**ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี**

**ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช**

**ปริญญา**

**วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์ )**

**เรื่อง**

# การผลิตเดหลีพันธุ์ใบมันให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

# Production of Virus-free *Spathiphyllum wallisii* by Heat Treatment *in vitro*

**โดย**

**นางสาว จิราพร ศรีศาลา**

**ได้พิจารณาเห็นชอบโดย**

**อาจารย์ที่ปรึกษา** .....

**( ผศ. ดร . นวลพรรณ งามยี่สุ่น )**

**ภาควิชารับรองแล้ว**

.....

**( ผศ. ดร. วรเดช จันทรสร )**

**หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช**

**วันที่ 30 เดือน ..... ปี 2558**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18255

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

# การผลิตเดหลีพันธุ์ใบมันให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

Production of Virus-free *Spathiphyllum wallisii* by Heat Treatment *in vitro*

T099031

โดย

นางสาว จิราพร ศรีศาลา

2544

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

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทคัดย่อ


**ชื่อเรื่อง** การผลิตเดหลีพันธุ์ใบมันให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

**โดย** นางสาว จิราพร ศรีศาลา

**ภาควิชา** เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

**อาจารย์ที่ปรึกษา** .....  ..29../..มี.ค../..2545

( ผศ. ดร . นวลพรรณ งามยี่สุ่น )

การศึกษาการผลิตต้นเดหลี (*Spathiphyllum wallisii*) ให้ปลอดโรคไวรัสโดยใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ บริเวณตา นำมาเลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงจาก Murashige +Skoog (MS) โดยใช้ BA (6-Benzylamino purine) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้ Callus และยอดเจริญเติบโตดี จากนั้นทำการทดสอบด้วยวิธี Thermotherapy ที่ระดับอุณหภูมิ 25 , 30 , 35 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งแต่ละอุณหภูมิจะใช้เวลา 3 สัปดาห์ แล้วตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ทำให้การติดเชื้อไวรัสลดลง แต่ก็ไม่ได้ปราศจากเชื้อไวรัสได้ทั้งหมดเมื่อเทียบกับการทดลองเปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสพืชตายทั้งหมด


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ABSTRACT

Title : Production of Virus-free *Spathiphyllum wallisii* by Heat Treatment *in vitro*

By : Miss Jiraporn Srisala

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Department : Pest Management Technology

Advisor :.....N. Ngamyeesoon..... .....29/May/2002

( Asst. Prof. Dr. Nualphan Ngamyeesoon )

The production of viral diseases-free Peace Lily (*Spathiphyllum wallisii*) using heat-treatment incorporated with tissue culture technique was used for this study. In order to study the growing of *S. wallisii* in culture medium, the modified Murashige-Skoog (MS) was used for this experimental observation. The medium was modified by adding the 6-Benzylamino purine (BA) at 2 mg/l of MS culture medium. The modified medium is suitable and good effect for fast growing of callus and meristem tip. Moreover, the thermo-therapy test at 25°C, 30°C, 35°C, and 40°C was also used for testing virus-free peace lily production. Tissue cultures were treated 3 weeks at different temperatures and observed for results. It was found that all samples at 25 and 30°C were positive by detecting with DMV antiserum using ELISA test. While at 35°C, the amount of viral infection in tissue culture decreased as compared with control, whereas at 40°C all plantlets were dead.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำนิยม

กราบขอบพระคุณ ผศ. ดร . นวลพรรณ งามยิ่สุ่น อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษที่ให้คำแนะนำในการศึกษาและดำเนินงาน ในเรื่องของการทดลองและวิธีการต่าง ๆ เพื่อง่ายและสะดวกในการปฏิบัติ การช่วยเหลือในการแก้ไขปัญหาพร้อมทั้งตรวจแก้ไขปัญหาพิเศษให้สมบูรณ์ ผศ .ดร. สุเม อรัญนารถ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาพืชสวน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ ตลอดจนอุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการโรคพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช และห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาการผลิตพืช สาขาพืชสวน ที่ให้ความสะดวกเกี่ยวกับสารเคมี อุปกรณ์และสถานที่ในการทำปัญหาพิเศษ ขอบคุณพี่ ๆ ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ในส่วนของกลุ่มงานไวรัสที่ให้เทคนิคและการปฏิบัติงานเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อรวมถึงขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้

ขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้ความอนุเคราะห์เกี่ยวกับค่าใช้จ่ายในการทำปัญหาพิเศษและเป็นกำลังใจตลอดมารวมถึงเพื่อน ๆ ทุกคนที่ช่วยเหลือในครั้งนี้

จิราพร ศรีศาลา

พฤษภาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ii
คำนิยม.....iii
สารบัญ.....iv
สารบัญตาราง.....v
สารบัญภาพ.....vi
คำนำ.....1
วัตถุประสงค์.....2
การตรวจเอกสาร.....3
อุปกรณ์และวิธีการ.....11
ผลการทดลอง.....18
สรุปและวิจารณ์.....30
เอกสารอ้างอิง.....34
ภาคผนวก.....37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง

หน้า

ตารางผนวกที่

1. สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog ( MS).....37
2. สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบหาปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Enzyme-linked.....38
immunosorbent assay ( ELISA )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

1. ต้นเดหลีพันธุ์ใบมันแสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม .....19
ขนานไปตามแนวเส้นใบ อาการที่ปรากฏจะชัดเจนที่ใบอ่อน
2. แสดงลักษณะอาการด่างของเดหลีพันธุ์ใบมันค่อย ๆ ลดลง.....19
เมื่อเป็นใบแก่
3. ส่วนตาของเดหลีพันธุ์ใบมันจากลำต้นใต้ดินที่แสดงอาการใบด่าง.....20
4. แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ .....20
เป็นเวลา 2 สัปดาห์
5. แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ .....21
เป็นเวลา 1 เดือน
6. แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ .....21
เป็นเวลา 2 เดือน
7. แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ .....22
เป็นเวลา 3 เดือน
8. แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม.....22
ฮอร์โมน BA( 6-Benzylamino purine ) เป็นเวลา 1 เดือน
9. แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม .....23
ฮอร์โมน BA( 6-Benzylamino purine ) เป็นเวลา 2 เดือน
10. แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติม.....23
ฮอร์โมน BA( 6-Benzylamino purine ) เป็นเวลา 3 เดือน
11. แสดงลักษณะอาการของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติที่.....25
ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
12. แสดงลักษณะอาการของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติที่.....25
ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
13. แสดงลักษณะอาการของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติที่.....26
ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

ภาพที่

14 . แสดงลักษณะอาการของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติที่.....26
ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
15 . แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาของพืชทดลอง ที่ทดสอบความร้อนที่ระดับ.....29
อุณหภูมิ ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำนำ

ไม้ประดับและไม้ตัดใบในปัจจุบันพบว่ามีความสำคัญและความต้องการเพิ่มมากขึ้นทั้งภายในและต่างประเทศ สามารถนำมาใช้ประดับและตกแต่งอาคารบ้านเรือน อาคารสำนักงาน สวนหย่อม และสถานที่สาธารณะต่าง ๆ ประเทศไทยนับว่ามีพันธุ์ไม้ประดับที่สวยงามหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นรูปทรง สี ขนาดของใบ การแตกกิ่ง และขนาดของลำต้น ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปตามชนิดและพันธุ์ของไม้ประดับนั้น ๆ การผลิตไม้ประดับในประเทศไทย ปัจจุบันมีการผลิตเป็นการค้ามากขึ้นในลักษณะไม้กระถาง ( pot plant ) ทดแทนการผลิตรายย่อย

