ต้นพลูด่างปกติกับต้นพลูด่างที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ก. ต้นพลูด่างที่ไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ข. ต้นพลูด่างแสดงอาการ ใบด่างเขียวเข้มสลับกับสีเขียวอ่อนกระจายอยู่บน (ใบอ่อน) ขอบเขตไม่แน่นอนเนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ค. ต้นพลูด่างที่แสดงอาการ ใบบิดงอเปลี่ยนรูปไปจากเดิมใบเรียวยาว เนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย




**ภาพที่**4.3 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะอาการของต้นราชินีหินอ่อนปกติ กับต้นราชินีหินอ่อนที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ก. ราชินีหินอ่อนที่ไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ข. ราชินีหินอ่อนแสดงอาการใบเปลี่ยนรูปเรียวยาวผิดปกติ ใบเป็นคลื่นและงอ

ค. ราชินีหินอ่อนแสดงอาการด่างเขียวเข้มร่วมกับใบเปลี่ยนรูปเรียวยาวผิดปกติ ใบเป็นคลื่นและ งอเล็กน้อย

**ภาพที่**4.4 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะอาการของต้นราชินีสีทองปกติ กับต้นราชินีสีทองที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

ก. ราชินีสีทองที่ไม่แสดงอาการการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส

ข. ราชินีสีทองแสดงอาการใบด่างขาวกระจายอยู่บนใบอ่อน มีขอบเขตไม่แน่นอน เมื่อเปรียบเทียบกับใบปกติ

ค. ราชินีสีทองแสดงอาการใบเปลี่ยนรูปไปจากเดิมเป็นคลื่นร่วมกับอาการงอเล็กน้อย

ง. ราชินีสีทองแสดงอาการใบหยิกงอ ขนาดใบเล็กลงขอบใบเป็นคลื่น

**ภาพที่4.5** แสดงการเปรียบเทียบลักษณะอาการของต้นพลูฉลุในฤดูกาลต่างๆ

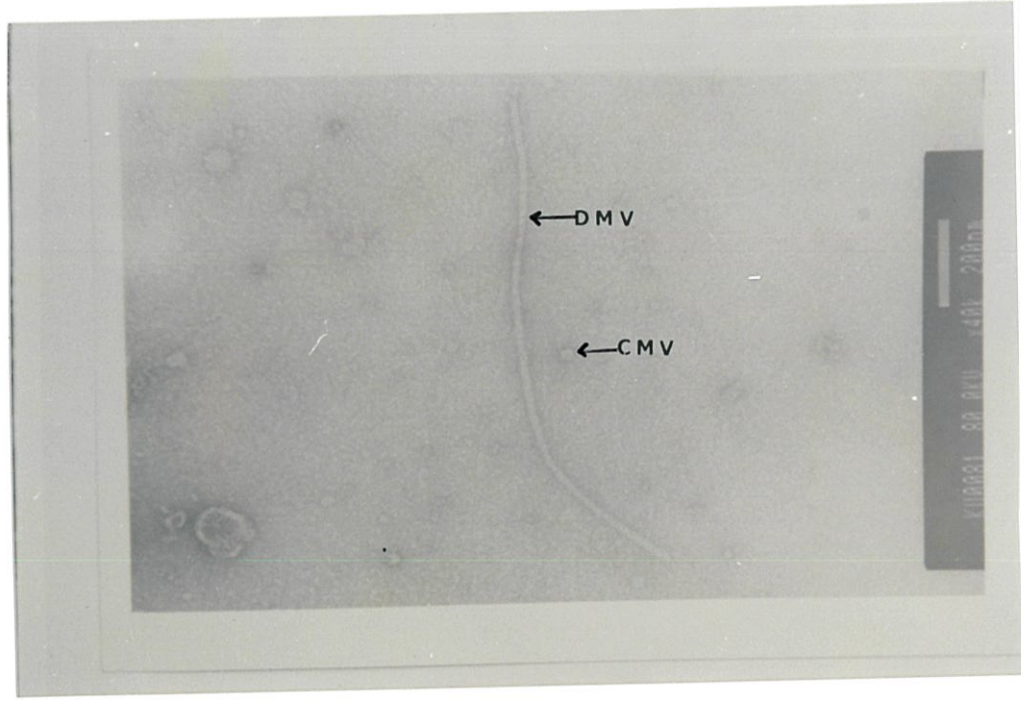
ก. พลูฉลุที่แสดงอาการด่างขาวกระจายอยู่ตามใบอ่อนขอบเขตไม่แน่นอน ที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายในฤดูร้อน (อุณหภูมิเฉลี่ย 29.6°C)

ข. พลูฉลุที่แสดงอาการด่างขาวกระจายอยู่ตามใบอ่อนขอบเขตไม่แน่นอนที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายในฤดูฝน (อุณหภูมิเฉลี่ย 28.8°C)

ค. พลูฉลุที่แสดงอาการใบหยิกและม้วนงอ ใบด่างขาวกระจายอยู่บนใบขอบเขตไม่แน่นอน และใบเปลี่ยนรูปเรียวยาวผิดปกติและมีอาการด่างร่วมด้วย ที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายในฤดูหนาว(อุณหภูมิเฉลี่ย 27.4°C)

## 4.2 การตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัส

การตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายต้นพลูฉลุ โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การตรวจสอบด้วยวิธี Leaf Dip พบว่ามีการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ เชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) ซึ่งอนุภาคมีลักษณะเป็นเส้นยาว คดงอคล้ายเส้นด้าย (flexuous rod) ขนาดของอนุภาคยาวประมาณ 750 นาโนเมตร และเชื้อ cucumber mosaic virus ( CMV) ซึ่งอนุภาคมีลักษณะทรงกลม (isometric) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 นาโนเมตร แต่พบอนุภาคของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดในปริมาณที่น้อยมาก ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4.6




**ภาพที่**4.6 แสดงรูปร่างลักษณะของอนุภาคเชื้อ Dasheen mosaic virus อนุภาคเป็นเส้นยาวคดงอคล้ายเส้นด้าย (flexuous rod) และ Cucumber mosaic virus อนุภาคเป็นทรงกลม (isometric) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 40 เท่า โดยใช้วิธี Leaf- dip

## 4.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี indirect ELISA

พบว่า พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ทำการสุ่มต้นที่แสดงอาการของโรค ชัดเจนมาตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA ในแต่ละต้นจะมีการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัส 2 ชนิดคือเชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) และ เชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) อยู่ร่วมกัน ในการตรวจสอบใช้ antiserum ของ DMV ที่มี titer 1:32 ซึ่งเจือจางใน conjugate buffer ในอัตราส่วน 1: 50 และ antiserum ของ CMV ที่มี titer 1:256 เจือจาง ใน conjugate buffer ในอัตราส่วน 1:200 และใช้น้ำคั้นพืชของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1:10 , 1:100 ,1:1,000 ที่ เจือจางใน coating buffer ซึ่งระดับผลของปฏิกิริยาที่อ่านได้ของเชื้อ DMV โดยใช้น้ำคั้นของใบพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน การตรวจสอบ 3 ช่วงระยะเวลา (ตารางที่ 4.1) ให้ผลดังนี้

**ระยะที่1** เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2543 เชื้อ DMV ที่ใช้น้ำคั้นของใบพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ผลของระดับปฏิกิริยาที่อ่านได้ในระดับ 3 และ 4 คือเห็นสีเหลืองปานกลางและสีเหลืองเข้ม แสดงให้เห็นถึงปริมาณของเชื้อที่อยู่ในพืชทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณค่อนข้างสูง ค่าเฉลี่ยของระดับปฏิกิริยาสีที่อ่านได้เท่ากับ 3.50 ส่วนในเชื้อ CMV ใช้น้ำคั้นของใบพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ในความเข้มข้นที่ต่างๆอ่านผลได้ในระดับที่ 1 และ 2 โดยจะเกิดปฏิกิริยาแสดงสีเหลืองอ่อนมากและสีเหลืองอ่อน มีค่าเฉลี่ยของระดับปฏิกิริยาสีที่อ่านได้เท่ากับ 2.00 เมื่อทำการตรวจสอบในเวลาต่อมา

**ระยะที่2** เดือนกันยายน พ.ศ. 2543 ห่างจากระยะที่1 ประมาณ 3 เดือนในการอ่านผลของเชื้อ DMV อ่านผลได้ในระดับที่ 3 และ 4 คือเกิดปฏิกิริยาแสดงสีเหลืองปานกลางและสีเหลืองเข้ม ในต้นที่ทำการสุ่มตรวจสอบเป็นส่วนมาก มีค่าเฉลี่ยของระดับปฏิกิริยาสีที่อ่านได้เท่ากับ 3.70 ในเชื้อCMV ก็จะอ่านผลได้ในระดับที่ 3 ในต้นเดียวกับที่อ่านผลของเชื้อ DMV ที่อ่านผลได้ในระดับที่ 4 และอ่านผลได้ในระดับที่2 ในต้นเดียวกับเชื้อ DMV ที่อ่านผลได้ในระดับที่ 3 มีค่าเฉลี่ยของระดับปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ของเชื้อ CMV เท่ากับ 2.70

**ระยะที่3** เดือนธันวาคม พ.ศ. 2543 ที่ทำการตรวจสอบห่างจากระยะที่ 2 ประมาณ 3 เดือน ทำการวางแผนการตรวจสอบตัวอย่างตาม ภาพที่4.7 และ4.9 เชื้อทั้ง 2 ชนิดอ่านผลได้ในระดับที่ 4 คือปฏิกิริยาแสดงสีเหลืองเข้ม (ภาพที่ 4.8 และ 4.10) ซึ่งในการตรวจสอบทั้ง 3 ระยะแสดงให้เห็นว่าอนุภาคของเชื้อมีปริมาณที่มาก เนื่องจากใช้ความเข้มข้นที่ต่ำ (1:1,000) ยังสามารถอ่านผลได้เท่ากับในระดับความเข้มข้นที่สูง (1:10) และในระยะที่3 เชื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณความเข้มข้นที่สูงเท่ากัน ในการทดลองจะเห็นได้ว่าเชื้อ DMV และ CMV ที่เข้าทำลายพลูทั้ง 4 ชนิด ต่างมีปริมาณของเชื้อสูงขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละระยะเวลาที่ทำการตรวจสอบ จากการตรวจสอบใน 3 ระยะพบว่า เชื้อ DMV ที่อยู่ในพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง มีปริมาณ

ค่อนข้างสูงทั้ง 3 ระยะ และเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ทุกระยะแต่ค่าเฉลี่ยของระดับสีของปฏิกิริยาที่อ่านได้ไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนในเชื้อ CMV ในระยะที่ 1 (เดือนมิถุนายน) ปริมาณของเชื้อค่อนข้างน้อย เพิ่มขึ้นในระยะที่ 2 (เดือนกันยายน) และเพิ่มสูงมากในระยะที่ 3 (เดือนธันวาคม) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.2

**ตารางที่4.1** แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับสีของปฏิกิริยาที่อ่านได้ในพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำคั้นพืช 1:10, 1:100 และ 1:1,000ของเชื้อ DMV และ CMV ใน 3 ระยะ ที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA

| ชื่อพืช | เดือนที่ทำการตรวจสอบ | จำนวนซ้ำ | ค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยารวมทั้งสามความเข้มข้นของเชื้อ DMV | ค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยารวมทั้งสามความเข้มข้นของเชื้อ CMV |
|---|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | มิถุนายน | 12 | 4.00 | 2.00 |
| | กันยายน | 15 | 3.80 | 2.80 |
| | ธันวาคม | 15 | 4.00 | 4.00 |
| พลูด่าง | มิถุนายน | 12 | 3.25 | 2.00 |
| | กันยายน | 15 | 3.60 | 2.60 |
| | ธันวาคม | 15 | 4.00 | 4.00 |
| ราชินีหินอ่อน | มิถุนายน | 12 | 3.25 | 2.00 |
| | กันยายน | 15 | 3.60 | 2.60 |
| | ธันวาคม | 15 | 4.00 | 4.00 |
| ราชินีสีทอง | มิถุนายน | 12 | 3.50 | 2.00 |
| | กันยายน | 15 | 3.80 | 2.80 |
| | ธันวาคม | 15 | 4.00 | 4.00 |

* **หมายเหตุ** จากข้อมูลในตารางภาคผนวกที่ ข1

**ตารางที่**4.2 แสดงผลของค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาที่อ่านได้ของพืชทั้ง 4 ชนิด (พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง) ใน 3 ระยะเวลาที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี indirect ELISA

| เดือนที่ทำการตรวจสอบ | ค่าเฉลี่ยของระดับสีที่อ่านได้จากพืช 4 ชนิด ของเชื้อ DMV | ค่าเฉลี่ยของระดับสีที่อ่านได้จากพืช 4 ชนิด ของเชื้อ CMV |
|---|---|---|
| มิถุนายน | 3.50 | 2.00 |
| กันยายน | 3.70 | 2.70 |
| ธันวาคม | 4.00 | 4.00 |

* **หมายเหตุ** จากข้อมูลจากตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ ในพืชทั้ง 4 ชนิดใน

| | | *1 | *2 | *3 | *4 | *5 | **1 | **2 | **3 | **4 | **5 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B | Disease Control DMV 1:50 | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | - |
| C | | b | b | b | b | b | b | b | b | b | b | - |
| D | | c | c | c | c | c | c | c | c | c | c | - |
| E | Disease Control CMV 1:200 | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | - |
| F | | b | a | a | b | b | b | b | b | b | b | - |
| G | | c | a | a | c | c | c | c | c | c | c | - |
| H | | Substrate control | | | | | Enzyme control | | | | | - |
| | | | | | | | | | | | | |