พืชในสกุล *Spathiphyllum wallisii* ( เดหลีพันธุ์ใบมัน ) เป็นพันธุ์ไม้ที่มีถิ่นกำเนิดจากประเทศโคลัมเบียและเวเนซูเอลา เป็นไม้ประดับที่มีความโดดเด่นมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากให้ดอกสีขาวที่สวยงาม จึงมักนิยมนำไปเป็นไม้ประดับในอาคาร ปลูกเป็นไม้กระถาง ปลูกประดับสวน เป็นไม้คลุมดินใต้ร่มเงาไม้ใหญ่ นอกจากนี้ยังนิยมปลูกเป็นไม้ดอกล่อแมลงวันทองให้มารวมกันเพื่อการกำจัด ในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถถ่ายทอดได้โดยตรงจากการขยายพันธุ์พืชแบบไม่ใช้เพศ โดยการแยกหน่อซึ่งเป็นการขยายพันธุ์ที่ปฏิบัติในพืชสกุลนี้ จึงควรมีวิธีการในการป้องกันและกำจัดโรค

ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ความร้อน จึงเป็นวิธีที่มีความสำคัญและเป็นประโยชน์ในการควบคุมการแพร่ระบาดของเชื้อและการผลิตท่อนพันธุ์ที่ปราศจาก เพื่อการขยายพันธุ์เป็นการค้าทั้งในและต่างประเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสบนเดหลีพันธุ์ใบมัน
2. เพื่อผลิตพืชให้ปลอดจากไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อร่วมกับการใช้ความร้อน
3. เพื่อตรวจสอบปริมาณการติดเชื้อไวรัสของเดหลีพันธุ์ใบมันหลังจากการทดสอบด้วยความร้อนด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA )



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# การตรวจเอกสาร

เดหลี (Peace Lily ) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spathiphyllum* sp. อยู่ในวงศ์ Araceae ลักษณะพันธุ์มีด้วยกันหลายพันธุ์แต่ที่นิยมนำมาตกแต่งอาคาร ได้แก่ เดหลีใบมัน และเดหลีใบกล้วย

เดหลีเป็นไม้ประดับที่มีสีเขียวเข้มมันเป็นวาว ดอกเป็นช่อสีขาวหรือขาวแกมเหลือง กาบหุ้มช่อดอกสีขาวคล้ายดอกหน้าวัว โดยธรรมชาติเดหลีชอบขึ้นอยู่ตามลำธารที่มีร่มเงาในป่าฝนเขตร้อน แต่เมื่อนำมาปลูกเป็นไม้ประดับในอาคารเดหลีก็สามารถปรับตัวได้ดีแม้จะมีความชื้นต่ำและรับแสงจากหลอดไฟฟ้า เพียงแต่ดินต้องมีความชุ่มชื้นอยู่เสมอ เดหลีสามารถดูดสารพิษจำพวกแอลกอฮอล์ อาซีโตน ไตรคลอไรเอทีรีน เบนซีนและฟอร์มาดีไฮด์และสามารถดูดได้ปริมาณมาก จึงไม่ควรลืมที่จะนำเดหลีมาประดับไว้ในสำนักงานหรือบ้านเรือน( ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ , 2536 , 2539 )

เดหลีพันธุ์ใบมัน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Spathiphyllum wallisii* ลักษณะของทรงพุ่มจะสูงประมาณ 40 เซนติเมตร ความสูง 50 เซนติเมตร มีลำต้นเป็นเหง้าอยู่ใต้ดินแล้วแตกหน่อเป็นกอใบเป็นใบเดี่ยว กว้าง 10 - 15 เซนติเมตร ยาว 20 - 30 เซนติเมตร ปลายใบแหลมแคบยาว ก้านใบยาว 20 - 30 เซนติเมตร จุดเด่นของดอกมีจานดอกสีขาวเวลาออกดอกจะแทงก้านขึ้นมา ยาว 20-30 เซนติเมตร มีใบประดับที่เรียกว่า จานดอก มีลักษณะเป็นกาบหรือจานรูปหัวใจปลายแหลมกว้าง 8 - 12 เซนติเมตร ยาว 12 - 20 เซนติเมตร ส่วนที่ให้กลิ่นหอมจะอยู่ที่ช่อดอกซึ่ง เรียกว่า ปลี ลักษณะเป็นทรงกระบอกมีดอกเล็ก ๆ เรียงติดต่อกัน มีกลิ่นหอมเย็น จะบานและส่งกลิ่นหอมล่อแมลงได้มากที่สุดในช่วงสี่โมงเย็น ในการดูแลรักษา เดหลีเป็นพืชที่ขยายพันธุ์โดยการแยกกอ ต้องการแสงแดดรำไร อุณหภูมิ 18-24 องศาเซลเซียส มีความต้องการความชื้นสูงและน้ำปานกลาง ดังนั้นควรรดน้ำอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้ดินมีความชุ่มชื้น ควรรดน้ำมากขึ้นถ้าอากาศร้อน แต่ถ้าอากาศเย็นก็ลดปริมาณการรดน้ำลง หมั่นทำความสะอาดใบจะช่วยป้องกันแมลงและโรค ( ปิยะ , 2540 )

วงศ์ Araceaeประกอบด้วยพืชมากกว่า100 ตระกูล และ1,500 ชนิด รวมถึง *Spathiphyllum* sp. ซึ่งเป็นไม้ประเภทตัดใบ พืชพวก aroids ( aroids เป็นชื่อที่ใช้เรียกพืชในวงศ์ araceae ) ทั้งหมดจะถูกทำลายได้โดยง่าย โดยการติดเชื้อแบบเรื้อรัง aroid นี้มักจะติดเชื้อจากโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส เชื้อที่เข้าทำลาย คือ Dasheen Mosaic Virus (DMV ) Tompkins and Gardner ( 1934 ) รายงานว่าเชื้อ DMV ทำให้พืชแสดงอาการแบบ systemic ใน Araceae มีอาการแตกต่างกันโดยเฉพาะอาการที่สามใบแรกไม่ชัดเจนทำให้บอกความแตกต่างจากพืชธรรมชาติได้ยาก ส่วนใน *Caladium* sp. และใน Calla Lily ( *Zantedeschai* spp. ) อาการจะชัดเจนและมีอาการด่างที่สามใบแรกซึ่งมีอาการใบหดร่วมด้วย นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการถ่ายทอดโดยวิธีกลของเชื้อไวรัส ลักษณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบ Flexous rod( เป็นเส้นสายขนาดเล็กจัดอยู่ในกลุ่ม potyvirus หรือเรียกว่าflexible thread )พบอาการใน aroid ที่มีการขยายพันธุ์แบบปกติ เชื้อที่มีความสัมพันธ์กับพวก Araceae คือ tomato spotted wilt จากการศึกษาของ Zettler *et. al.*, ( 1970) ; Alconero and Zettler ( 1971 ) ; Chase and Zettler ( 1982 ) พบว่า เดหลีเป็นพืชที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ DMV ทำให้เกิดอาการใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม อาการด่างเป็นแถบขนานกับเส้นใบ และพบอาการของพืชอื่น ๆ ที่ถูกเชื้อ DMV เข้าทำลาย เช่น *Aglaonema* , *Alocasia* , *Amorphophallus* , *Arisaema* , *Caladium* , *Crytosperma* จะทำให้เกิดอาการด่างบนใบพืช พวก *Colocasia* , *Xanthosoma* จะทำให้เกิดอาการด่าง (mosaic) และ chlorotic feathering ส่วนพวก *Zantedeschai* , *Dieffenbachia* , *Cryptocoryne* , *Philodendron* จะทำให้เกิดอาการใบด่าง ( mosaic ) และ leaf malformation

เชื้อ DMV มีรายงานการเข้าทำลายพืชในวงศ์ Araceae ซึ่งรวมถึงสกุล *Spathiphyllum sp.* ครั้งแรก ในรัฐ Florida โดย Zettler *et. al.*, ( 1970) เชื้อนี้สามารถเข้าทำลายพืชส่วนใหญ่ในวงศ์ Araceae แต่มีพืชอาศัยในวงศ์อื่นค่อนข้างแคบ เชื้อ DMV จัดอยู่ในกลุ่ม Potyvirus เนื่องจากผลการทดสอบชนิดของพืชอาศัยและผลของปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยา ( Hill and Wright , 1980 ) รวมทั้งอนุภาคของเชื้อมีลักษณะเป็นท่อนยาวคดงอ ( Flexuous rod ) ขนาด 750 นาโนเมตร และการตรวจพบ inclusion body แบบ pinwheel ในส่วน cytoplasm ของเซล ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อ DMV ( Abo El-Nil *et. al.*, 1977 ; Christie and Edwardson , 1977 ; Zettler *et. al.*,1978 ) โดยก่อนหน้านี้มีการสรุปคุณสมบัติของ DMV ว่าเหมือนกับ Potyvirus อื่น ๆ คือ DMV จะมีอนุภาคเฉลี่ย 700-800 นาโนเมตร ซึ่งก่อให้เกิดผลึก cylindrical inclusion และสามารถถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน ด้วยวิธี stylet borne นอกจากนี้ capsid protein ของเชื้อจะมีความเกี่ยวข้องทางเซรุ่มวิทยากับ capsid protein ของ potyvirus อื่นๆ ด้วย การแพร่กระจายของเชื้อ DMV จะแพร่กระจายในเขตร้อนและกึ่งเขตร้อน คุณสมบัติของอนุภาคในน้ำคั้นของพืชที่เป็นโรค อุณหภูมิที่เชื้อยังคงสภาพ (TIP ) อยู่ระหว่าง ; 60-65 องศาเซลเซียส ระยะเวลาที่เชื้อยังสามารถก่อโรคได้ ( LIV ) ; อยู่ระหว่าง 3-4 วัน ( ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส และจุดที่เป็น dilution end point ( DEP ) อยู่ที่ $1:10^{-2}$- $1:10^{-3}$ ( Alconero , 1972 ; Abo El-Nil *et. al.*, 1977 ; Brunt *et. al.*, 1995 ) เชื้อ DMV จะถ่ายทอดโดยมีแมลงพาหะ มีรหัสพันธุกรรมเป็น RNA ชนิดสายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดนิวคลิอิก 5 % โปรตีน 95 % พบไวรัสในเซลล์ชั้นมีโซฟิลล์ อีพิเดอร์มิส และอาจพบในท่อลำเลียงอาหาร ( Brunt *et. al.*, 1995 )

การแพร่กระจายไปทั่วโลกของ DMV เป็นผลมาจากหลายปัจจัย

-ประการแรกคือ DMV ส่วนใหญ่จะติดเชื้อเรื้อรังมากกว่าการติดเชื้อถึงตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-ประการที่สองคือ DMV มีคุณสมบัติเหมือน potyvirus อื่น ๆ คือ มีการถ่ายทอดโดย เพลี้ยอ่อน ( Morales , 1977) 2 ชนิด ได้แก่ *Aphis gossypii* และ *Myzus persicae* ซึ่งรู้จักกันดีว่าเป็นพาหะ ของ DMV

-ประการที่สาม เนื่องจากมีการปลูก aroid จึงเท่ากับเป็นการส่งเสริมให้มีการแพร่กระจาย แม้ว่า DMV ไม่เป็น seed borne ( Zettler , 1978 ) ซึ่งก่อให้เกิดปัญหากับ aroid ส่วนใหญ่หลายชนิด

-ประการสุดท้าย ความสำคัญแห่งพืชกรรมของ aroid ในฐานะที่เป็นพืชอาหาร และไม้ประดับก็เป็นสาเหตุประการสุดท้ายที่ก่อให้เกิดการแพร่กระจายของ DMV ซึ่งพืชพวก aroid ได้ถูกปลูกมานานแล้วก่อน 500 ปี ก่อนคริสตร์ศักราช

การควบคุมเชื้อ DMV ในพืช aroid ตัวแรกที่ประสบความสำเร็จโดยการปลูกเลี้ยงในเนื้อเยื่อ ก็คือ *Caladium* sp. และ *Colocasia* sp. และตั้งแต่นั้นเป็นต้นมาวิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้มีการปรับปรุงและประสบความสำเร็จและประยุกต์ใช้กับ aroid ตัวอื่นหลายชนิด ( Hartman *et. al.*, 1974 )

**การรักษาพืชให้ปลอดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส**

การรักษาที่ดีที่สุดสำหรับโรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัส คือ การป้องกันโดยไม่ปลูกพืชลงในพืชที่ที่มีเชื้อไวรัสเข้าทำลาย ใช้เมล็ดและท่อนพันธุ์ที่ปราศจากโรคจากการปฏิบัติทางการเกษตรที่พิเศษจำเป็นต่อการทำให้แน่ใจว่าพืชที่ปลูกนั้นไม่เป็นโรค ส่วนที่ใช้ขยายพันธุ์ของพืชอันได้แก่ หัว ตา หน่อ ฯลฯ จะต้องแน่ใจว่าไม่มีการเข้าทำลายของโรคปรากฏอยู่โดยเด็ดขาด เพราะหากมีการเข้าทำลายของโรคอยู่แม้เพียงเล็กน้อย แล้วนำไปขยายพันธุ์ต่อก็เป็นการแพร่กระจายของเชื้อโรคได้ ดังนั้นในการขยายพันธุ์จำเป็นต้องมั่นใจว่าชิ้นส่วนที่ขยายพันธุ์นั้นปราศจากโรคอย่างแท้จริง ซึ่งวิธีการเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อก็เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถทำให้ปราศจากไวรัสได้

การศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจริง ๆ เกิดขึ้นในช่วงปี คศ. 1838-1839 เมื่อนักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน 2 คน คือ M.J. Schleiden (1838 ) และ T. Schwann ( 1839 ) มีแนวความคิดว่าเซลของพืชสามารถเจริญเป็นต้นได้ หลังจากนั้นมีนักวิทยาศาสตร์หลายคน ทำการศึกษาต่อมา จนถึงปี ค.ศ 1893 ซึ่ง C. Rechinger คิดว่าส่วนใด ๆ ของพืชอาจพัฒนาต่อไปเมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำยาในห้องทดลองโดยใช้ *Populus* sp., *Beta* sp., *Fraxinus* sp., *Brassica* sp., *Coleus* sp. ฯลฯ ( White , 1943 ) ช่วงเดียวกันนี้มีนักกล้วยไม้ชาวอังกฤษได้พยายามเพาะเลี้ยงกล้วยไม้ *Phalaenopsis* sp. จากตาก้านดอกสำเร็จนับเป็นครั้งแรกที่ใช้ส่วนของพืชในการขยายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเป็นการนำส่วนที่มีชีวิตของพืชมาเลี้ยงบนอาหารสังเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่ควบคุมได้ทั้งแสง ความชื้นและอุณหภูมิ ใช้สร้างพืชปราศจากโรคได้ ( สุรวิช , 2524 ) จากรายงานของ De Viries – Paterson *et. al.*, (1992 ) กล่าวว่าในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน apical shoot tips ที่ติดเชื้อ asparagus virus I ( AV-I ) และ asparagus virus II ( AV-II ) นั้นมีต้นพืชที่ได้คิดเป็น 8.6 เปอร์เซ็นต์ ที่ปลอดจากเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดซึ่งการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจทำร่วมกันกับวิธีอื่น เช่น Heat treatment ก็ได้ ในที่สุดก็จะได้พืชที่ปราศจากไวรัส และจากต้นที่ได้นี้จึงนำไปขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนต่อไป