**ภาพที่**4.7 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อ DMV และ CMVในต้นพลูฉลุ และต้นพลูด่าง โดยใช้ความเข้มข้น 1:10,1:100 และ 1:1,000 ที่เจือจางกับ coating buffer ในระยะการตรวจสอบที่ 3 เดือนธันวาคม

a แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:10

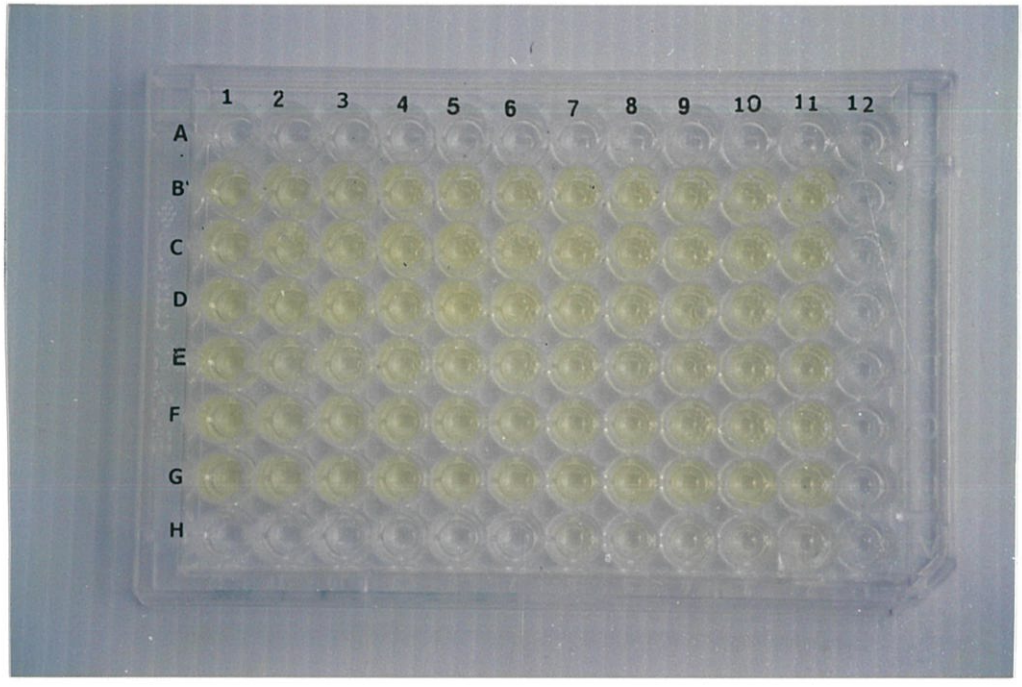
b แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:100

c แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:1,000

* แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นต้นพลูฉลุ ตัวเลขหมายถึงต้นที่ทำการตรวจสอบ

** แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นต้นพลูด่าง ตัวเลขหมายถึงต้นที่ทำการตรวจสอบ

- แสดงหลุมที่ไม่ได้หยอดสารละลายใดๆ




**ภาพที่**4.8 แสดงผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี Indirect ELISA ในระยะที่ 3 เดือนธันวาคมของต้นพลูฉลุและพลูด่าง

| | | *1 | *2 | *3 | *4 | *5 | **1 | **2 | **3 | **4 | **5 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| B | Disease Control DMV 1:50 | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | - |
| C | | b | b | b | b | b | b | b | b | b | b | - |
| D | | c | c | c | c | c | c | c | c | c | c | - |
| E | Disease Control CMV 1:200 | a | a | a | a | a | a | a | a | a | a | - |
| F | | b | a | a | b | b | b | b | b | b | b | - |
| G | | c | a | a | c | c | c | c | c | c | c | - |
| H | | Substrate control | | | | | Enzyme control | | | | | - |
| | | | | | | | | | | | | |

**ภาพที่**4.9 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อ DMV และ CMVในต้นราชินีหินอ่อน และต้นราชินีสีทอง โดยใช้ความเข้มข้น 1:10,1:100 และ 1:1,000 ที่เจือจางกับ coating buffer ในระยะการตรวจสอบที่ 3 เดือนธันวาคม

a แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:10

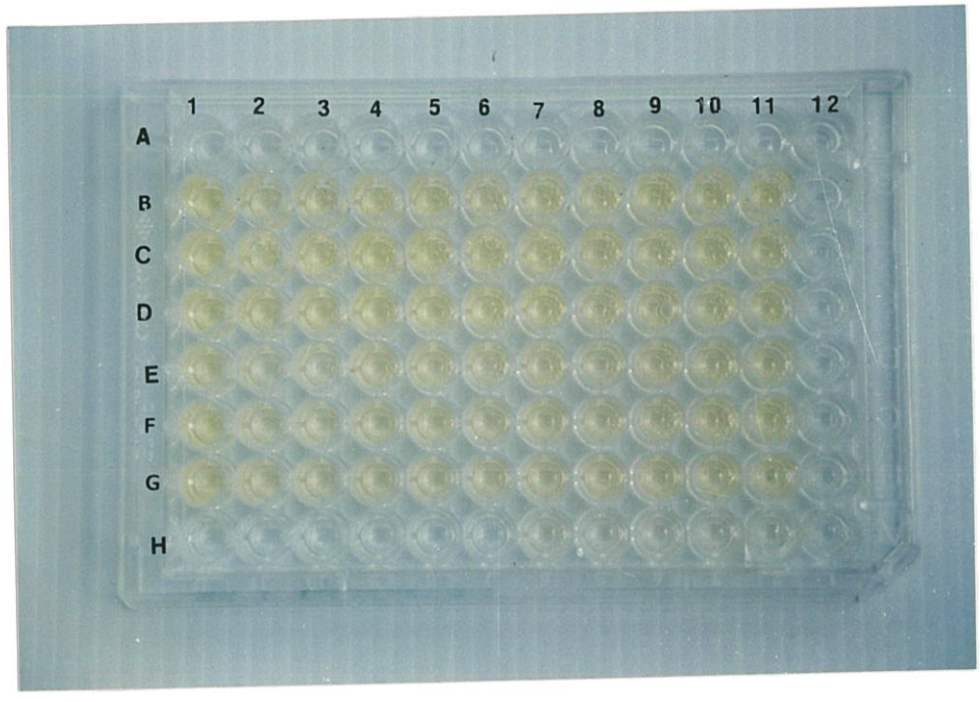
b แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:100

c แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นพืชที่เจือจาง 1:1000

* แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นต้นราชินีหินอ่อนตัวเลขหมายถึงต้นที่ทำการตรวจสอบ

** แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นต้นราชินีสีทอง ตัวเลขหมายถึงต้นที่ทำการตรวจสอบ

- แสดงหลุมที่ไม่ได้หยอดสารละลายใดๆ




**ภาพที่**4.10 แสดงผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี Indirect ELISA ในระยะที่ 3 เดือนธันวาคมของ ต้นราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง

## 4.4 การตรวจสอบพืชอาศัยของเชื้อ

โดยวิธีการถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นของพืชจาก พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชินีสีทองที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายไปยังพืชอาศัยชนิดต่างๆ ในวงศ์ Leguminosae, Cucurbitaceae Amaranthaceae, Chenopodiaceae และ Solanaceae และการเปรียบเทียบ buffer 2 ชนิด ( phosphase buffer pH 7.5 และ critrate buffer pH6.5 ) ที่ใช้ในการถ่ายทอดเชื้อ ผลปรากฏว่า

Family Leguminosae ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr.) ถั่วเขียว (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek) และถั่วแดง (*Phaseolus coccineus* L.) ไม่แสดงอาการของเชื้อ DMV และ CMV เมื่อทำการตรวจผลหลังจากทำการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 14 วัน

Family Cucurbitaceae แตงกวา ( *Cucumis sativas* L.) และ ฟักทอง (*Cucurbita moschata* ) ไม่แสดงอาการของเชื้อ DMV และ CMV เมื่อทำการตรวจผลหลังจากทำการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 14 วัน

Family Amaranthaceae บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa* L.) ไม่แสดงอาการของเชื้อ DMV และ CMV เมื่อทำการตรวจผลหลังจากทำการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 14 วัน

Family Chenopodiaceae *Chenopodium amaranticolor* และ *C. quinoa* ไม่แสดงอาการของเชื้อ DMV และ CMV เมื่อทำการตรวจผลหลังจากทำการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 14 วัน

Family Solanacea ยาสูบใบเล็ก (*Nicotiana glutinosa* ) ยาสูบใบใหญ่ (*N.tabacum* ) และลำโพง (*Datura stramonium*) ไม่แสดงอาการของเชื้อ DMV และ CMV เมื่อทำการตรวจผลหลังจากทำการถ่ายทอดเชื้อแล้ว 14 วัน ดังแสดงไว้ในตารางผลการทดลองที่ 4.3

**ตารางที่**4.3 แสดงผลการถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่อยู่ในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง โดยใช้พืชอาศัยและbuffer ที่แตกต่างกัน

| พืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย | พืชอาศัยที่ต้องการถ่ายทอดเชื้อ | อาการที่แสดงหลังจากที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อเป็นเวลา 14 วัน | |
|---|---|---|---|
| | | buffer ที่ใช้ในการถ่ายทอดเชื้อ | |
| | | potassium phosphate 0.1M (pH 7.5) | sodium citrate 0.1M (pH 6.5) |
| พลูฉลุ | ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ถั่วเขียว *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ถั่วแดง *Phaseolus coccineus* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | แตงกวา *Cucumis sativas* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ฟักทอง *Cucurbita moschata* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | บานไม่รู้โรย *Gomphrena globosa* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | *Chenopodium amaranticolor* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | *C. quinoa* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ยาสูบใบเล็ก *Nicotiana glutinosa* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ยาสูบใบใหญ่ *N. tabacum* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ลำโพง *Dutura stramonium* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| พลูด่าง | ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ถั่วเขียว *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ถั่วแดง *Phaseolus coccineus* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | แตงกวา *Cucumis sativas* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ฟักทอง *Cucurbita maschata* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | บานไม่รู้โรย *Gomphrena globosa* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | *Chenopodium amaranticolor* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | *C. quinoa* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ยาสูบใบเล็ก *Nicotiana glutinosa* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ยาสูบใบใหญ่ *N. tabacum* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ลำโพง *Datura stramonium* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |

**ตารางที่4.3(ต่อ)** แสดงผลการถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่อยู่ในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง โดยใช้พืชอาศัยและbuffer ที่แตกต่างกัน

| พืชที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย | พืชอาศัยที่ต้องการถ่ายทอดเชื้อ | อาการที่แสดงหลังจากที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อเป็นเวลา 14 วัน | |
|---|---|---|---|
| | | buffer ที่ใช้ในการถ่ายทอดเชื้อ | |
| | | potassium phosphate 0.1M (pH 7.5) | sodium citrate 0.1M (pH 7.5) |
| ราชินีหินอ่อน | ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ถั่วเขียว *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ถั่วแดง *Phaseolus coccineus* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | แตงกวา *Cucumis sativas* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ฟักทอง *Cucurbita moschata* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | บานไม่รู้โรย *Gomphrena globosa* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | *Chenopodium amaranticolor* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | *C. quinoa* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ยาสูบใบเล็ก *Nicotiana glutinosa* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ยาสูบใบใหญ่ *N. tabacum* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ลำโพง *Datura stramonium* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| ราชินีสีทอง | ถั่วเหลือง *Glycine max* (L.) Merr. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ถั่วเขียว *Vigna radiata* (L.) R.Wilczek | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ถั่วแดง *Phaseolus coccineus* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | แตงกวา *Cucumis sativas* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ฟักทอง *Cucurbita moschata* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | บานไม่รู้โรย *Gomphrena globosa* L. | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | *Chenopodium amaranticolor* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | *C. quinoa* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ยาสูบใบเล็ก *Nicotiana glutinosa* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ยาสูบใบใหญ่ *N. tabacum* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |
| | ลำโพง *Datura stramonium* | ไม่แสดงอาการ | ไม่แสดงอาการ |

## 4.5 การผลิตพืชปลอดโรคด้วยวิธีการใช้ความร้อน (heat treatment)

การผลิตพืชปลอดโรคด้วยใช้ความร้อนแบบแห้ง (dry heat treatment) จากตารางที่ 4.4 **อุณหภูมิ** 42.5°C จะพบว่าต้นพลูฉลุมีลักษณะอาการ คือ วันที่ 1-2 มีสีน้ำตาลเกิดขึ้นที่ใบเป็นจำนวนหลายต้น วันที่ 3 มีสีน้ำตาลเกิดขึ้นที่ใบเป็นบริเวณกว้างขึ้นและที่ท่อนพันธุ์มีสีเหลืองเกิดขึ้น วันที่ 4-5 ใบเหี่ยวที่ลำต้นมีสีน้ำตาลและเหลืองเกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก และมีต้นที่ตายนึ่ง วันที่ 6-7 ต้นพลูฉลุตายนึ่งทั้งหมด

พลูด่างมีลักษณะอาการคือ วันที่ 1-2 ใบพืชมีสีน้ำตาลเกิดขึ้นและใบเหี่ยวเป็นจำนวนหลายต้น วันที่3 ใบมีสีน้ำตาลคล้ำและลำต้นเริ่มเหี่ยว วันที่ 4-5 ใบเหี่ยวและตายเป็นจำนวนมาก ลำต้นเหี่ยวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล วันที่ 6-7 ต้นตายทั้งหมด

ราชินีหินอ่อน มีลักษณะอาการคือ วันที่1-2 ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลและดำคล้ำเป็นจำนวนมาก วันที่ 3 ต้นและใบเหี่ยวเฉาลง วันที่ 4-5 ต้นและใบเหี่ยวตายหลายต้น วันที่ 6-7 ต้นและใบเหี่ยวตายทั้งหมด

ราชินีสีทองมีลักษณะอาการ วันที่1-2 ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทุกต้น วันที่ 3 ลำต้นเปลี่ยนเป็นเป็นสีน้ำตาล วันที่ 4-5 มีต้นเหี่ยวตาย 6-7 ต้นตายทั้งหมด

จะเห็นว่าต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 42.5 ° C ได้เพราะต้นพืชทั้ง 4 ชนิดจะตายนึ่งทั้งหมดในเวลา 1สัปดาห์

จากตารางที่4.5 **อุณหภูมิ** 40 ° C ในต้นพลูฉลุมีลักษณะอาการดังนี้ ในวันที่ 1-2 ใบเริ่มมีสีน้ำตาลเกิดขึ้น วันที่ 3 ใบเหี่ยวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากขึ้น ลำต้นมีสีเหลืองเกิดขึ้น วันที่ 4-5 ลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมีต้นตาย วันที่ 6-7 ต้นตายทั้งหมด

พลูด่าง วันที่ 1-2 สีของใบไม่สดใส และเหี่ยวลงเล็กน้อย วันที่ 3-5 ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลบ้างบางส่วน 6-7 ใบและลำต้นเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจำนวนหลายต้น วันที่ 8-10 ใบและลำต้นเหี่ยวเพิ่มขึ้นมีต้นตายบางส่วน วันที่ 11-14 มีต้นเหี่ยวเพิ่มขึ้นและมีต้นตายเป็นจำนวนมาก

ราชินีหินอ่อน มีลักษณะ ในวันที่1-2 ใบไม่สดใสเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลบ้างเล็กน้อย วันที่ 3-5 ใบเหี่ยวลงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลมากขึ้น วันที่ 6-7 ลำต้นเหี่ยวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล วันที่ 8-10 ต้นและใบเหี่ยวเป็นจำนวนมากมีต้นตายเพิ่มขึ้น วันที่ 11-14 ต้นเหี่ยวตายเป็นจำนวนมาก