การกำจัดเชื้อไวรัสโดยใช้ความร้อนได้มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เพื่อผลิตพืชปลอดโรค เช่น Rose Mosaic Virus รักษาโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ( Krussmann , 1981) ปัจฉิมาและคณะ ( 2532 ) ได้นำเบญจมาศ (*Chrysanthemum morifolium* ) พันธุ์ Seiko-no-hana ที่แสดงอาการเนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายทำให้เกิดอาการใบด่าง ใบด่างอย่างอ่อน เส้นใบเหลือง กลีบดอกบิด และการคลี่บานของกลีบดอกไม่สม่ำเสมอ มาทดลองเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 37 +- 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 , 2 , 3 , 4 , 5 และ 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิปกติ ก่อนที่จะนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญ แล้วเลี้ยงบนอาหารสูตรที่ดัดแปลงจากของ Murashige and Skoog (1962) โดยใช้ BAP 0.4 ppm และ IAA 0.05 ppm หลังจากที่ต้นเบญจมาศเจริญจนมีความสูง 3-4 เซนติเมตร และมีระบบรากแข็งแรงแล้วนำมาย้ายปลูกในเครื่องปลูกที่ฆ่าเชื้อ เพื่อทดสอบหาไวรัสพบว่าเบญจมาศที่ได้จากกลุ่มที่เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิสูงติดต่อกันถึง 6 สัปดาห์ จะปลอดจากเชื้อไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของต้นที่ปลอดเชื้อและขนาดความยาวของก้านดอกจะแตกต่างกับต้นที่มีเชื้อไวรัสอย่างเห็นได้ชัด และจากการทดสอบบนพืชทดสอบ ได้แก่ *Chenopodium amaranticolor* และ *Nicotiana glutinosa* ตลอดจนรูปร่างของไวรัสที่ได้จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนสามารถสรุปได้ว่าไวรัสสาเหตุของโรคเบญจมาศในกลุ่มที่ศึกษาครั้งนี้เป็น Chrysanthemum Virus B กับไวรัสอีกชนิดหนึ่งที่ยังไม่อาจสรุปได้แน่ชัดว่าเป็น Tomato Aspermy Virus หรือไม่

Paet and Zamora (1990 ) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยใช้ส่วนของ shoot 8 สายพันธุ์ของมันฝรั่ง ร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ในที่มืด และให้แสง 16 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส ทุกวันในระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า plantlet ของพืช มีการฟื้นคืนสภาพใหม่ 65-95 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ปลอดจาก potato Y potyvirus , potato S carlavirus และ potato leaf roll luteovirus ได้ถึง 93-100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Svoboda ( 1992 ) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงต้น hop ( *Himulus lupulus* L. ) ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ส่วนของเนื้อเยื่อเจริญ พันธุ์ Osvald's Clone ( OC ) 72 , OC 31 , OC 114 , Zlatan , Sirem และ Universal นำมาเลี้ยงในสูตรอาหารที่ดัดแปลงจาก Murashige + Skoog ( MS ) โดยใช้ IAA 10 μM , Kinetin 8 μM และ Gibberellic acid ( $GA_3$ ) 1 μM (สูตร 1 ) หรือ IBA 10 μM , BA 10 μM , $GA_3$ 1 μM (สูตร 2 ) สำหรับอาหาร MS ที่เติมสูตร 1 จะทำให้ callus เป็นสีน้ำตาล การเจริญเนื้อเยื่อเสื่อมลงและตายในที่สุด ถ้าใช้สูตร 2 จะทำให้ callus และยอดเจริญเติบโตดี จากนั้นทำการทดสอบด้วยวิธี Thermotherapy ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 38 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 19 วัน ทำให้ได้ plantlets สูง 5-10 เซนติเมตร รากยาว 2-3 เซนติเมตร

Faccioli and Colombarini ( 1996 ) ได้ทำการตรวจสอบการติดเชื้อ potato S carlavirus ( PVS ) และ potato M carlavirus ( PVM) ของมันฝรั่ง โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน meristem tips ร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 26 วัน แล้วตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าปลอดจากเชื้อไวรัส 85 เปอร์เซ็นต์

Bruna *et. al.*, ( 1997 ) ทำการศึกษาการผลิตกระเทียมในประเทศ Chile ซึ่งเกิดจากการติดเชื้อ Onion yellow dwarf potyvirus (OYDV ) จึงมีการผลิตกระเทียมเพื่อให้ปลอดจากไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายร่วมกับการทำ Thermotherapy โดยแบ่งการทดลองเป็น ครั้งแรก ใช้ cloves ของกระเทียมพันธุ์ Rosado – INIA ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 38 องศาเซลเซียส 8 วัน ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงกลุ่มที่เป็น control ที่ 20 องศาเซลเซียส 45 วัน เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าเนื้อเยื่อเจริญส่วนปลายที่เลี้ยงบนอาหาร B5 และ MS จะเจริญแยกจากเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-0.8 มิลลิเมตร จากนั้น 3 เดือนต่อมาทำการย้ายต้นอ่อน แล้วตรวจสอบด้วยวิธี ELISA ต้นอ่อนที่เจริญจาก explant จะปลอดจาก OYDV 65 เปอร์เซ็นต์ ในส่วนของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเมื่อเกิดการติดเชื้อจะควบคุมด้วยวิธี Thermotherapy ที่ 38 องศาเซลเซียส จะทำให้ปลอดจากไวรัส OYDV 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองที่สอง เริ่มทำการทดลองที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลาในการทดสอบต่างกัน คือ 48 , 54 , 60 , 67 และ 75 วัน แล้วตรวจ ELISA จากผลการทดลองทำให้พืชปลอดจากไวรัส 100 เปอร์เซ็นต์ จากที่ใช้เวลา 48-75 วัน ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส และการมีชีวิตรอดของพืชจะลดลงเหลือ 95 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลอง 48 วัน ถึง 62 เปอร์เซ็นต์ ใน 75 วันที่ทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gella and Errea ( 1998 ) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน shoot culture ทดสอบกับพืชในกลุ่มของ Prunus 3 พันธุ์คือ apicot ( *P. armeniaca* ) ติดเชื้อ apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV ) , peach *( P. persica* ) ติดเชื้อ prunus necrotic ring spot ilarvirus (PNRSV ) และ ACLSV , sour cherry ( *P. avium* ) ติดเชื้อ prune dwarf ilarvirus ( PDV ) และ ACLSV ทำการทดลองร่วมกับการทำ heat therapy นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับพันธุ์และชนิดของพืชที่ใช้ทดลองอยู่ระหว่าง 15-36 วัน ซึ่งจะทำให้ปราศจากเชื้อ ACLSV 60-100 เปอร์เซ็นต์ , PNRSV 37-100 เปอร์เซ็นต์ และ PDV 85-100 เปอร์เซ็นต์ จากวิธีดังกล่าวได้มีการนำไปเปรียบเทียบใช้ในการกำจัดไวรัสในไม้ผลแต่ละชนิด

**การวินิจฉัยและการตรวจสอบคุณสมบัติของเชื้อไวรัส**

การวินิจฉัยและศึกษาคุณสมบัติของเชื้อไวรัสที่ได้ผลดีในการตรวจหาปริมาณของเชื้อไวรัสว่ามีการติดเชื้ออยู่กับพืชหรือไม่จะใช้วิธีการทดสอบด้วยวิธีการทางเซรุ่มวิทยา โดยทดสอบแบบ Enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ) เทคนิค ELISA ได้มีการดัดแปลง ตลอดมาเพื่อความสะดวกและแม่นยำในการตรวจสอบ วิธีที่นิยมคือของ Clark and Adams (1977 ) เรียกว่า double antibody sandwich method โดย plate ที่ใช้ในการทดสอบคือ polystyrene plate และ enzyme ที่ส่วนใหญ่นิยมใช้ คือ alkaline phosphatase โดยขั้นแรกเคลือบ plate ด้วย Ig-G ที่สกัดจากแอนติซีรัมที่ต้องการทดสอบ แล้วใส่น้ำคั้นของพืชลงไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการล้าง plate ก่อน เติมเอนไซม์ conjugate ลงไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสประมาณ 3-4 ชั่วโมง เทออกแล้วใส่ substrate ที่นิยมใช้ คือ p- nitrophenyl phosphate ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์จากไม่มีสีเป็นสีเหลือง ปฏิกิริยาการเกิดสีนี้สามารถทำให้หยุดได้โดยการหยดสารละลาย NaOH เข้มข้นลงหลุมก่อนการอ่านผลโดยดูจากสีที่เกิดขึ้น โดยสามารถตรวจสอบด้วยตาเปล่าหรือการใช้ colorimeter

ELISA เป็นวิธีการที่มีคุณภาพในการตรวจสอบและประเมินโรคไวรัสพืช และมีส่วนสำคัญยิ่งในการเพิ่มความสามารถของนักไวรัสพืช ELISA กลายเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการทดสอบทางเซรุ่มวิทยาของไวรัสพืชเนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย เร็ว ปรับใช้ได้หลากหลาย ความไวของปฏิกิริยาสูง และมีความแม่นยำสูง นอกจากนี้ ELISA นำมาใช้ตรวจตัวอย่างจำนวนมาก ๆ ให้ผลแน่นอนในเวลาอันรวดเร็ว สามารถตรวจหาไวรัสที่มีปริมาณน้อยและอนุภาคแตกหักที่ไม่สามารถบอกได้แน่ชัดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน สามารถนำมาใช้ศึกษาความสัมพันธ์ของไวรัสชนิดเดียวกันและไวรัสต่างชนิดกัน ( ปราณี , 2530 )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zettler *et. al.*, ( 1970 ) รายงานว่าการใช้เทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA ) เพื่อตรวจสอบน้ำคั้นของพืชในตระกูล Araceae ที่ถูกเชื้อ DMV เข้าทำลาย ได้แก่ *Dieffenbachia picta* และ *Philodendron selloum* จากการอ่านผลที่เกิดขึ้นพบว่า *Dieffenbachia picta* มีค่าการดูดซับแสงสูงกว่า *Philodendron selloum*

เปรียบเทียบประสิทธิภาพและความไวต่อการทดสอบทางเซรุ่มวิทยา ( Walkey , 1985 )

| วิธีการทดสอบ | ปริมาณต่ำสุดของเชื้อไวรัสที่สามารถตรวจสอบได้ ( mg ) |
|---|---|
| Gel diffusion test | 1000 |
| Precipitin tube test | 500 |
| Electron microscopy | 100 |
| E.M. serology | 1 |
| ELISA | 1 |

นวลพรรณ ( 2538 ) ทำการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาโดยเทคนิค Immunosorbent Electron Microscopy ( ISEM ) จากน้ำคั้นของตัวอย่างใบพืชในสกุล *Dieffenbachia* sp. 5 ชนิดกับเซรุ่มของเชื้อ Dashhen mosaic virus ( DMV ) titer 1: 1024 จากการตรวจสอบพบว่า เชื้อ DMV จะเข้าทำลาย *D. amoena* ' Hybrid' , *D. oerstedii* , *D. maculata* ' Perfection' และ *D. maculata* ' Snowdrop' แต่จะไม่เข้าทำลาย *D. maculata* ' Rudolph Rochrs '

วิรุฬห์รัตน์ และ ศิริพร ( 2538 ) ได้ทำการศึกษาโดยนำโปรโตคอร์มของกล้วยไม้ *Dendrobrium Jaquelgn* Thomas ที่เกิดโรคยอดบิด Cymbicium mosaic virus เลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็งสูตร Vacin and Went มีการเติมสาร 1 —Adamantanamine hydrochloride แล้วตรวจสอบเชื้อไวรัส CyMV โดยเทคนิค ELISA พบว่าปลอดจากเชื้อไวรัส 48.64 เปอร์เซ็นต์

สุรภี และคณะ ( 2538 ) ได้ทำการศึกษาการจำแนกเชื้อไวรัสจากตัวอย่างโรคใบด่างของแกลดิโอลัส และการแยกเชื้อเดี่ยวเพื่อนำมาศึกษาลักษณะอาการเปรียบเทียบความรุนแรงของเชื้อแต่ละชนิด และใช้ประโยชน์ในการผลิตแอนติซีรัม โดยการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA จากการตรวจสอบโรคใบด่างของแกลดิโอลัสพบว่าเกิดจากเชื้อไวรัส 2 ชนิด คือ Cucumber Mosaic Virus ( CMV ) เป็นไวรัสชนิดกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 28-30 นาโนเมตร มีพืชอาศัยส่วนใหญ่อยู่ในตระกูลแตง ซึ่งทำให้เกิดอาการด่างเป็นขีดประระหว่างเส้นใบ ดอกและกลีบดอกด่าง ช่อดอกสั้น แตกกอมากมีสีเหลืองซีดทรุดโทรม และเชื้อ Bean Yellow Mosaic Virus ( ByMV )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นไวรัสชนิดท่อนยาวคดยาวประมาณ 720-750 นาโนเมตร มีพืชอาศัยส่วนใหญ่อยู่ในตระกูลถั่ว ทำให้เกิดอาการด่างเป็นปื้นสีขาวเล็ก ๆ บนใบ ช่อดอกสั้นดอกมีขนาดเล็ก ใบบิดเบี้ยว อาจมีอาการปลายใบแห้งด้วย นอกจากนี้ยังทำการศึกษาการควบคุมโรคด่างแคระแกรนของคาร์เนชั่นที่เกิดจากเชื้อ Cauliflower Mosaic Virus ( CaMV ) โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วตรวจสอบด้วยวิธี ELISA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# อุปกรณ์และวิธีการ

## อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะการเจริญของเดหลีพันธุ์ใบมันที่ติดเชื้อไวรัสในสภาพปลอดเชื้อ

1.1 พืชทดลอง คือ เดหลีพันธุ์ใบมันที่แสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม อาการด่างเป็นแถบขนานกับเส้นใบ ซึ่งใช้ส่วนของลำต้นใต้ดินบริเวณตาในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารสูตร Murashige & Skoog ( MS ) (1962 ) (ภาคผนวกที่ 1 )

1.2.2 ฮอร์โมนที่ใช้ในการเตรียมอาหาร MS คือBA( 6-Benzylamino purine ) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.2.3 น้ำตาล วุ้นและน้ำกลั่น

1.2.4 Beaker , Flask , Cylinder และแท่งแก้วคน

1.2.5 Pipette และลูกยาง

1.2.6 ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อขนาดกลางพร้อมฝาปิด

1.2.7 หม้อ ทัพพีและกรวย

1.2.8 pH meter

1.2.9 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่งและ 4 ตำแหน่ง

1.2.10 หม้อนึ่งความดันไอ

1.211 ตู้เย็นสำหรับเก็บสารเคมี สารละลายเข้มข้น ( stock solution ) และ growth regulators

1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนพืช

1.3.1 กรรไกรสำหรับตัดแต่งกิ่ง

1.3.2 แปรงสำหรับขัด

1.3.3 Beaker

1.3.4 ผ้าขาวบาง

1.3.5 Ethanol 70 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.6 Clorox 20 และ 30 %

1.3.7 น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ( Sterile water )

1.3.8 ขวดเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.4.1 ชิ้นส่วนเดหลีพันธุ์ใบมันที่ฟอกฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว

1.4.2 อาหารสูตร MS ปกติ และ สูตร MS ที่เติม BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.4.3 มีดผ่าตัดพร้อมด้าม และปากคีบ

1.4.4 Petri dishes

1.4.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์ และไม้ขีดไฟ

1.4.6 Ethanol 70 % และ 95 %

1.4.7 ผ้าสะอาดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วสำหรับเช็ดทำความสะอาดตู้ย้ายเนื้อเยื่อ

1.4.8 ตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ( Lamina air-flow cabinet )

1.5 ห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.5.1 ผ้าสะอาดและ Ethanol 70 % สำหรับเช็ดทำความสะอาดชั้นวางเนื้อเยื่อ

1.5.2 ชั้นสำหรับวางขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.5.3 หลอดไฟ cool white หรือ grolux ความเข้มแสง 3,000-10,000 lux

1.5.4 เครื่องตั้งเวลาปิด-เปิดไฟ มืด : สว่าง = 8 : 16 ชั่วโมง

1.5.5 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ตามปกติคือ 25 องศาเซลเซียส