ราชินีสีทองมีลักษณะอาการ ในวันที่ 1-2 ใบไม่สดใสและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลบ้างเล็กน้อย วันที่ 3-5 ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลคล้ำทุกต้น วันที่ 6-7 ต้นเริ่มเหี่ยวและใบแห้งกรอบ วันที่ 8-10 ต้นและใบเหี่ยวตายเพิ่มขึ้น วันที่ 11-14 ต้นเหี่ยวและตายเป็นจำนวนมาก

จะเห็นได้ว่าต้นพลูฉลุไม่สามารถทนต่อ อุณหภูมิที่ 40 ° C เพราะต้นพลูฉลุจะตายนึ่งใน 1 สัปดาห์ ส่วนต้นพลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 40 ° C ได้ถึง 2 สัปดาห์และมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตคือ 10, 5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ลักษณะของต้น

ค่อนข้างทรุดโทรมเหี่ยวแห้งตายเป็นจำนวนมากเมื่อเปรียบเทียบกับต้นพืชก่อนเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 ° C (ภาพที่ 4.11 และ 4.12)

จากตารางที่4.6 **อุณหภูมิ** 37.5 ° C พลูฉลุมีลักษณะอาการดังนี้ ในวันที่ 1-2 ต้นปกติ วันที่ 3-5 ต้นส่วนมากค่อนข้างปกติ สีของใบยังไม่เปลี่ยนแปลงมีเพียง 3 ต้นที่สีของลำต้นเขียวคล้ำและเหี่ยวลงเล็กน้อย วันที่ 6-7 ลำต้นเหี่ยวลงและเริ่มมีสีเหลือง วันที่ 8-9 ลำต้นเหี่ยวและมีสีเหลืองเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก วันที่10 –12 ลำต้นเหี่ยวเหลืองตายเป็นจำนวนมาก วันที่ 13-14 มีต้นตายเป็นจำนวนมาก

พลูด่างมีลักษณะอาการ ในวันที่1-2 ต้นและใบมีลักษณะปกติ วันที่ 3-10 ต้นและใบลักษณะค่อนข้างปกติแต่ใบจะเหี่ยวลงเล็กน้อย วันที่11-14 ลำต้นเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเล็กน้อย วันที่ 15-18 ใบเหี่ยวและมีต้นตายบางบ้างส่วน วันที่ 19-22 ใบเหี่ยวลงทุกต้นสีไม่สดใส วันที่ 23-26 มีบางต้นที่มียอดแตกออกมา วันที่ 27-30 มีต้นที่ตายเพิ่มมากขึ้น แต่ต้นที่มียอดงอกออกมายอดยาวขึ้นเล็กน้อย

ราชินีหินอ่อนมีลักษณะอาการในวันที่ 1- 7 ต้นส่วนมากยังค่อนข้างปกติ มีเพียงบางต้นใบเหี่ยวลงเล็กน้อย วันที่8-10 ต้นและใบเหี่ยวลงเล็กน้อย วันที่ 11-14 ต้นเริ่มมีสีเหลืองและบางต้นมีสีน้ำตาล วันที่ 15-18 ต้นเหี่ยวและมีสีดำคล้ำลงมีบางต้นตาย วันที่ 19 -22 ต้นเหี่ยวและมีสีดำคล้ำลงจนสังเกตเห็นได้ชัด แต่มีบางต้นที่มียอดงอกออกมาใหม่ วันที่ 23-26 ยอดที่แตกออกมายาวข้นเล็กน้อย วันที่ 27-30 มีต้นตายเพิ่มขึ้น ต้นที่รอดชีวิตลำต้นค่อนข้างเหี่ยวและมีสีเหลือง

ราชินีสีทอง มีลักษณะอาการดังนี้ วันที่ 1-7 ต้นพืชยังไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง มีเพียงบางต้นที่ใบเหี่ยวลงเล็กน้อย วันที่ 8-10ลำต้นและใบเริ่มเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล วันที่ 11- 14 ใบเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจำนวนหลายต้น วันที่ 15-18 ใบมีสีน้ำตาลเพิ่มจำนวนมากขึ้น วันที่ 19-22 ต้นเหี่ยวลง และมีบางต้นที่มียอดงอกออกมา วันที่ 23-26 ยอดที่งอกออกมามีสีน้ำตาลคล้ำลงและต้นเหี่ยว 27-30 ต้นเหี่ยวตายเพิ่มขึ้น

จะเห็นได้ว่าต้นพลูฉลุสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 37.5 °C ได้เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีอัตราการรอดชีวิตเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่รอดชีวิตไม่ทรุดโทรมมากนัก ส่วนในต้นพลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชินีสีทอง สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 37.5 °C ได้เป็นเวลา 1เดือน มีอัตราการรอดชีวิตเป็น 15, 60 และ 30 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับลักษณะของต้นและใบค่อนข้างเหี่ยวต้นทรุดโทรมแต่น้อยกว่าที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40° C เป็นเวลา 2 สัปดาห์

จากตารางที่4.7 จะเห็นได้ว่าอัตราการรอดชีวิตของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังปลูกในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าที่อุณหภูมิ 37.5 °C มีอัตราการรอดชีวิตเป็น 100, 40, 58 และ50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 40 °C มีอัตราการรอดชีวิตเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ในทุกพืช ลักษณะของต้นที่ผ่านอุณหภูมิ 37.5 °C หลังปลูกในสภาพปกติเป็น

เวลา 3 เดือนพบว่าพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ใบที่งอกออกมาใหม่จะมีขนาดเล็กและสีของใบมีสีซีดเมื่อเทียบกับใบปกติ และนำต้นพืชสามารถมีชีวิตรอดไปตรวจสอบว่าปลอดจากเชื้อ DMV โดยวิธี direct ELISA (ภาพที่ 4.14)

**ตารางที่**4.4 แสดงอัตราการรอดชีวิตของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 42.5 องศาเซลเซียส

| ชื่อพืช | จำนวนต้นเริ่มต้น | วันที่ | จำนวนต้นที่ที่รอดชีวิต | อัตราการรอดชีวิต(%) |
|---|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 20 | 1-2 | 20 | 100 |
| | | 3 | 12 | 60 |
| | | 4-5 | 8 | 40 |
| | | 6-7 | 0 | 0 |
| พลูด่าง | 20 | 1-2 | 20 | 100 |
| | | 3 | 17 | 75 |
| | | 4-5 | 6 | 30 |
| | | 6-7 | 0 | 0 |
| ราชินีหินอ่อน | 20 | 1-2 | 18 | 90 |
| | | 3 | 10 | 50 |
| | | 4-5 | 6 | 30 |
| | | 6-7 | 0 | 0 |
| ราชินีสีทอง | 20 | 1-2 | 18 | 90 |
| | | 3 | 10 | 50 |
| | | 4-5 | 5 | 25 |
| | | 6-7 | 0 | 0 |

**ตารางที่4.5** แสดงอัตราการรอดชีวิตของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

| ชื่อพืช | จำนวนต้นเริ่มต้น | วันที่ | จำนวนต้นที่ที่รอดชีวิต | อัตราการรอดชีวิต(%) |
|---|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 20 | 1-2 | 20 | 100 |
| | | 3 | 11 | 55 |
| | | 4-5 | 4 | 20 |
| | | 6-7 | 0 | 0 |
| พลูด่าง | 20 | 1-2 | 20 | 100 |
| | | 3-5 | 15 | 75 |
| | | 6-7 | 11 | 55 |
| | | 8-10 | 9 | 45 |
| | | 11-14 | 2 | 10 |
| ราชินีหินอ่อน | 20 | 1-2 | 20 | 100 |
| | | 3-5 | 14 | 70 |
| | | 6-7 | 5 | 25 |
| | | 8-10 | 1 | 5 |
| | | 11-14 | 1 | 5 |
| ราชินีสีทอง | 20 | 1-2 | 20 | 20 |
| | | 3-5 | 16 | 80 |
| | | 6-7 | 9 | 45 |
| | | 8-10 | 5 | 25 |
| | | 11-14 | 1 | 5 |

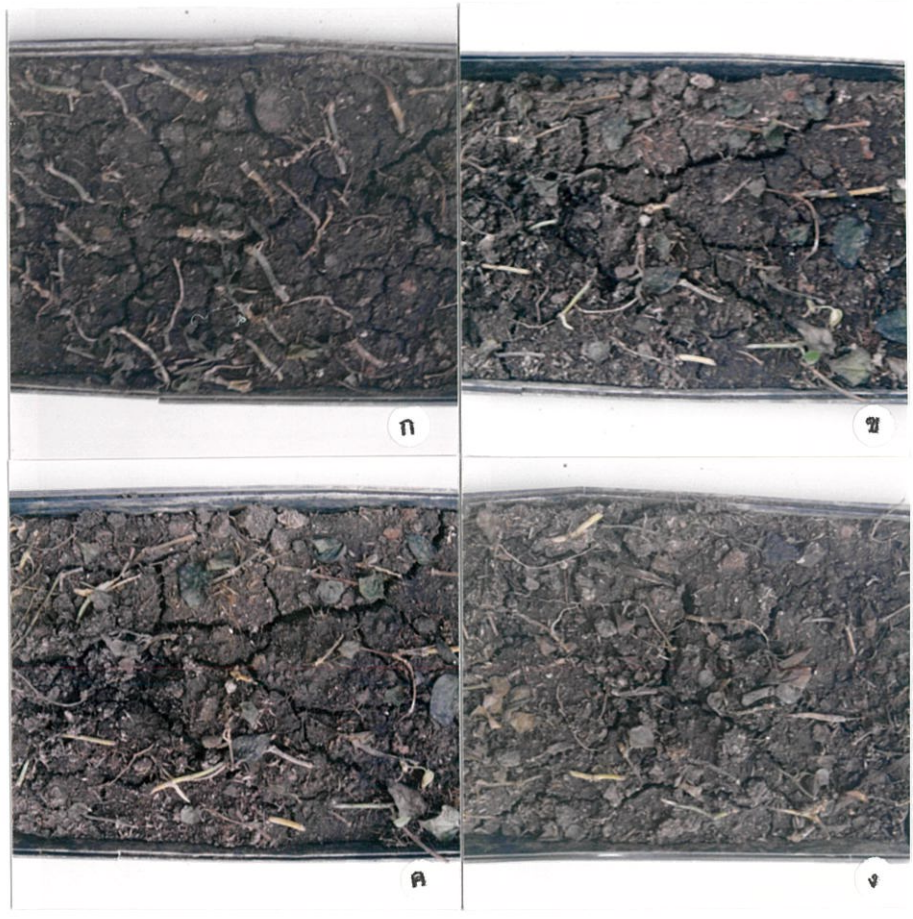
**ตารางที่**4.6 แสดงอัตราการรอดชีวิตของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส

| ชื่อพืช | จำนวนต้นเริ่มต้น | วันที่ | จำนวนต้นที่รอดชีวิต | อัตราการรอดชีวิต(%) |
|---|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 20 | 1-2 | 20 | 100 |
| | | 3-5 | 19 | 95 |
| | | 6-7 | 16 | 80 |
| | | 8-9 | 10 | 50 |
| | | 10-12 | 3 | 15 |
| | | 11-14 | 2 | 10 |
| พลูด่าง | 20 | 1-7 | 20 | 100 |
| | | 8-14 | 19 | 95 |
| | | 15-18 | 15 | 75 |
| | | 19-22 | 14 | 70 |
| | | 23-26 | 8 | 40 |
| | | 27-30 | 3 | 15 |
| ราชินีหินอ่อน | 20 | 1-7 | 20 | 100 |
| | | 8-10 | 19 | 95 |
| | | 11-14 | 18 | 90 |
| | | 15-18 | 16 | 80 |
| | | 19-26 | 15 | 75 |
| | | 27-30 | 12 | 60 |
| ราชินีสีทอง | 20 | 1-7 | 20 | 100 |
| | | 8-10 | 18 | 90 |
| | | 11-14 | 16 | 80 |
| | | 15-18 | 14 | 70 |
| | | 19-22 | 12 | 60 |
| | | 23-26 | 10 | 50 |
| | | 27-30 | 6 | 30 |

**ตารางที่4.7** แสดงจำนวนของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังจากนำออกจากตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37.5 และ40 องศาเซลเซียส และแสดงจำนวนต้นและอัตราการรอดชีวิตหลังจากปลูกในสภาพปกติ เป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | จำนวนต้นที่ T 37.5 c° | จำนวนต้นหลังปลูกในสภาพปกติ 3 เดือน | อัตราการรอดชีวิต (%) | จำนวนต้นที่ T 40 c° | จำนวนต้นหลังปลูกในสภาพปกติ 3 เดือน | อัตราการรอดชีวิต (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 2 | 2 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| พลูด่าง | 15 | 6 | 40 | 2 | 0 | 0 |
| ราชินีหินอ่อน | 12 | 7 | 58 | 1 | 0 | 0 |
| ราชินีสีทอง | 6 | 3 | 50 | 1 | 0 | 0 |

**ภาพที่**4.11 แสดงลักษณะของต้นพลูฉลุ(ก) พลูด่าง(ข) ราชินีหินอ่อน (ค) และราชินีสีทคง(ง) ที่ปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือนก่อนที่จะนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ




**ภาพที่**4.12 แสดงลักษณะของของต้นพลูฉลุ(ก) พลูด่าง(ข) ราชินีหินอ่อน(ค) และราชินีสีทอง(ง) เมื่อนำนำเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2สัปดาห์ ลักษณะของต้นพืชทั้ง 4 ชนิดใบและลำต้นเหี่ยวเฉา

การผลิตพืชปลอดโรคโดยใช้ความร้อนแบบชื้นหลังจากที่แช่ท่อนพันธุ์ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 5 นาที ปรากฏว่าที่อุณหภูมิ 35 ° C และ 40 ° C ท่อนพันธุ์มีสีค่อนข้างใกล้เคียงกับ control ที่อุณหภูมิ 45° C และ50 ° C มีสีดำคล้ำลงเล็กน้อย ส่วนที่อุณหภูมิ 55, 60 และ 65 ° C บริเวณปลายของท่อนพันธุ์มีสีดำคล้ำลงมากเมื่อเปรียบเทียบกับ control เมื่อนำปักชำเป็นเวลา 2 เดือน ต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองมีใบงอกออกมายาวพอที่จะ สามารถนำไปตรวจหาเชื้อ DMV ด้วยวิธี direct ELISA ทำการวางแผนการตรวจสอบตัวอย่างตามภาพที่ 4.13 และนำผลการทดลองที่ได้ไปหาช่วงอุณหภูมิที่เหมะสม ในการทำให้พืชปลอดจากเชื้อและแสดงผลการตรวจสอบดังภาพที่ 4.14