1.6 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำ Heat treatment

1.6.1 พืชที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

1.6.2 แอลกอฮอล์และผ้าที่อบฆ่าเชื้อแล้วสำหรับทำความสะอาดตู้

1.6.3 ตู้บ่มเชื้อ ( INCUBATOR )

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบ Enzyme – linked Immunosorbent Assay ( ELISA ) แบบ indirect ELISA

2.1 polystyrene plates

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบ (ภาคผนวกที่ 2 )

2.3 antiserum ของเชื้อ Dasheen Mosaic Virus ( DMV ) titre 1:128 ได้รับความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 antiserum ของเชื้อ Dasheen Mosaic Virus ( DMV ) titre 1:128 ได้รับความอนุเคราะห์จากกลุ่มงานไวรัส กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

2.4 Beaker

2.5 Micro pipette , pipette และลูกยาง

2.6 ถุงพลาสติกเล็ก ๆ สำหรับบดตัวอย่างพืช

2.7 กล่องใส่น้ำแข็ง

2.8 กระดาษทิชชู หรือผ้าสะอาด

2.9 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง

2.10 ตู้เย็นสำหรับเก็บ polystyrrne plates ขณะบ่ม

3. อุปกรณ์สำหรับบันทึกผล

3.1 กระดาษ และปากกา

3.2 กล้องถ่ายรูป พร้อมฟิล์ม

**วิธีการ**

**1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นเคหลีพันธุ์ใบมันในสภาพปลอดเชื้อ**

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อ

สูตรอาหารที่ใช้มีดังนี้

1.ใช้อาหาร MS ปกติที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต

2.ใช้อาหาร MS โดยเติม BA( 6-Benzylamino purine ) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

การเตรียมอาหารสูตร MS จากสารละลายเข้มข้น ( stock solution ) ( ภาคผนวกที่ 2 ) โดยนำสารละลายเข้มข้นแต่ละชนิดมารวมกัน แล้วเติมน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.5-5.7ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 N หรือสารละลาย HCl ความเข้มข้น 1 N ปรับปริมาตรสารละลายอาหาร ให้ครบตามที่ต้องการเตรียม ในกรณีนี้ คือ 1,000 มิลลิลิตร เติมวุ้น 8 กรัมต่อลิตร ลงไปในส่วนผสมดังกล่าวนำไปตั้งไฟอ่อน ๆ เคี่ยวจนวุ้นละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำอาหารที่ได้เทใส่ขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อ ขวดละ 20 มิลลิลิตร ปิดฝาขวดให้แน่น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ ( Autoclave ) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเดหลี

นำต้นเดหลีที่มีอาการใบด่างจากการติดเชื้อไวรัส ที่เก็บจากเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร ซึ่งพันธุ์ที่เก็บมานี้คือ เดหลีพันธุ์ใบมัน นำมาตัดใบและรากออกอย่างระมัดระวัง ให้เหลือแต่ส่วนลำต้นใต้ดิน นำมาล้างเศษดินออกด้วยน้ำประปา โดยใช้แปรงขัดอย่างเบา ๆ เพื่อให้เศษดินและสิ่งสกปรกออก จากนั้นล้างด้วยน้ำสบู่อีกครั้ง ทำการฟอกฆ่าเชื้อโดยผ่านน้ำไหล 30 นาที จากนั้นย้ายชิ้นส่วนเข้าภายในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ ทำการแช่ชิ้นส่วนใน ethanol 70 % เป็นเวลา 3 นาที โดยเขย่าขวดเบา ๆ ตลอดเวลา จากนั้นก็ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารละลาย clorox เข้มข้น 30 % เป็นเวลา 30 นาที และสารละลาย clorox เข้มข้น 20 % เป็นเวลา 30 นาที การฟอกทุกครั้งต้องใส่ Tween 20 จำนวน 2-3 หยดเพื่อช่วยลดแรงตึงผิวทำให้การฟอกดีขึ้น ขณะฟอกต้องเขย่าขวดฟอกเบา ๆ ตลอดเวลา ก่อนนำไปล้างด้วยน้ำกลั่นซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

1.3 การเพิ่มปริมาณของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่ติดเชื้อไวรัสโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร

เมื่อทำการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนเรียบร้อยแล้ว ใช้มีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดบริเวณโคนก้านใบที่บอบช้ำทิ้ง ตัดเฉพาะส่วนตาที่อยู่บริเวณลำต้นใต้ดิน นำไปเลี้ยงในอาหาร MS สูตรปกติ ที่เตรียมไว้ ปิดฝาให้สนิท ซึ่งขั้นตอนนี้จะกระทำในตู้ย้ายเนื้อเยื่อ เพื่อป้องกันไม่ให้มีเชื้ออื่น ๆ และอุปกรณ์ทั้งหมดต้องผ่านการฆ่าเชื้อ เมื่อพืชอายุครบ 3 เดือน ทำการย้ายลงในอาหาร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณของต้นเดหลีใบมัน บันทึกชนิดของพืช ชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงและวัน เดือน ปี ที่ทำการเพาะเลี้ยงนำขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อเก็บไว้บนชั้นภายในห้องเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ที่ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 3,000- 10,000 lux ให้ช่วงแสงในแต่ละวัน มืด : สว่าง ( 8 : 16 ชั่วโมง ) ทำการเปลี่ยนอาหาร ( subculture ) ทุก ๆ 4 สัปดาห์ ในอาหารชนิดเดิม ก่อนการทำ Heat treatment หากมีการปนเปื้อน ( contamination ) ให้รีบแยกออก นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วล้างขวดให้สะอาด

**2. การผลิตพืชปลอดโรคไวรัสโดยวิธี Heat treatment**

จากการเพิ่มปริมาณของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่ติดเชื้อไวรัส โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อพืชอายุครบ 3 เดือน ทำการตัดแยกเป็นต้นเดี่ยวๆ แล้วย้ายลงในอาหารสูตร MS ปกติ เพื่อทดสอบ Heat treatment ซึ่งขนาดของต้นที่ใช้มีความสูงประมาณ 3-5 เซนติเมตร จากนั้นนำเข้าตู้ Incubator โดยเซ็ตตู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยแอลกอฮอล์แล้วจึงพืชที่ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 , 35 , 40 องศาเซลเซียส ใช้ treatment ละ 20 ขวดโดยที่แต่ละอุณหภูมิจะใช้เวลาในการทดลอง 3 สัปดาห์ และทำการควบคุมแสงโดย มืด : สว่าง ( 8 : 16 ชั่วโมง ) เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิปกติ ( ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ) สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น หลังจากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณของเชื้อไวรัสโดยวิธี ELISA ของแต่ละอุณหภูมิ โดยใช้เซรุ่มของเชื้อ Dasheen mosaic virus ( DMV )

**3. การตรวจสอบปริมาณการติดเชื้อไวรัสของเดหลีพันธุ์ใบมันหลังจากการทดสอบด้วยความร้อนด้วยเทคนิค ELISA แบบ indirect ELISA**

3.1 ตัดส่วนใบของชิ้นส่วนแต่ละตัวอย่าง ที่เลี้ยงจนครบกำหนดแล้วมาอย่างละ 1-2 ใบ ซึ่งจะได้ตัวอย่างจากแต่ละอุณหภูมิ อุณหภูมิละ 20 ตัวอย่าง รวมเป็น 80 ตัวอย่าง นำชิ้นส่วนที่ตัดได้นั้น มาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง โดยแต่ละตัวอย่างจะมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 0.0100 -0.0500 กรัม

3.2 วางแผนการตรวจสอบตัวอย่าง ลงบนตารางทดสอบและมีหลุมเปรียบเทียบ

3.3 บดตัวอย่างพืช ( เดหลีพันธุ์ใบมัน ) ที่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนในสารละลาย coating buffer ให้ได้น้ำคั้นเข้มข้น 1 :10 (W/V ) โดยบดตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกขนาดเล็ก จำนวน 1 ตัวอย่างต่อ 1 ถุง

3.4 หยดน้ำคั้นตัวอย่างพืชทดสอบที่บดใน coating buffer ลงใน polystyrene plate ปริมาณ 100 µl ควรระวังการปนเปื้อนใน plate หรือหลุมอื่น