จากตารางที่ 4.8 ในพืชทั้ง 4 ชนิดมีอัตราการรอดชีวิตหลังจากผ่านอุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55, 60 และ 65° C เป็นเวลา 5 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 55, 60 และ 65 ° C หลังนำไปปักชำที่สภาพปกติไม่นานนักต้นก็จะเน่าตายทั้งหมด ในต้นพลูฉลุที่อุณหภูมิ 35 ,40, 45 และ 50 ° C หลังจากการปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือนพบว่ามีอัตราการรอดชีวิต 75, 75, 50 และ 35 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในพลูด่างมีอัตราการรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 ° C เป็น 25, 20 ,35 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนในราชินีหินอ่อนมีอัตราการรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 ° C เป็น 0 , 0 , 5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และในราชินีสีทองมีอัตราการรอดชีวิตที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 ° C เป็น 50, 50 ,50 และ 25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

**ตารางที่**4.8 แสดงอัตราการรอดชีวิตของ พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ผ่านการแช่ในน้ำอุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55, 60 และ 65 ° C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติ เป็นเวลา 2 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ(C°) | จำนวนต้นเริ่มต้น | จำนวนต้นหลังจากปักชำเป็นเวลา 2 เดือน | อัตราการรอดชีวิต (%) |
|---|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 35 | 20 | 15 | 75 |
| | 40 | 20 | 15 | 75 |
| | 45 | 20 | 10 | 50 |
| | 50 | 20 | 7 | 35 |
| | 55 | 20 | 0 | 0 |
| | 60 | 20 | 0 | 0 |
| | 65 | 20 | 0 | 0 |
| พลูด่าง | 35 | 20 | 5 | 25 |
| | 40 | 20 | 4 | 20 |
| | 45 | 20 | 7 | 35 |
| | 50 | 20 | 5 | 25 |
| | 55 | 20 | 0 | 0 |
| | 60 | 20 | 0 | 0 |
| | 65 | 20 | 0 | 0 |
| ราชินีหินอ่อน | 35 | 20 | 0 | 0 |
| | 40 | 20 | 0 | 0 |
| | 45 | 20 | 1 | 5 |
| | 50 | 20 | 0 | 0 |
| | 55 | 20 | 0 | 0 |
| | 60 | 20 | 0 | 0 |
| | 65 | 20 | 0 | 0 |
| ราชินีสีทอง | 35 | 20 | 10 | 50 |
| | 40 | 20 | 10 | 50 |
| | 45 | 20 | 10 | 50 |
| | 50 | 20 | 5 | 25 |
| | 55 | 20 | 0 | 0 |
| | 60 | 20 | 0 | 0 |
| | 65 | 20 | 0 | 0 |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | / | / | / | / | / | / | / | / | / | Disease control | Enzyme control | Substrate control |
| B | / | / | / | / | / | / | / | / | / | | | |
| C | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| D | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| E | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| F | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| G | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| H | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| I | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| J | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / |
| K | / | / | / | / | / | / | / | / | Disease control | | Enzyme control | |
| L | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Substrate control | |

**ภาพที่**4.13 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสในต้นพลูฉลุพลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชินีสีทองเจือจาง 1:10 ใน extraction buffer โดยต้นพืชผ่านความร้อนแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37.5 °C และที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40 ,45 และ 50 ° C เป็นเวลา 5 นาที

A1-A2 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูฉลุที่ผ่านความร้อน 37.5° C

A3-A9 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีหินอ่อนที่ผ่านความร้อน 37.5° C

B1-B6 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีพลูด่างที่ผ่านความร้อน 37.5° C

B7-B9 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีสีทองที่ผ่านความร้อน 37.5° C

C1-D4 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูฉลุที่ผ่านความร้อน 35° C

D5-D8 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูด่างที่ผ่านความร้อน 35° C

D9-D6 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีสีทองที่ผ่านความร้อน 35° C

E7-F9 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูฉลุที่ผ่านความร้อน 40° C

F10-G1แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูด่างที่ผ่านความร้อน 40° C

G2-G11 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีสีทองที่ผ่านความร้อน 40° C

G12-H9 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูฉลุที่ผ่านความร้อน 45° C

H10 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีหินอ่อนที่ผ่านความร้อน 45° C

H11-I5 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูด่างที่ผ่านความร้อน 45° C

I6-J3 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีสีทองที่ผ่านความร้อน 45° C

J4-J10 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูฉลุที่ผ่านความร้อน 50° C

J11-K3 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูด่างที่ผ่านความร้อน 50° C

K4-K8 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีสีทองที่ผ่านความร้อน 50° C

/ แสดงหลุมตัวอย่างที่หยอดน้ำคั้นพืชชนิดต่างๆ

- แสดงหลุมตัวอย่างที่หยอดพืชชนิดอื่นๆ

**ภาพที่**4.14 แสดงผลการตรวจสอบปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังผ่านความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 37.5°C เป็นเวลา 1 เดือน จากนั้นนำไปปลูกไว้ในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน และต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองหลังจากที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน

จากตารางที่4.9 ผลการตรวจสอบเชื้อ DMV ในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองหลังที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน จากนั้นนำมาตรวจสอบด้วยวิธี direct ELISA จะพบว่าค่าเฉลี่ยของระดับสีของปฏิกิริยา ในการตรวจสอบด้วยวิธี direct ELISA ที่อุณหภูมิ 35 และ 40 ° C มีค่าสูงแสดงให้เห็นถึงปริมาณของเชื้อไวรัสที่สูงด้วย ส่วนที่อุณหภูมิ 45 และ 50 ° C ให้ค่าเฉลี่ยของระดับสีปฏิกิริยาที่อ่านได้ต่ำ แสดงให้เห็นถึงปริมาณของเชื้อไวรัสที่ต่ำ

และผลการตรวจสอบเชื้อ DMV ในการตรวจสอบด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังที่ผ่านความร้อนแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือนจากนั้นนำไปปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือนเพื่อปรับสภาพต้น จะเห็นได้ว่าต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบแห้งโดยเก็บไว้ที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37.5 °C เป็นเวลา 1 เดือน ไม่สามารถลดปริมาณของเชื้อไวรัสลงได้ เนื่องจากค่าเฉลี่ยระดับสีของปฏิกิริยาที่อ่านได้อยู่ในระดับ 4 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงปริมาณของเชื้อไวรัสที่สูง ดังแสดงไว้ในตารางที่4.10

**ตารางที่**4.9 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ DMV ด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทองหลังที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50°C เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ(C°) | จำนวนต้น | ค่าเฉลี่ยของระดับสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 35 | 15 | 4.00 |
| | 40 | 15 | 3.26 |
| | 45 | 10 | 3.30 |
| | 50 | 7 | 2.28 |
| พลูด่าง | 35 | 5 | 3.80 |
| | 40 | 4 | 3.75 |
| | 45 | 7 | 2.71 |
| | 50 | 5 | 2.60 |
| ราชินีหินอ่อน | 35 | 0 | 0.00 |
| | 40 | 0 | 0.00 |
| | 45 | 1 | 4.00 |
| | 50 | 0 | 0.00 |
| ราชินีสีทอง | 35 | 10 | 4.00 |
| | 40 | 10 | 3.10 |
| | 45 | 10 | 2.30 |
| | 50 | 5 | 2.20 |

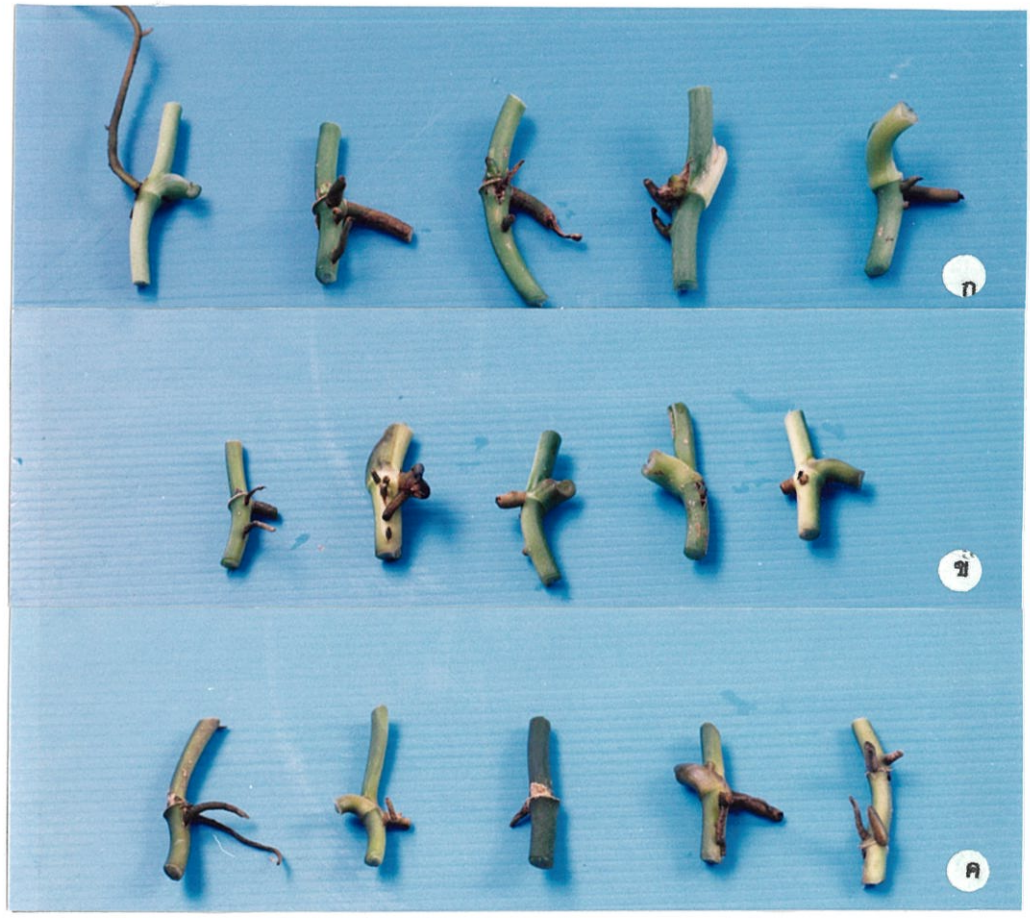
* **หมายเหตุ** ข้อมูลจากตารางภาคผนวกที่ข3

**ตารางที่**4.10 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ DMV ด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังที่ผ่านความร้อนแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือนแล้วนำไปปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | จำนวนต้น | ค่าเฉลี่ยของปฏิกิริยาระดับสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|
| พลูฉลุ | 2 | 4.00 |
| พลูด่าง | 6 | 4.00 |
| ราชินีหินอ่อน | 7 | 4.00 |
| ราชินีสีทอง | 3 | 4.00 |

***หมายเหตุ** ข้อมูลจากตารางภาคผนวกที่ ข2

การผลิตท่อนพันธุ์ที่ปลอดเชื้อ โดยนำข้อมูลของการทดลองที่หาระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทดลองผลิตพืชปลอดเชื้อ ทำให้ทราบว่าที่อุณหภูมิ 45 และ 50 ° C มีแนวโน้มที่จะสามารถทำให้พืชปลอดเชื้อได้ จึงได้นำท่อนพันธุ์ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชินีสีทอง มาแช่ในน้ำร้อนโดยเพิ่มเวลาเป็น 10 นาที ปรากฏว่าท่อนพันธุ์ที่ผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 และ 50 ° C ทำให้บริเวณปลายของท่อนพันธุ์มีสีดำคล้ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับท่อนพันธุ์ปกติไม่ได้ผ่านการแช่ในน้ำร้อน (ภาพที่ 4.15, 4.16, 4.17 และ 4.18) จากนั้นนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน ต้นพืชที่งอกออกมาใหม่จะมีต้นที่ค่อนข้างเล็กและใบมีสีซีด ต้นไม่ค่อยแข็งแรงมีรากสั้น และมีอัตราการรอดชีวิตที่ค่อนข้างต่ำ หลังจากนั้นนำต้นพืชที่รอดชีวิตไปตรวจสอบหาเชื้อ DMV เพื่อหาต้นที่ปลอดเชื้อ

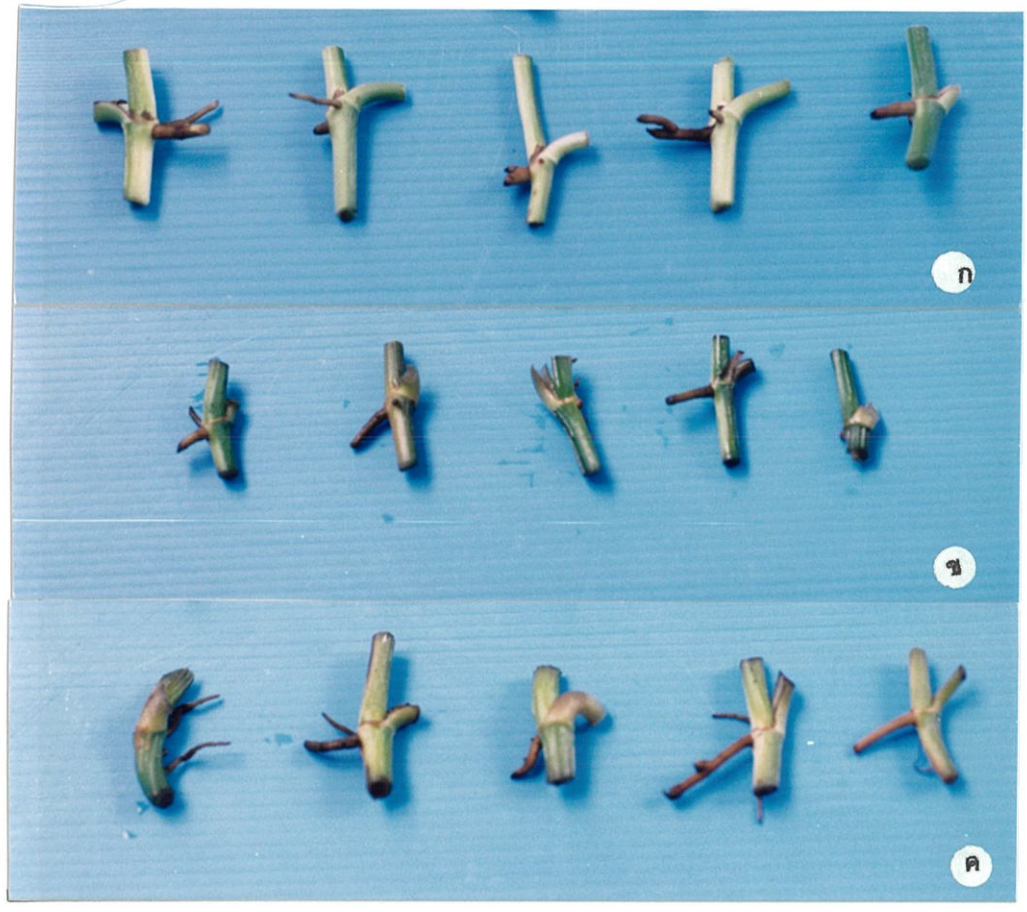



**ภาพที่**4.15 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะท่อนพันธุ์ของพลูฉลุ

ก. ท่อนพันธุ์พลูฉลุที่ไม่ได้ผ่านการแช่ในน้ำร้อน

ข. ท่อนพันธุ์พลูฉลุผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 ° C เป็นเวลา 10นาที จะเกิดสีดำคล้ำที่ปลายของท่อนพันธุ์