3.5 นำ plate ใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท เก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อครบกำหนดในการบ่ม plate แล้วทำการล้าง plate ด้วย PSB-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที โดยสะบัด plate แรง ๆ เพื่อให้น้ำคั้นออกจากหลุม จากนั้นหยด PSB — Tween ลงในหลุม ควรระวังการปนเปื้อนระหว่างหลุม วาง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที เป็นการล้างครั้งที่ 1 ทำการล้างเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง เมื่อล้างครบ 3 ครั้งจึงคว่ำ plate โดยตบแรง ๆ บนกระดาษซับหรือผ้าสะอาด

3.6 หยอด antiserum โดยใช้เซรุ่มของเชื้อ Dasheen Mosaic Virus ( DMV ) ที่มี titre 1:128 ทำการ dilute ใน conjugate buffer ให้เป็น 1:10 โดยใช้ DMV antiserum 150 µl ในconjugate buffer 12 ml จากนำ plate ไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.7 เมื่อครบกำหนดในการบ่ม plate แล้วทำการล้าง plate ด้วย PBS- Tween 3 ครั้ง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1:128 ทำการ dilute ใน conjugate buffer ให้เป็น 1:10 โดยใช้ DMV antiserum 150 µl ในconjugate buffer 12 ml จากนำ plate ไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.7 เมื่อครบกำหนดในการบ่ม plate แล้วทำการล้าง plate ด้วย PBS- Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาทีทำเหมือนกับวิธีการข้อ 5

3.8 หยอด Anti-Goat IgG ( แอนติบอดีของแพะผลิตในกระต่าย ) หลุมละ 100 µl ที่ conjugate ไว้ด้วยเอนไซม์ alkaline phosphate ที่ dilute ใน conjugate buffer ( ความเข้มข้น 1 : 2,000 ) จากนั้นนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.9 เมื่อครบกำหนดในการบ่ม plate แล้วดูด Anti-Goat IgG เก็บเข้าไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในครั้งต่อไป ทำการล้าง plate ด้วย PSB-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที

3.10 นำ Phosphate Substrate 5 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ( 2 เม็ด / 1 plate) ละลายใน Substrate buffer แล้วหยด Substrate ลงใน plate หลุมละ 100 µl ทำการตรวจผลปฏิกิริยาหลังจากทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อรอให้สีเหลืองของปฏิกิริยาชัดเจนยิ่งขึ้น

3.11 สังเกตและบันทึกการทดสอบ โดยการจัดแบ่งสีของการเกิดปฏิกิริยา ดังนี้

ระดับ 3 = สีเหลืองเข้ม หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสสูง

ระดับ 2 = สีเหลือง หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสปานกลาง

ระดับ 1 = สีเหลืองอ่อน หมายถึง มีปริมาณของเชื้อต่ำ

ระดับ 0 = ไม่เกิดสี หมายถึง ไม่มีปริมาณของเชื้อไวรัส

สังเกตปฏิกิริยาแต่ละหลุมของ polystyrene plate บันทึกผลการทดลองและถ่ายรูปประกอบผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**เวลาและสถานที่ทำการทดลอง**

เวลา เริ่มการทดลอง ตุลาคม 2544

สิ้นสุดการทดลอง พฤษภาคม 2545

สถานที่

- ห้องปฏิบัติการโรคพืช และเรือนปลูกทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
- ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สาขาพืชสวน คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

39031

## ผลการทดลอง

**1. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นเดหลีใบมันในสภาพปลอดเชื้อ**

ลักษณะอาการด่างที่พบบนเดหลีพันธุ์ใบมัน ที่เก็บจากเรือนปลูกพืชทดลอง ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร มีลักษณะใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม ขนานไปตามแนวเส้นใบ อาการที่ปรากฏจะชัดเจนที่ใบอ่อน หลังจากนั้นอาการด่างจะค่อย ๆ จางลงเมื่อเป็นใบแก่ ( ดังภาพที่ 1-2 )

เมื่อนำส่วนตาของเดหลีพันธุ์ใบมันจากลำต้นใต้ดินที่แสดงอาการใบด่างชัดเจน ( ดังภาพที่ 3 ) มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog (MS ) ( 1962 ) เป็นเวลา 3 เดือน ทำการ subculture ลงในอาหารสูตรเดิมทุกเดือน พบว่าต้นเดหลีที่เลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ จะเกิดการแตกยอดเล็ก ๆ มีสีเขียวอ่อน ความสูงของยอดประมาณ ครึ่งเซนติเมตร เมื่อครบ 1 เดือน ต้นจะมีใบเกิดขึ้น ใบมีสีเขียวอ่อน ขนาดใบเล็กไม่มีการแตกกิ่งก้าน และหลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ต้นที่ได้มีสีเขียวอ่อน ลำต้นเล็ก ใบที่เกิดมีลักษณะเรียวแหลมมีการแตกกิ่งก้าน ต้นมีการเจริญเติบโตช้า หลังจากนั้น 3 เดือน ต้นจะมีความสูงเพิ่มขึ้น ความสูงของต้นประมาณ 3 เซนติเมตร ต้นพืชมีสีเขียวเข้ม ใบมีขนาดใหญ่ขึ้นเรียวแหลม และเกิดรากเล็ก ๆ ( ดังภาพที่ 4-7 )

เมื่อทำการเลี้ยงต้นพืชในอาหารสูตร MS ได้เป็นเวลา 3 เดือน ทำการทดลองเปลี่ยนมาเลี้ยงในอาหารสูตรMS ที่เติมฮอร์โมน BA( 6-Benzylamino purine ) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณของต้น พบว่าต้นเดหลีที่เลี้ยงได้ 1 เดือน ต้นพืชมีการแตก callus สีเขียวอ่อน มีลักษณะสดอวบน้ำและเกิดการแตกยอด เมื่อเลี้ยงได้ 2 เดือน callus จะแตกยอดเป็นจำนวนมากและเจริญเป็นต้นอ่อน มีใบเกิดขึ้นใบจะเรียวแหลมเล็ก หลังจากนั้น 3 เดือน ต้นที่เกิดมีการเจริญเพิ่มขึ้น ความสูงของต้นประมาณ 3-5 เซนติเมตร ใบอ่อนที่เกิดแสดงอาการด่างอย่างชัดเจนและต้นพืชมีสีเขียวเข้ม ( ดังภาพที่ 8-10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 1 พืชแสดงอาการใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม ขนานไปตามแนวเส้นใบ อาการที่ปรากฏจะชัดเจนที่ใบอ่อน

ภาพที่ 2 แสดง ลักษณะอาการด่างของเดหลีพันธุ์ใบมันค่อย ๆ ลดลง เมื่อเป็นใบแก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

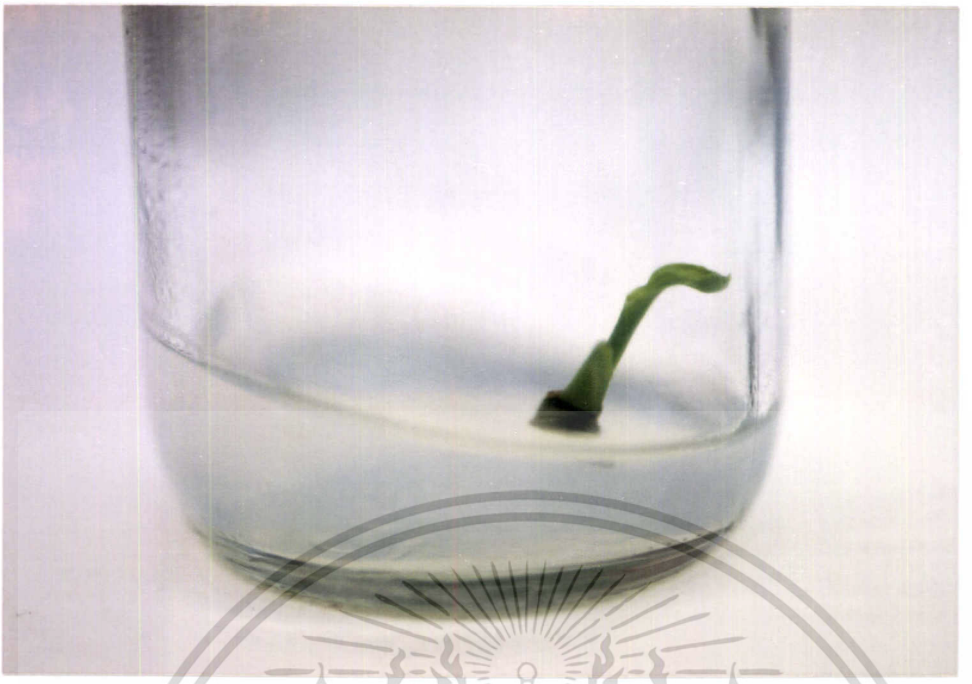
ภาพที่ 3 ส่วนตาของเดหลีพันธุ์ใบมันจากลำต้นใต้ดินที่แสดงอาการใบด่าง