ค. ท่อนพันธุ์พลูฉลุผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 ° C เป็นเวลา 10นาที จะเกิดสีดำคล้ำที่ปลายและบริเวณท่อนพันธุ์




**ภาพที่**4.16 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะท่อนพันธุ์ของพลูด่าง

ก. ท่อนพันธุ์พลูด่างที่ไม่ได้ผ่านการแช่ในน้ำร้อน

ข. ท่อนพันธุ์พลูด่างผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 ° C เป็นเวลา 10นาที จะเกิดสีดำคล้ำที่ปลายของท่อนพันธุ์

ค. ท่อนพันธุ์พลูด่างผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 ° C เป็นเวลา 10นาที จะเกิดสีดำคล้ำที่ปลายและบริเวณท่อนพันธุ์

**ภาพที่**4.17 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะท่อนพันธุ์ของราชินีหินอ่อน

ก. ท่อนพันธุ์ราชินีหินอ่อนที่ไม่ได้ผ่านการแช่ในน้ำร้อน

ข. ท่อนพันธุ์ราชินีหินอ่อนผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 ° C เป็นเวลา 10นาที จะเกิดสีดำคล้ำที่ปลายของท่อนพันธุ์

ค. ท่อนพันธุ์หินอ่อนผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 ° C เป็นเวลา 10นาที จะเกิดสีดำคล้ำที่ปลายและบริเวณท่อนพันธุ์

**ภาพที่**4.18 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะท่อนพันธุ์ของราชินีสีทอง

ก. ท่อนพันธุ์ราชินีสีทองที่ไม่ได้ผ่านการแช่ในน้ำร้อน

ข. ท่อนพันธุ์ราชินีสีทองผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 ° C เป็นเวลา 10นาที จะเกิดสีดำคล้ำที่ปลายของท่อนพันธุ์

ค. ท่อนพันธุ์สีทองผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 ° C เป็นเวลา 10นาที จะเกิดสีดำคล้ำที่ปลายและบริเวณท่อนพันธุ์

จากตารางที่4.11 จะเห็นได้ว่าอัตราการรอดชีวิตของ ต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ผ่านการแช่ในน้ำอุณหภูมิ 45 และ 50 °C เป็นเวลา10 นาทีแล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติ เป็นเวลา 3 เดือน ต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชินีสีทอง มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำโดยที่อุณหภูมิ 45 °C เป็น 27.5, 20, 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่ 50 °C มีอัตราการการรอดชีวิตเป็น 18.75, 14, 6 และ 16 ตามลำดับจะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 45 °C มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าที่ 50 °C จากนั้นนำต้นพืชที่รอดชีวิตไปตรวจสอบว่าปลอดจากเชื้อ DMV โดยใช้วิธี direct ELISA ทำการวางแผนการตรวจสอบตัวอย่างดังภาพที่ 4.19 และผลการตรวจสอบแสดงดังภาพที่ 4.20

จากตารางที่4.12 พบว่าผลการตรวจสอบเชื้อ DMV ด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังที่ผ่านความร้อน 45 และ 50 ° C เป็นเวลา 10 นาทีนั้นนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน มีค่าเฉลี่ยของระดับสีปฏิกิริยาที่อ่านได้ต่ำมากแสดงให้เห็นว่าพืชมีปริมาณของเชื้อที่อยู่ในต้นพืชทั้ง 4 ชนิดต่ำมากเช่นกัน ในต้นพลูด่างและราชินีสีทองบางต้นอ่านระดับสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้เท่ากับ 0 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าต้นพืชปลอดทั้ง 2 ชนิดปลอดจากเชื้อ DMV

และจากตารางที่4.13 แสดงให้เห็นถึงจำนวนต้นพืชและ เปอร์เซ็นต์ต้นที่ปลอดเชื้อของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังจากที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ45 และ 50 ° C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

พบว่าในต้นพลูฉลุที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 45 ° C จำนวนต้นที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี direct ELISA 22 ต้น มีต้นที่ปลอดเชื้อ 0 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 0 เปอร์เซ็นต์ และต้นพลูฉลุที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 50 ° C จำนวนต้นที่ทำการตรวจสอบ 10 ต้น มีต้นที่ปลอดเชื้อ 0 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 0 เปอร์เซ็นต์

พลูด่างที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C จำนวนต้นที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี direct ELISA 10 ต้น มีต้นที่ปลอดเชื้อ 1 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ และต้นพลูด่างที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C จำนวนต้นที่ทำการตรวจสอบ 7 ต้น มีต้นที่ปลอดเชื้อ 0 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 0 เปอร์เซ็นต์

ราชินีหินอ่อนที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C จำนวนต้นที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี direct ELISA 5 ต้น มีต้นที่ปลอดเชื้อ 0 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 0 เปอร์เซ็นต์ และต้นราชินีหินอ่อนที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 50 ° C จำนวนต้นที่ทำการตรวจสอบ 3 ต้น มีต้นที่ปลอดเชื้อ 0 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 0 เปอร์เซ็นต์

ราชินีสีทองที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 45 ° C จำนวนต้นที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี direct ELISA 10 ต้น มีต้นที่ปลอดเชื้อ 1 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 10 เปอร์เซ็นต์ และต้นราชินีสีทองที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 50 °C จำนวนต้นที่ทำการตรวจสอบ 8 ต้น มีต้นที่ปลอดเชื้อ 2 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 40 เปอร์เซ็นต์

มีต้นพืชที่ปลอดจากเชื้อ DMV รวม 4 ต้น ได้จากต้นพลูด่างและ ราชินีสีทอง ที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C ชนิดละ1 ต้น และมีต้นราชินีสีทอง ที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 50 °C จำนวน 2 ต้น จากการนำต้นพลูด่างและราชินีสีทองที่ปลอดเชื้อไปเก็บไว้ในโรงเรือนเป็นเวลา 3 เดือนต้นพืชทั้ง 2 ชนิด มีขนาดเล็กและใบมีสีซีด จากนั้นนำมาตรวจสอบอีกครั้งว่าต้นปลอดจากเชื้อไวรัสหรือไม่โดยใช้วิธี direct ELISA ตามแผนการตรวจสอบตัวอย่างที่ออกแบบ (ภาพที่ 4.21(ก)) และแสดงผลการตรวจสอบ (ภาพที่ 4.21 (ข)) เพื่อทำให้ทราบว่าหลังจากที่สามารถผลิตต้นพืชที่ปลอดเชื้อ โดยใช้ความร้อนได้แล้วเชื้อจะสามารถกลับเข้ามาทำลายพืชได้อีกหรือไม่

**ตารางที่4.11** แสดงอัตราการรอดชีวิตของ พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ที่ผ่านการแช่ในน้ำอุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10นาทีแล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติ เป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ(C °) | จำนวนต้นเริ่มต้น | จำนวนต้นหลังจากปักชำเป็นเวลา 3 เดือน | อัตราการรอดชีวิต (%) |
|---|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 45 | 80 | 22 | 27.50 |
| | 50 | 80 | 15 | 18.75 |
| พลูด่าง | 45 | 50 | 10 | 20.00 |
| | 50 | 50 | 7 | 14.00 |
| ราชินีหินอ่อน | 45 | 50 | 5 | 10.00 |
| | 50 | 50 | 3 | 6.00 |
| ราชินีสีทอง | 45 | 50 | 10 | 20.00 |
| | 50 | 50 | 8 | 16.00 |

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | Disease control |
| B | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | |
| C | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | a* | Enzyme control |
| D | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | a* | |
| E | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | b* | Substrate control |
| F | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | b* | |
| G | / | / | / | / | / | / | / | / | / | / | c* | c* |
| H | / | / | / | / | / | / | / | / | - | - | d* | d* |
| | | | | | | | | | | | | |

**ภาพที่**4.19 แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อ DMVในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และต้นราชินีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 45 °C และ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

A1-B11แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูฉลุที่ผ่านความร้อนที่ 45 °C

C1-C10 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูด่างที่ผ่านความร้อนที่ 45 °C

D1-D10 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีสีทองที่ผ่านความร้อน 45 °C

E1-E5 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีหินอ่อนที่ผ่านความร้อน 45 °C

E6-F10 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูฉลุที่ผ่านความร้อน 50 °C

G1-G7 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูด่างที่ผ่านความร้อน 50 °C

G8-H5 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีสีทองที่ผ่านความร้อน 50 °C

H6-H8 แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีหินอ่อนที่ผ่านความร้อน 50 °C

a* แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูฉลุที่เป็นโรค(control)

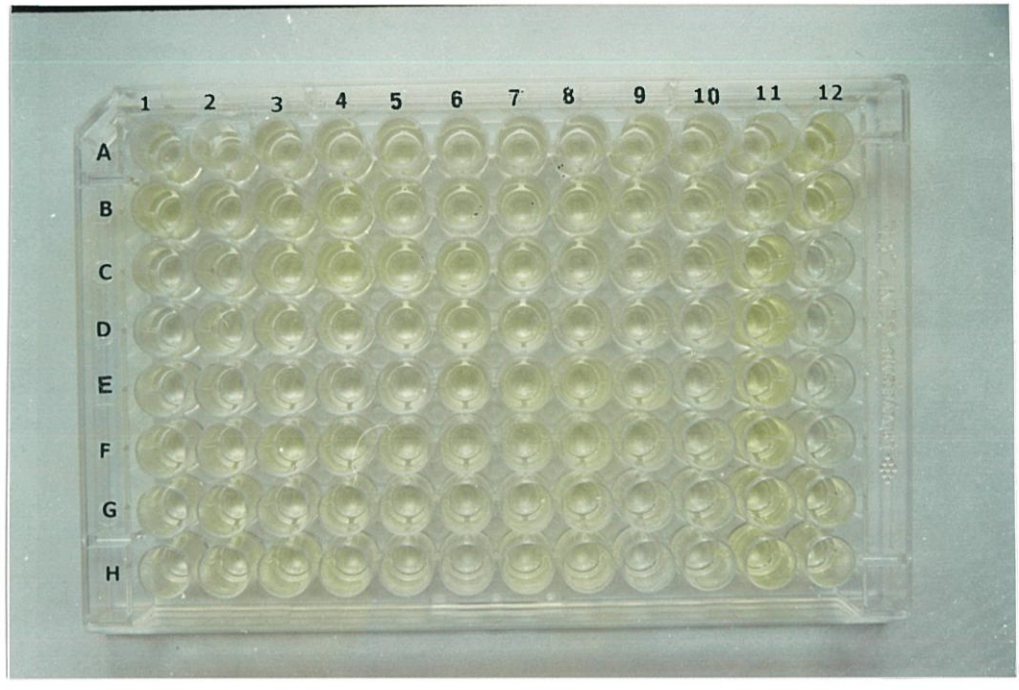
b* แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของพลูด่างที่เป็นโรค(control)

c* แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีหินอ่อนที่เป็นโรค(control)

d* แสดงหลุมที่หยอดน้ำคั้นของราชินีสีทอง (control)

/ แสดงหลุมตัวอย่างที่หยอดน้ำคั้นพืชชนิดต่างๆ

- แสดงหลุมที่ไม่ได้หยอดสารใดๆ




**ภาพที่**4.20 แสดงผลของปฏิกิริยาที่เกิดจากการตรวจสอบปริมาณของเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน ราชินีสีทอง ที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 45 และ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที และนำไปปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

**ตารางที่**4.12 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อ DMV ด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง หลังที่ผ่านความร้อน 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำไปปักชำที่สภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ(C°) | จำนวนต้น | ค่าเฉลี่ยของระดับสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 45 | 22 | 2.3 |
| | 50 | 10 | 1.2 |
| พลูด่าง | 45 | 10 | 1.3 |
| | 50 | 7 | 1.0 |
| ราชินีหินอ่อน | 45 | 5 | 1.2 |
| | 50 | 3 | 1.0 |
| ราชินีสีทอง | 45 | 10 | 1.0 |
| | 50 | 8 | 0.75 |

***หมายเหตุ** ข้อมูลจากตารางภาคผนวกที่ ข4

**ตารางที่4.13** แสดงจำนวนต้นและเปอร์เซ็นต์การปลอดเชื้อของต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ | จำนวนต้นทำการตรวจสอบ | จำนวนต้นที่ปลอดเชื้อ | ต้นที่ปลอดเชื้อ (%) |
|---|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 45 | 22 | 0 | 0 |
| | 50 | 10 | 0 | 0 |
| พลูด่าง | 45 | 10 | 1 | 10 |
| | 50 | 7 | 0 | 0 |
| ราชินีหินอ่อน | 45 | 5 | 0 | 0 |
| | 50 | 3 | 0 | 0 |
| ราชินีสีทอง | 45 | 10 | 1 | 10 |
| | 50 | 8 | 2 | 40 |

จากตารางที่4.14 ผลการตรวจสอบหาเชื้อ DMV จากต้นพลูด่างและราชินีสีทองที่ปลอดเชื้อโดยการใช้ความร้อน จะเห็นได้ว่าจากการวางแผนตรวจสอบด้วยวิธี direct ELISA และผลการตรวจสอบ (ภาพที่ 21ก และ 21ข) อีกครั้งหลังจากที่เพาะเลี้ยงไว้ในโรงเรือนเป็นเวลา 3 เดือน ต้นพลูด่างที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 45 °C จำนวน 1 ต้น สามารถอ่านสีของระดับปฏิกิริยาได้เท่ากับ 1 ต้นราชินีสีทองที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 45 °Cและที่ผ่านความร้อนอุณหภูมิ 50 °C จำนวน 1 และ2 ต้นตามลำดับ สามารถอ่านสีของระดับปฏิกิริยาได้เท่ากับ 1 เช่นกัน แสดงให้เห็นว่ามีเชื้อ DMV กลับเข้ามาทำลายอีกครั้งแต่ว่าเชื้อมีปริมาณที่ต่ำมาก

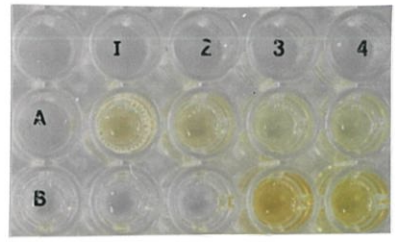
**ตารางที่4.14** แสดงผลการตรวจสอบหาเชื้อ DMV ด้วยวิธี direct ELISA ของต้นพลูด่าง และราชินีสีทอง หลังจากที่ปลอดเชื้อแล้ว และนำเพาะเลี้ยงต่อเป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ(°C) | จำนวนต้น | ระดับสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูด่าง | 45 | 1 | 1.0 |
| | 45 | 1 | 1.0 |
| ราชินีสีทอง | 50 | 2 | 1.0* |

* ค่าเฉลี่ยจาก 2 ต้น

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| A | พลูด่าง 45°C | ราชินีสีทอง 45°C | ราชินีสีทอง 50°C | ราชินีสีทอง 50°C |
| B | Substrate control | | Disease control | |

ก




ข

**ภาพที่21** แสดงแผนการตรวจสอบ ELISA plate ในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อ DMV ในต้นพืชที่ปลอดเชื้อ หลังจากเก็บไว้ในสภาพธรรมชาติ 3 เดือน (ก) และแสดงผลการตรวจสอบปริมาณของเชื้อไวรัสจากต้นพลูด่าง และราชินีสีทองที่ปลอดเชื้อด้วยเทคนิค direct ELISA 3เดือนหลังจากการตรวจสอบครั้งแรก พบเชื้อไวรัสกลับเข้ามาทำลายในปริมาณที่ต่ำ (ข)

# บทที่ 5
# สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

## 5.1 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายไม้ประดับใบในวงศ์ Araceae บางชนิดในกลุ่มพลู ในการสำรวจและการเก็บตัวอย่างของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง พบว่าพลูฉลุจะแสดงอาการแตกต่างกัน เช่นแสดงอาการใบหยิกงอ อาการหยิกงอของใบร่วมกับอาการด่าง อาการหยิกงอร่วมกับอาการด่างและแคระแกรน ใบด่างและรูปร่างของใบเรียวยาวผิดปกติไป ส่วนในพลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ในระยะแรกพบอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสไม่ชัดเจน พบเพียงอาการต้นแคระแกรนและเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในโรงเรือน จะพบอาการของโรคที่มีความแตกต่างกันหลายอาการเพิ่มขึ้น โดยในพลูด่างจะพบอาการด่างเขียวเข้มสลับกับเขียวอ่อนกระจายอยู่บนใบมีขอบเขตไม่แน่นอน ใบเปลี่ยนรูปไปจากเดิมและลักษณะลำต้นแคระแกรน ในราชินีหินอ่อนพบอาการใบบิดเบี้ยวและเป็นคลื่น ใบเรียวยาวผิดปกติ และในราชินีสีทองพบอาการด่างขาวกระจายอยู่บนใบอ่อน ใบเปลี่ยนรูปเป็นคลื่น ใบเปลี่ยนรูปและมีขนาดเล็กลง และยังพบว่าในแต่ละช่วงเวลาก็จะแสดงอาการที่รุนแรงต่างกัน ถ้าอากาศหนาวเย็นจะแสดงอาการที่รุนแรงและชัดเจนมากกว่าในฤดูร้อนและในฤดูฝน เช่นเดียวกับ Brunt *et al.* (1995) รายงานว่าเชื้อ DMV เมื่อเข้าทำลายพืชแล้วจะแสดงอาการของโรคแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับฤดูกาลเป็นอย่างมาก และสอดคล้องกับ Pana and Vovlas (1983) รายงานว่าต้น *Richardia africana* จะแสดงอาการด่างและใบเหลืองเห็นได้ชัดเจนบนใบอ่อน ในช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ผลิ การที่เชื้อแสดงอาการของโรคชัดเจนในใบอ่อนทั้งนี้อาจจะเนื่องจากเมื่อเชื้อเข้าทำลายพืชแล้ว เชื้อมีการเคลื่อนที่ไปยังบริเวณยอดก่อนโดยอาศัยแรงจากการคายน้ำของพืช (Apoplastic movement) หลังจากนั้นจึงเคลื่อนที่ไปยังส่วนต่างๆของพืชและไปสะสมที่บริเวณส่วนหัวของพืช ทำให้พืชในระยะใบอ่อนแสดงอาการของโรคชัดเจนกว่าระยะอื่นๆ และในฤดูหนาวเป็นช่วงที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส ก่อให้เกิดโรคได้ดีในต้นพืช ทำให้อาการของโรคชัดเจนมากขึ้น ส่วนในฤดูฝนต้นพืชมีการเจริญเติบโตทางด้านลำต้นและใบอย่างรวดเร็วทำให้เชื้อไวรัสเจริญได้ช้ากว่าและในฤดูร้อนสภาพอากาศไม่เหมาะสมกับการเพิ่มปริมาณของเชื้อ พืชที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจึงแสดงอาการของโรคน้อยในทุกฤดูที่ทำการสำรวจอาการของโรคจะปรากฏอาการชัดเจนในใบอ่อนมากกว่าใบแก่

การตรวจสอบอนุภาคของเชื้อที่เข้าทำลายพลูฉลุ โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยวิธี Leaf-Dip พบว่ามีการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือเชื้อ DMV ซึ่งมีลักษณะของอนุภาคเชื้อเป็นเส้นยาวงอคล้ายเส้นด้าย (flexuous rod) ขนาดของอนุภาคยาวประมาณ 750 nm

และ CMV มีลักษณะอนุภาคเป็นทรงกลม (isometic) ขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางยาวประมาณ 30 nm การตรวจสอบด้วยวิธีนี้พบอนุภาคของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดในปริมาณที่น้อยมาก ในการตรวจสอบด้วยวิธี Leaf-Dip จะใช้น้ำคั้นจากพืชเคลือบผิวหน้ากริดโดยตรง ส่งผลต่อปริมาณของอนุภาคที่เกาะกับผิวกริดอนุภาคจะเกาะติดกับผิวกริดได้น้อยเพราะไม่มีตัวยึดจับ ทำให้อนุภาคของเชื้อจำนวนหนึ่งหลุดออกไป

การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธี indirect ELISA พบว่าพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน ราชินีสีทอง ที่ทำการสุ่มตรวจสอบด้วยวิธีการนี้ ต้นพืชทั้ง 4 ชนิด มีการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดคือ เชื้อ DMV และ CMV การที่พืชถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายร่วมในพืชวงศ์ Araceae มีลักษณะคล้ายกับงานวิจัยของ Gunna (1997) ได้ทำการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสในพืชวงศ์ Araceae 3 แห่งในหมู่เกาะ Papua New guine พบเชื้อ DMV เข้าทำลายร่วมกับเชื้อ ABVC ในพืชที่ทำการตรวจสอบของพื้นที่ทั้งหมด และคล้ายกับ Brunt *et al.* (1995) และ Hearon (1979) รายงานว่าต้น *Philodendron selloum* ซึ่งเป็นพืชอาศัยในวงศ์ Araceae เช่นเดียวกับพืชทั้ง 4 ชนิด เมื่อถูกเชื้อ DMV เข้าทำลายจะแสดงอาการใบด่าง และใบเปลี่ยนรูป และเมื่อถูกเชื้อ CMV เข้าทำลายจะแสดงอาการใบเปลี่ยนรูปและเส้นกลางใบเหลือง แสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 2 ชนิด เมื่อเข้าทำลายพืชจะก่อให้พืชแสดงอาการของโรคแตกต่างกัน

ในการตรวจสอบปริมาณของเชื้อด้วยวิธี indirect ELISA ใน 3 ระยะเวลา ระยะที่ 1 เดือนมิถุนายน ปริมาณของเชื้อ DMV ค่อนข้างสูงค่าเฉลี่ยของระดับปฏิกิริยาสีที่อ่านได้เท่ากับ 3.50 แต่เชื้อ CMV มีปริมาณที่ต่ำ ค่าเฉลี่ยของระดับปฏิกิริยาสีที่อ่านได้เท่ากับ 2.00 การตรวจสอบระยะที่ 2 เดือน กันยายนปริมาณของเชื้อ DMV และ CMV สูงเพิ่มขึ้น โดยค่าเฉลี่ยของระดับปฏิกิริยาสีที่อ่านได้เท่ากับ 3.70 และ 2.70 ตามลำดับ และการตรวจสอบระยะที่ 3 เดือน ธันวาคม ปริมาณของเชื้อทั้ง 2 ชนิดจะสูงที่สุด ค่าเฉลี่ยของระดับปฏิกิริยาสีที่อ่านได้เท่ากับ 4.00 ทั้งนี้เนื่องจากในการตรวจสอบระยะที่ 3 เดือนธันวาคมเป็นช่วงที่อากาศค่อนข้างหนาวเย็น มีผลต่อการเพิ่มปริมาณของเชื้อ เช่นเดียวกับ Almeida *et al.* (2001) ได้ทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุอาการด่างที่เกิดขึ้นกับต้นข้าวโพด โดยใช้วิธี ELISA ในการตรวจสอบ พบว่าถ้าอากาศหนาวเย็น เชื้อไวรัสจะมีปริมาณสูงและส่งผลกระทบต่อพืชเป็นอย่างมาก และให้ผลสอดคล้องกับผลการสำรวจและเก็บตัวอย่างอาการของโรค ซึ่งผู้ทำการวิจัยได้ศึกษาไว้ในการทดลองตอนต้นที่พบว่าถ้าอากาศหนาวเย็นลักษณะอาการของโรคจะแสดงออกอย่างชัดเจน และมีลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายหลายๆลักษณะอาการ เช่น อาการด่างกระจายอยู่ตามใบขอบเขตไม่แน่นอน ใบหยิกและม้วนงอ ใบเปลี่ยนรูปไปจากเดิมเรียวยาวผิดปกติ ต้นแคระแกรนและใบมีขนาดเล็กลง นอกจากนี้ Hu *et al.* (1995) ได้ทำการตรวจสอบหาเชื้อ DMV โดยวิธี indirect ELISA พบว่าปริมาณของเชื้อเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาที่ทำการตรวจสอบ ในสภาพอากาศที่หนาวเย็นเป็นช่วงเวลาที่

เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของเชื้อทำให้เชื้อมีปริมาณมาก และส่งผลต่ออาการที่แสดงออกของพืช โดยจะเห็นอาการของโรคได้ชัดเจนในฤดูหนาว

ในการตรวจสอบพืชอาศัยของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายต้น พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง โดยถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นพืชทั้ง 4 ชนิด ปรากฏว่าไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้น ไปยังพืชอาศัยในวงศ์ Leguminosae, Cucurbitaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaece และ Solanaceae ซึ่งการทดลองนี้ให้ผลคล้ายกับ ชูศักดิ์ แขพิมาย. (2540) ได้ทำการถ่ายทอดเชื้อ DMV จากน้ำคั้นพืชต้น *Dieffenbachia picta* และต้นพลูฉลุ ที่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายอย่างชัดเจน ไปยังพืชอาศัย 4 วงศ์ ก็ไม่สามารถถ่ายเชื้อได้สำเร็จ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อที่เข้าทำลายพืชทั้ง 4 ชนิด เป็นเชื้อ DMV ซึ่งเป็นเชื้อที่มีพืชอาศัยแคบเฉพาะในวงศ์ Araceae CMI/AAB (1978) ส่วนเชื้อ CMV เมื่อเข้าทำลายต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง มีความผันแปรค่อนข้างสูงขึ้นกับสภาพอากาศและฤดูกาลเป็นอย่างมาก ในน้ำคั้นของต้นพืชทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้ในการถ่ายทอดเชื้อเมื่อบดกับ buffer แล้วจะมีลักษณะเหนียวเป็นเมือก อาจจะมีสารบางชนิดยับยั้งการถ่ายทอดเชื้อ โดย Walkey (1991) ได้กล่าวถึงปัจจัยที่สำคัญในการถ่ายทอดเชื้อไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากพืชที่ใช้ในการถ่ายทอดเชื้อจะปล่อยสารเคมีบางชนิดระหว่างที่เราทำการบดพืช เช่น สาร inhibitors และ inactivators โดยที่สาร inhibitors อาจจะไปจับอนุภาคของเชื้อ ไวรัส และสาร inactivators ทำให้เชื้อเสียความคงทน ทำให้มีผลต่อการถ่ายทอดเชื้อ สภาพอากาศและปริมาณของเชื้อที่อยู่ในต้นพืชระหว่างที่ทำการถ่ายทอดเชื้อ ก็เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายทอดของเชื้อ ถ้าสภาพอากาศร้อนเกินไป ปริมาณของเชื้อมีน้อย ก็จะส่งผลให้ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อได้สำเร็จ แต่อย่างไรก็ตาม Rana and Vavlas (1987) สามารถถ่ายทอดเชื้อ DMV จากต้น *Richardia* ไปยังต้น *Chenopodium amaranticolor* และ *C. quinoa* ได้สำเร็จโดยทำการถ่ายทอดเชื้อในช่วงฤดูหนาวและฤดูใบไม้ผลิ ซึ่งเป็นช่วงที่อาการของโรคแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนและปริมาณของเชื้อสูง และใช้เนื้อเยื่อส่วน epidermal เพื่อลดปัญหาเรื่องสาร inhibitors จึงสามารถถ่ายทอดเชื้อได้สำเร็จ

ในการผลิตพืชปลอดเชื้อโดยใช้ความร้อนพบว่า การให้ความร้อนแบบแห้งโดยใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ไม่สามารถทำให้พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชินีสีทองปลอดจากเชื้อไวรัสได้ เนื่องจากไม่สามารถให้อุณหภูมิที่สูงเกินกว่า 40 °C เพราะจะทำให้พืชทั้ง 4 ชนิดตายนึ่งเป็นส่วนมาก และต้นทรุดโทรมมากในเวลาเพียง 1 สัปดาห์ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ Chartisathia (1997) ได้ทำการทดลองให้ความร้อน กับต้นออนซิเดียมที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลาย โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 40 ° C ปรากฏว่าต้นออนซิเดียมตายนึ่งเป็นจำนวนมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากต้นออนซิเดียมและต้นพืชทั้ง 4 ชนิดเป็นพืชอวบน้ำ (ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ. 2530) และเป็นต้นอ่อนที่เพิ่งงอกมาจากการเพาะชำค่อนข้างบอบบาง ทำให้ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่สูงได้ ต้นพืชอัตราการตายที่สูงเนื่อง

จากเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมกับชนิดของพืช แต่การใช้ความร้อนแบบชื้นโดยการนำท่อนพันธุ์ไปแช่ในน้ำร้อนพืชสามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 ° C เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เชื้อ DMV มีปริมาณลดลง และสามารถทำให้พืชปลอดเชื้อ DMV ได้ โดยสามารถผลิตต้นพลูด่างและราชินีสีทอง ที่ผ่านการแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 ° C ชนิดละ 1 ต้น และที่อุณหภูมิ 50 ° C สามารถผลิตต้นราชินีสีทองที่ปลอดเชื้อได้ 2 ต้น ทั้งนี้เนื่องมาจากความร้อนสามารถลดและยับยั้งการเพิ่มปริมาณของชื้อไวรัส ในการทดลองนี้สอดคล้องกับ Cheema *et al.* (1999) ได้นำ bud-stick (ตาข้างระหว่างก้านใบ) ของต้น kinnow ที่ติดเชื้อมาแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 45 และ 50 ° C ก็มีผลต่อการลดปริมาณของเชื้อไวรัสเช่นกัน และพบว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 ° C ไม่มีผลต่อการลดปริมาณของเชื้อ และ Runai *et al.*(2001) ได้นำเชื้อไวรัสไปแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 87 ° C และ 95° C เป็นเวลา 15 วินาทีสามารถทำลายเชื้อไวรัสลงได้ 100 เปอร์เซ็นต์อย่างไรก็ตามการให้อุณหภูมิที่สูงและนานเกินไปกับพืช ไม่เหมาะสมกับชนิดของพืชที่ต้องการจะผลิตเป็นพืชปลอดเชื้อก็จะทำให้ต้นพืชตายเป็นจำนวนมาก ดังนั้นในการผลิตพืชปลอดโรคควรหาช่วงอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสม ที่จะสามารถทำให้พืชปลอดเชื้อและมีชีวิตรอดต่อไป เพื่อใช้เป็นท่อนพันธุ์และขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป

เมื่อผู้ทดลองสามารถผลิตพืชปลอดเชื้อได้สำเร็จ จึงนำต้นพืชไปปลูกในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบต้นพืชที่ปลอดเชื้ออีกครั้งด้วยวิธี direct ELISA ปรากฏว่าเชื้อ DMV สามารถกลับเข้ามาทำลายได้อีกแต่ปริมาณของเชื้ออยู่ในปริมาณที่ต่ำ เช่นเดียวกับ Valverde *et al.* (1997) ทำการผลิตต้น white cocoyam ให้ปลอดจากเชื้อ DMV ได้สำเร็จ หลังจากนั้นนำไปปลูกในสภาพธรรมชาติพบว่าเชื้อสามารถกลับเข้ามาทำลายพืชได้อีกครั้ง ทั้งนี้เนื่องมาจากการให้ความร้อนสามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อ DMV ให้ต่ำลงจนสามารถปลอดเชื้อได้ แต่เมื่อนำต้นพืชที่เชื้อไวรัสเข้าทำลายไปฟื้นฟูสภาพต้นในสภาพปกติ ก็ส่งผลให้เชื้อไวรัสสามารถปรับสภาพและเพิ่มจำนวนได้อีกครั้ง

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาพบว่า โรคไวรัสที่เป็นปัญหาสำคัญของไม้ประดับวงศ์ Araceae ในต้นพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อน และราชินีสีทอง ได้แก่เชื้อ dasheen mosaic virus (DMV) และ เชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ซึ่งเป็นสาเหตุของอาการใบด่างชนิดต่างๆกระจายอยู่บนใบมีขอบเขตไม่แน่นอน ใบหยิกและม้วนงอ ใบเปลี่ยนรูปไปจากเดิมเรียวยาวผิดปกติ ลำต้นแคระแกรนและใบมีขนาดเล็กลง ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของพืชในกลุ่มนี้ เนื่องจากเป็นพืชที่ใช้วิธีการขยายพันธุ์โดยไม่ใช้เพศ อาศัยการปักชำเป็นหลักเป็นสาเหตุของการระบาดของโรคได้อย่างรวดเร็ว ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อผ่าน

ทางน้ำคั้นของต้น พลูฉลุ พลูด่าง ราชินีสีทอง และราชินีหินอ่อนไปยังพืชอาศัยชนิดอื่นๆได้ เนื่องจากน้ำคั้นของพืชมีลักษณะเหนียวเป็นเมือกอาจจะมีสาร inhibitor และมีสาร inactivator ดังนั้นในการแก้ปัญหาควรจะใส่สารที่ช่วยดูดซับสารดังกล่าว หรืออาจจะใช้พืชส่วนอื่นๆ ในการถ่ายทอดเชื้อ อาจจะสามารถแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นได้ จากการศึกษาพบว่าในแต่ละฤดูกาลพืชจะแสดงอาการของโรคแตกต่างกัน โดยอาการของโรคแสดงชัดเจนในสภาพอากาศที่หนาวเย็น ปริมาณของเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายจะมีปริมาณที่สูงและค่อนข้างคงที่ ส่วนเชื้อ CMV ปริมาณของเชื้อผันแปรตามฤดูกาล เนื่องจากสภาพแวดล้อมมีผลต่อปริมาณของเชื้อและการแสดงออกของอาการที่เกิดจากเชื้อ DMV และ CMV เข้าทำลาย ดังนั้นในการผลิตพืชปลอดเชื้อควรที่จะทำการผลิตในฤดูที่มีสภาพอากาศร้อน อาการและปริมาณของโรคน้อย เพราะน่าจะสามารถผลิตพืชที่ปลอดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าในฤดูกาลอื่น ในอุณหภูมิที่ 45 และ 50 °C สามารถผลิตพืชปลอดเชื้อได้ แต่หลังจากนั้นเชื้อสามารถกลับเข้ามาทำลายได้อีกครั้ง วิธีการแก้ปัญหานี้น่าจะสามารถแก้ไขได้โดยนำพืชที่ปลอดเชื้อแล้วเก็บไว้ในที่ที่อุณหภูมิสูงชักระยะหนึ่งก่อน และทำการตรวจสอบพืชเป็นระยะ จนกระทั่งแน่ใจว่าพืชปลอดเชื้อแล้วจึงนำไปไว้ในสภาพปกติก่อนที่จะใช้เป็นแม่พันธุ์ปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ต่อไป

# บรรณานุกรม


ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ. 2539. **ไม้ประดับมงคล**. บริษัทเจเนอร์รัลบุ๊คส์จำกัด. กรุงเทพมหานคร. 230 หน้า.

ชูศักดิ์ แขพิมาย. 2540. " การศึกษาเชื้อ Dasheen Mosaic Virus บนไม้ประดับวงศ์ Araceae." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ธีระ สูตะบุตร. 2535. **โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย**. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง. กรุงเทพมหานคร. 310 หน้า.

ปราณี ฮัมเมอร์ลิ้งค์. 2530. **เอกสารประกอบการอบรมซีรัมวิทยา ด้าน** ELISA. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

บรรเจิด คติการ. 2534. **การพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับของประเทศไทย**. เทคโนโลยีการผลิตไม้ดอก. สมาคมไม้ดอกไม้ประดับแห่งประเทศไทย. กรุงเทพมหานคร. 68 หน้า.

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

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2536. **พจนานุกรมไม้ดอกไม้ประดับในเมืองไทย**. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ประชุมทองการพิมพ์ กรุงเทพมหานคร. 548 หน้า.

สุเม อรัญนารถ. 2536. **การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการเกษตร**. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 55 หน้า.

Abo El-Nil, M. M. *et al.* 1977. "Purification, serology, and some physical properties of dasheen mosaic virus". **Phytopathology**. 67(12) : 1445 -1450.

Alconero, R. 1972. "Hot water treatments of corms of *Xanthosoma* spp. Infected with dasheenmosaic virus". **Plant Disease Reporter**. 56(4) : 320 -321.

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

Beckett Kenneth, A. 1995. **The R.H.S. Encyclopedia of House Plants**. Italy. 432 pp.

Bellardi, M. G. and Bertaccin, A. 1993. "In vitro of indoor foliage". **Plants Informatore Fitopatologico**. 43(2) :11-16.

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

Bertaccini, A. M. *et al.* 2001. "Thermotherapy and chemotherapy to eliminate the phytoplosms in Vine propogration material." **Informatore Agrario**. 57(42): 137-144.

Bertozzi, T. *et al.* 2002. "Detection of Prunus necrotic ringspot virus in almond effect of sampling time on the efficiency of serological and biological indexing methodtologies." **Australiam journal of Experimenttal Agriculture**. 42 (2):207-210.

Brunt, A. A. *et al.* 1995. **Viruses of Plants Description and Lists from the Vide Database**. University Press. UK. 1,484 pp.

Bos, L.1970. **Symptoms of virus disease in plants**. Oxford and IBH publishing CO. Delhi, India. 206 pp.

Chartisathia, J. *et al.*1997. "Eradication of orchid virus by thermotherapy and meristem culture for disease - free oncidium". **Thai Agricutural Research Journal**.15(2) :136 -144.

Chase, A. R. and Zettler, F. W.1982. "Dasheen Mosaic Virus Infection of Dieffenbachia Cultivars." **Plant Disease**. 66(10): 891-893.

Cheema, S. S. *et al.* 1999."Management of citrus ring spot disaese through thermotherapy". **Indian Phytopath**. 52(4): 354 -356.

Chen, C.C. *et al.* 1996. "Dasheen mosaic virus causing mosaic disease of *Pinellia cordata*." **Acta Phytopathologica Sinica**. 26(1): 87-91.

Chen, C. C. *et al.* 1998. "Distribution of tuberose mold mosaic potyvirus in tuberose (*Polianthes tuberose* L.)." **Plant Protection Bulletin Taipei**. 40(3): 199-207.

Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. "Characteristic of the microplate method of enzyme- Linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses." J. Gen . Virol. 34: 475-483.

Clark, M. F. 1981. "Immunosorbent assory in plant pathology." **Annual Review of phytopathology**.19 : 83 -106.

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

CMI/ AAB (eds.) 1979. "Cucumber mosaic virus." **Descriptions of Plant Viruses**. 213(6).

Dragoljub, D. S. *et al.* 1999. **Handbook Plant virus disease**. United States of America. New York. 553 pp.

Fawzy, R. N.1996. "Dasheen mosaic virus infection of *Dieffenbachia* and *Aglaonema* in Egypt." **Annauls of Agricaltural science Moshtohor**. 34: 1595-1604.

Freitas Astua, J. *et al.* 1999. "Incidence of orchid viruses in the state of Sao Paulo, Brazil." **Fitopatologia Brasilena**. 24(2): 125-130.

Gunna, T.G. 1997. "Foliar disease of taro in the Wahgi valley of the western highlands province of Papua New Guinea." **Papua New Guinea Journal of Agriculture, Forestry and Fisheries**. 40 : 22-26.

Hampton, R. *et al.* 1990. **Serological Methods for Detection and Indentification of Viral and Bacterial Plant Pathogens a Laboratory Manual**. U. S. A. 389 pp.

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

Hessayan, D.G. 1996. **The House Plant Expert Books**, A Division of Transworld Pubilshers Ltd. 256 pp.

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

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

Hu, J. S. *et al.* 1994. "Detection of dasheen mosaic virus from taro plants in the field and in tissue culture ." **Plant Disease**. 78 (7): 754.

Hu, J. S. *et al.* 1995. "Dasheen mosaic potyvirus in Hawaiian taro." **Australasian Plant Pathology**. 24(2): 112-117.

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

Kenneth Horst, R. 1990. **Westcott's Plant Disease Handbook**. New York. 953 pp.

Koepp, R.1992. "Millisecond range chlorophyll fluorescence measurementh of heat-stressed Plants." **Photosynthetica**. 27(4): 427-431.

Kositratana, W. *et al.*1983. "Dasheen Mosaic Virus in Chinese Evergreen Plants in California." **Plant Pathology**. 73: 791.

Li, R. H. *et al.*1996. "Comparision of diognostic techniques for detecting tomato infectious chlorosis virus." **Phytopathology** (supplement). 86 (11):12.

Liang, Y. G. *et al.* 1994. "Indentification of dasheen mosaic virus in Taiwan by immunolabelling." **Report of Taiwan Sugar Research Institute.** 143 : 41-50.

Macias, W. 2000. "Methods of disinfection cucumber seeds that originate from plants infection by cucumber green mottle mosaic tobamovirus (CGMMV)." **Vegetable Crops Research Bulletion.** 53 : 75-82.

Makkouk, K. M. and Attar, N. 2001. "Effect of storage and heat treatment on barley stripe mosaic virus (BSMV) in barley seeds ." **Arab Journal of Plant Protection.**19 (1) :52-54.

Mortensen, L. M. 1991. "The effect of air temperature on the growth of foliage plants."**Norwegian Journal of Agricutural Sciencences.** 5(3): 289 -294.

Oh, J. H. *et al.* 2001. "Selection of pear trees free from pear black leaf spot disease and resistant test for pear tree cultivars." **Korean Journal of Horticultural Science and Technology.** 19(1): 43 - 47.

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

Pourrahim, R. 2001. "First report of tomato spotted wilt virus on potatoes in Iran." **Plants dissease.** 85(4): 442.

Rana, G. L. and Vavlas, C. 1983. "Manual Transmission of Dasheen Mosaic Virus from *Richaradia* to Nonaraceaus hosts." **Plant Disease.** 67: 1121-1122.

Runia, W. T. 2001. "Disinfection of recirculation water from closed cultivation systems by heat treatment". **Acta- Horticulture.** 548: 215 -222.

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

Shimoyama, J. *et al.* 1992. "Kinjak mosaic virus, a new potyvirus infecting konjak." **Annauls of the phytopathological society of Japan.** 58(5):706-712.

Torres, A. C. 2000. "Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus – free plants of garlic". **Horticultura Brasileira.**18 (3): 192-195.

Valverde, R. *et al.*1997. "Field evaluation of dasheen mosaic virus free cocoyam plant produced by in vitro techniques." **Scientia Horticulturae.** 68 (1-4): 37-47.

Van Regenmortel, M. H. V. 1978. " Application of plant virus serology." **Annaul Review Phytopathol.**16: 57-81.

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

Wangia, A. W. *et al.* 2001. "Outbreak of tomato spotted wilt virus in tomato in Kenya." **Plant disease.** 85(10):1123.

Wu, Z. and Langham, M. A. C. 1996. "Distribution of wheat streak mosaic virus in winter wheat plants." **Phytopathology** (supplement). 86(11): 73.

Xu, P. S. and Niimi, Y. 1999. "Evaluation of virus – free bulblet production by antiviral and /or heat treatment in in vitro scale cultures of *Lilium longiflorum* ' Georgia' L.X. 'Casablanca'." **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science.** 68(3): 640 -647.

Zettler, F. W. *et al.*1970. "Filamentous Virus Infecting Dasheen and Other Arceous Plants." **Phytophathology.** 60: 983 – 987.

Zettler, F. W. and Hartman, R. D. 1987. "Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivated aroids and control of the virus by tissue culture." **Plant disease.** 17(11) :956-963.

# ภาคผนวก

# ภาคผนวก ก.

# สารเคมี

**ภาคผนวกที่ก1** สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Enzyme -linked immunosorbent assay (ELISA)

1. Goat entiled rabbit in conjugate buffer (IgG)
2. coating buffer
3. PBS-Tween
4. extraction buffer
5. conjugate buffer
6. substrate buffer
7. p-nitrophenyl phosphate

buffers ชนิดต่างๆที่เตรียมได้ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-6 องสาเซลเซียส

<u>การเตรียม Buffer</u>

coating buffer ( pH 9.6 ) ในการเตรียมสารละลาย 1 ลิตรใช้สารต่างๆดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| $NaHCO_3$ | 1.59 | กรัม |
| $NaHCO_3$ | 2.93 | กรัม |
| $NaN_3$ | 0.20 | กรัม |
| เติมน้ำให้ครบ | 1 | ลิตร |

PBS ( pH 7.4 ) ในการเตรียมสารละลาย 1 ลิตรใช้สารต่างๆดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 8.00 | กรัม |
| $KH_2PO_4$ | 0.2 | กรัม |
| $Na_2HPO_4.12H_2O$ | 2.9 | กรัม |
| KCl | 0.2 | กรัม |
| $NaN_3$ | 0.2 | กรัม |
| เติมน้ำให้ครบ | 1 | ลิตร |

PBS-Tween

สารละลาย PBS 1 ลิตร หยด Tween 20 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร

antigen (extraction) buffer

นำ PBS – Tween แล้วใส่ PVP-4000 (Polyvinyl pyrolidone 4000) 2 %

conjugate Buffer

นำ PBS – Tween แล้วใส่ PVP-4000 2 % และ 0.2 % ovalbumin

substate Buffer ในการเตรียม 1 ลิตร ใช้สารดังต่อไปนี้

| | | |
|---|---|---|
| Diethanolamine | 97 | มิลลิลิตร |
| $H_2O$ | 800 | มิลลิลิตร |
| $NaN_3$ | 0.2 | กรัม |

ปรับ pH ให้เท่ากับ 9.8 แล้วเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร

**ภาคผนวกที่ก2** สารเคมีที่ใช้ในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

| | | |
|---|---|---|
| 1.potassium phosphate buffer | 0.5M | pH 7.5 |
| 2.potassium phosphate buffer | 0.1M | pH 7.5 |
| 3.sodium citrate buffer | 0.5M | pH 6.5 |
| 4.sodium citrate buffer | 0.1M | pH 6.5 |

การเตรียม buffer

1. potassium phosphate buffer 0.5M pH 7.5

โดยละลายสาร $K_2HPO_4$ ในน้ำกลั่น 2 ลิตร ปรับ pH ให้ได้ 7.5 โดยการใช้ $KH_2PO_4$ 17 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตรเป็นตัวปรับ

2. phosphate buffer 0.1M pH 7.5

โดยใช้สารละลาย Phosphate buffer 0.5 M pH 7.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

3. sodium citrate buffer 0.5M pH 6.5

โดยละลาย citic acid จำนวน 105 กรัม ในน้ำ 1 ลิตรของ NaOH 1 N ทำการปรับ pH ให้เป็น 6.5 โดยการใช้ 0.5 M NaOH ซึ่งปริมาตรของ NaOH 1 N ที่ในสารละลายจะใกล้กับปริมาตรของสารละลาย 0.5 M NaOH ที่ใช้ในการปรับ pH

4. sodium citrate buffer 0.1M pH 6.5

โดยใช้ sodium citrate buffer 0.5M pH 6.5 ปริมาตร 200 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

# ภาคผนวก ข

## ตาราง

**ตารางที่ข1** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายด้วยวิธี Indirect enzyme-linked immunorsorbent assay (Indirect ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชินีสีทอง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

| **ชนิดพืช / ต้นที่** | Antiserum เชื้อ DMV (1:50) ความเข้มข้นของน้ำคั้นพืช | | | Antiserum เชื้อ CMV (1:200) ความเข้มข้นของน้ำคั้นพืช | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1:10 | 1:100 | 1:1000 | 1:10 | 1:100 | 1:1000 |
| เดือนมิถุนายน | | | | | | |
| พลูฉลุ / 1 | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 |
| พลูฉลุ / 2 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 1 |
| พลูฉลุ / 3 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| พลูฉลุ / 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| พลูด่าง / 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| พลูด่าง / 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| พลูด่าง / 3 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| พลูด่าง / 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีหินอ่อน / 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีหินอ่อน / 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีหินอ่อน / 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีหินอ่อน / 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีสีทอง / 1 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีสีทอง / 2 | 4 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีสีทอง / 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีสีทอง / 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| เดือนกันยายน | | | | | | |
| พลูฉลุ / 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| พลูฉลุ / 2 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| พลูฉลุ / 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| พลูฉลุ / 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| พลูฉลุ / 5 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |

**ตารางที่ข1(ต่อ)** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายด้วยวิธี Indirect enzyme-linked immunorsorbent assay (Indirect ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชิสีทอง ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน

| **ชนิดพืช / ต้นที่** | Antiserum เชื้อ DMV (1:50) ความเข้มข้นของน้ำคั้นพืช | | | Antiserum เชื้อ CMV (1:200) ความเข้มข้นของน้ำคั้นพืช | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1:10 | 1:100 | 1:1000 | 1:10 | 1:100 | 1:1000 |
| เดือนกันยายน | | | | | | |
| พลูด่าง / 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| พลูด่าง / 2 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| พลูด่าง / 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| พลูด่าง / 4 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| พลูด่าง / 5 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| ราชินีหินอ่อน / 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีหินอ่อน / 2 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีหินอ่อน / 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| ราชินีหินอ่อน / 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| ราชินีหินอ่อน / 5 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| ราชินีสีทอง / 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| ราชินีสีทอง / 2 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| ราชินีสีทอง / 3 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| ราชินีสีทอง / 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| ราชินีสีทอง / 5 | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 3 |
| เดือนธันวาคม | | | | | | |
| พลูฉลุ / 1 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| พลูฉลุ / 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| พลูฉลุ / 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| พลูฉลุ / 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| พลูฉลุ / 5 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |

**ตารางที่ข2** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay ( direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบแห้งที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | ต้นที่ | ระดับสีของปฏิกิริยาที่อ่านได้ |
|---|---|---|
| พลูฉลุ | 1 | 4 |
| | 2 | 4 |
| พลูด่าง | 1 | 4 |
| | 2 | 4 |
| | 3 | 4 |
| | 45 | 4 |
| | 6 | 4 |
| ราชินีหินอ่อน | 1 | 4 |
| | 2 | 4 |
| | 3 | 4 |
| | 4 | 4 |
| | 5 | 4 |
| | 6 | 4 |
| | 7 | |
| ราชินีสีทอง | 1 | 4 |
| | 2 | 4 |
| | 3 | 4 |

**ตารางที่ข3** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 35 | 1 | 4 |
| | | 2 | 4 |
| | | 3 | 4 |
| | | 4 | 4 |
| | | 5 | 4 |
| | | 6 | 4 |
| | | 7 | 4 |
| | | 8 | 4 |
| | | 9 | 4 |
| | | 10 | 4 |
| | | 11 | 4 |
| | | 12 | 4 |
| | | 13 | 4 |
| | | 14 | 4 |
| | | 15 | 4 |
| | 40 | 1 | 4 |
| | | 2 | 4 |
| | | 3 | 4 |
| | | 4 | 4 |
| | | 5 | 4 |
| | | 6 | 4 |
| | | 7 | 4 |
| | | 8 | 4 |

**ตารางที่ข3(ต่อ)** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 40 | 9 | 3 |
| | | 10 | 2 |
| | | 11 | 2 |
| | | 12 | 3 |
| | | 13 | 2 |
| | | 14 | 2 |
| | | 15 | 3 |
| | 45 | 1 | 4 |
| | | 2 | 4 |
| | | 3 | 3 |
| | | 4 | 3 |
| | | 5 | 3 |
| | | 6 | 3 |
| | | 7 | 4 |
| | | 8 | 2 |
| | | 9 | 3 |
| | | 10 | 4 |
| | 50 | 1 | 3 |
| | | 2 | 2 |
| | | 3 | 3 |
| | | 4 | 2 |

**ตารางที่ข3(ต่อ)** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาทีหลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 50 | 5 | 2 |
| | | 6 | 2 |
| | | 7 | 3 |
| พลูด่าง | 35 | 1 | 4 |
| | | 2 | 4 |
| | | 3 | 3 |
| | | 4 | 4 |
| | | 5 | 4 |
| | 40 | 1 | 3 |
| | | 2 | 4 |
| | | 3 | 4 |
| | | 4 | 4 |
| | 45 | 1 | 2 |
| | | 2 | 2 |
| | | 3 | 3 |
| | | 4 | 3 |
| | | 5 | 3 |
| | | 6 | 2 |
| | | 7 | 2 |

**ตารางที่ข3(ต่อ)** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชิสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูด่าง | 50 | 1 | 1 |
| | | 2 | 3 |
| | | 3 | 3 |
| | | 4 | 2 |
| | | 5 | 1 |
| ราชินีหินอ่อน | 35 | 0 | 0 |
| | 40 | 0 | 0 |
| | 45 | 1 | 4 |
| | 50 | 0 | 0 |
| ราชินีสีทอง | 35 | 1 | 4 |
| | | 2 | 4 |
| | | 3 | 4 |
| | | 4 | 4 |
| | | 5 | 4 |
| | | 6 | 4 |
| | | 7 | 4 |
| | | 8 | 4 |
| | | 9 | 4 |
| | | 10 | 4 |

**ตารางที่ข3(ต่อ)** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMV ที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| ราชินีสีทอง | 40 | 1 | 3 |
| | | 2 | 4 |
| | | 3 | 3 |
| | | 4 | 2 |
| | | 5 | 2 |
| | | 6 | 2 |
| | | 7 | 3 |
| | | 8 | 4 |
| | | 9 | 3 |
| | | 10 | 4 |
| | 45 | 1 | 1 |
| | | 2 | 3 |
| | | 3 | 3 |
| | | 4 | 2 |
| | | 5 | 2 |
| | | 6 | 2 |
| | | 7 | 3 |
| | | 8 | 3 |
| | | 9 | 3 |
| | | 10 | 2 |

**ตารางที่ข3(ต่อ)** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMVที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 2 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| ราชินีสีทอง | 50 | 1 | 1 |
| | | 2 | 2 |
| | | 3 | 2 |
| | | 4 | 3 |
| | | 5 | 3 |

**ตารางที่ข4** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMVที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชิสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 45 | 1 | 2 |
| | | 2 | 2 |
| | | 3 | 2 |
| | | 4 | 2 |
| | | 5 | 2 |
| | | 6 | 2 |
| | | 7 | 2 |
| | | 8 | 2 |
| | | 9 | 2 |
| | | 10 | 2 |
| | | 11 | 2 |
| | | 12 | 2 |
| | | 13 | 2 |
| | | 14 | 2 |
| | | 15 | 2 |
| | | 16 | 2 |
| | | 17 | 2 |
| | | 18 | 2 |
| | | 19 | 2 |
| | | 20 | 2 |
| | | 21 | 2 |
| | | 22 | 2 |

**ตารางที่ข4(ต่อ)** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMVที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูฉลุ | 50 | 1 | 1 |
| | | 2 | 1 |
| | | 3 | 2 |
| | | 4 | 2 |
| | | 5 | 2 |
| | | 6 | 1 |
| | | 7 | 1 |
| | | 8 | 1 |
| | | 9 | 1 |
| | | 10 | 1 |
| พลูด่าง | 45 | 1 | 0 |
| | | 2 | 1 |
| | | 3 | 1 |
| | | 4 | 1 |
| | | 5 | 1 |
| | | 6 | 1 |
| | | 7 | 2 |
| | | 8 | 1 |
| | | 9 | 2 |
| | | 10 | 2 |

**ตารางที่ข4(ต่อ)** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMVที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| พลูด่าง | 50 | 1 | 1 |
| | | 2 | 1 |
| | | 3 | 1 |
| | | 4 | 1 |
| | | 5 | 1 |
| | | 6 | 1 |
| | | 7 | 1 |
| ราชินีหินอ่อน | 45 | 1 | 1 |
| | | 2 | 1 |
| | | 3 | 2 |
| | | 4 | 1 |
| | | 5 | 1 |
| | 50 | 1 | 1 |
| | | 2 | 1 |
| | | 3 | 1 |
| ราชินีสีทอง | 45 | 1 | 1 |
| | | 2 | 1 |
| | | 3 | 1 |
| | | 4 | 1 |
| | | 5 | 1 |
| | | 6 | 1 |

**ตารางที่ข4(ต่อ)** แสดงผลการการค่าปฏิกิริยาของระดับสี ในตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ DMVที่เข้าทำลายพืชด้วยวิธี direct enzyme-linked immunorsorbent assay (direct ELISA) ของพลูฉลุ พลูด่าง ราชินีหินอ่อนและราชีสีทอง ที่ผ่านความร้อนแบบชื้นที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10นาที หลักจากปักชำในสภาพปกติเป็นเวลา 3 เดือน

| ชื่อพืช | อุณหภูมิ (°C) | ต้นที่ | ระดับของปฏิกิริยาสีที่อ่านได้ |
|---|---|---|---|
| ราชินีสีทอง | 45 | 7 | 1 |
| | | 8 | 1 |
| | | 9 | 1 |
| | | 10 | 1 |
| | 50 | 1 | 0 |
| | | 2 | 0 |
| | | 3 | 1 |
| | | 4 | 1 |
| | | 5 | 1 |
| | | 6 | 1 |
| | | 7 | 1 |
| | | 8 | 1 |

# ประวัติผู้เขียน

นางสาววราภรณ์ ทัตพงษ์ศรีธร เกิดเมื่อวันที่ 26 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2520 ที่จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการผลิตพืช) สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2541 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทที่ สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปีการศึกษา 2542 จนถึงปัจจุบัน