ภาพที่ 4 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ เป็นเวลา 2 สัปดาห์สัปดาห์ จะเกิดการแตกยอด เล็ก ๆ มีสีเขียวอ่อน ความสูงของยอดประมาณ ครึ่งเซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18255



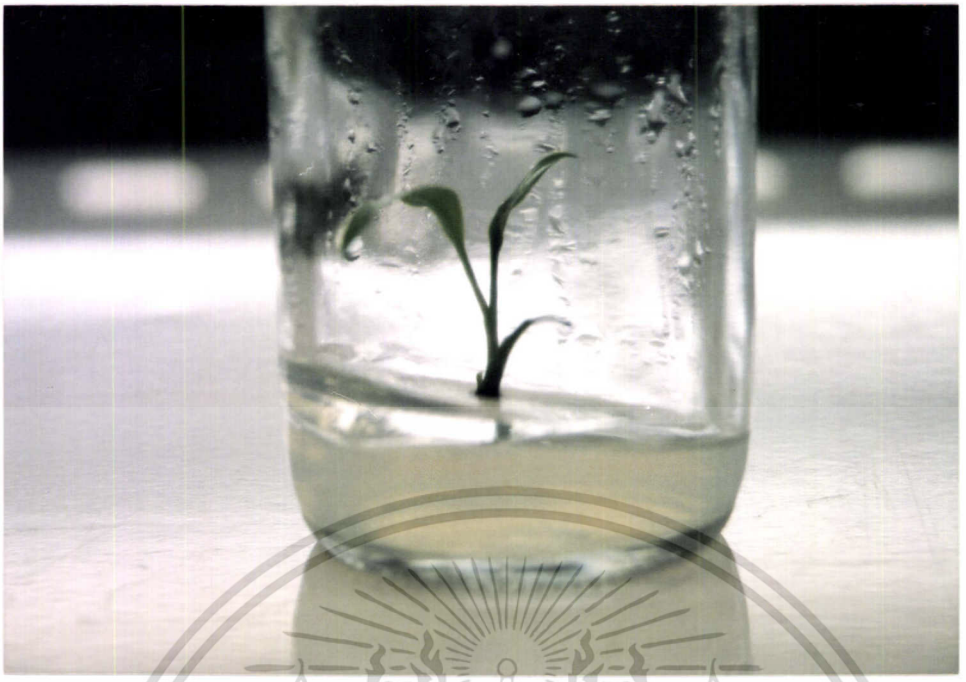


ภาพที่ 5 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ เป็นเวลา 1 เดือนต้นจะมีใบเกิดขึ้น ใบมีสีเขียวอ่อน ขนาดใบเล็กไม่มีการแตกกิ่งก้าน

ภาพที่ 6 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ เป็นเวลา 2 เดือน ต้นที่ได้มีสีเขียวอ่อน ลำต้นเล็ก ใบที่เกิดมีลักษณะเรียวแหลม มีการแตกกิ่งก้าน ต้นมีการเจริญเติบโตช้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง



ภาพที่ 7 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเคหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติ เป็นเวลา 3 เดือน ต้นจะมีความสูงเพิ่มขึ้น ต้นสูงประมาณ 3 เซนติเมตร ต้นพืชมีสีเขียวเข้ม ใบมีขนาดใหญ่ขึ้นเรียวแหลม และเกิดรากเล็ก ๆ

ภาพที่ 8 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเคหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA( 6-Benzylamino purine ) เป็นเวลา 1 เดือนต้นพืชมีการแตก callus สีเขียวอ่อน มีลักษณะสดอวบน้ำและเกิดการแตกยอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 9 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเคหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA( 6-Benzylamino purine ) เป็นเวลา 2 เดือน callus จะแตกยอดเป็นจำนวนมากและเจริญเป็นต้นอ่อน มีใบเกิดขึ้นใบจะเรียวแหลมเล็ก

ภาพที 10 แสดงการเจริญเติบโตของต้นเคหลีพันธุ์ใบมันทีเลียงในอาหารสูตร MS ที่เติมฮอร์โมน BA( 6-Benzylamino purine ) เป็นเวลา 3 เดือนต้นที่เกิดมีการเจริญเพิ่มขึ้นความสูงของต้นประมาณ 3-5 เซนติเมตร ใบอ่อนที่เกิดแสดงอาการด่างอย่างชัดเจนและต้นพืชมีสีเขียวเข้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2 . การผลิตพืชปลอดโรคไวรัสโดยวิธี Heat treatment**

เมื่อต้นพืชมีความสูง ประมาณ 3-5 เซนติเมตร ทำการตัดแยกเป็นต้นเดี่ยว ๆ ลงในขวดอาหาร MS ปกติ เพื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อไวรัสด้วยวิธี Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 ,30 , 35 และ 40 องศาเซลเซียส treatment ละ 20 ขวด โดยที่แต่ละอุณหภูมิใช้ระยะเวลา 3 สัปดาห์ ลักษณะต้นพืชภายหลังจากการทดสอบมีลักษณะดังนี้

ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

หลังจากที่ทำการทดลองได้ 1 สัปดาห์ ต้นมีสีเขียวเข้ม ใบแสดงอาการด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม ขนานไปตามแนวเส้นใบ การเจริญเติบโตของต้นพืชช้า เมื่อครบ 3 สัปดาห์ ต้นพืชไม่ปรากฏอาการเหี่ยวและใบพืชไม่มีลักษณะม้วนงอ ( ดังภาพที่ 11 )

ที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อทำการทดลองได้ 1 สัปดาห์ ต้นพืชมีลักษณะใกล้เคียงกับที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่เมื่อเลี้ยงได้ 13 วัน ต้นมีลักษณะอาการเหี่ยวเล็กน้อย พบว่าบางต้นใบมีลักษณะม้วนงอ ต้นยังคงมีสีเขียวเข้ม เมื่อครบ 3 สัปดาห์ ทั้งใบยอดและใบล่างจะมีลักษณะบิดม้วนลง ต้นพืชเหี่ยวเล็กน้อยมีสีเขียวจางลงแต่ยังสามารถเจริญเติบโตได้ ( ดังภาพที่ 12 )

ที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

หลังจากที่ทำการทดลองเลี้ยงได้ 10 วัน พืชแสดงอาการเหลืองที่บริเวณใบล่างใบม้วนงอ เมื่อครบ 3 สัปดาห์ บริเวณโคนต้นและก้านใบล่างมีสีเหลืองสลับเขียว ปลายยอดของพืชจะแสดงอาการเหลืองเพียงเล็กน้อย ใบยอดยังคงมีลักษณะปกติ คือ ใบจะยังมีสีเขียวแต่ปลายใบจะมีลักษณะบิดม้วนลง ซึ่งต่างจากที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และต้นพืชไม่แสดงอาการตาย ( ดังภาพที่ 13 )

ที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เมื่อทำการทดลองได้ 3 วัน ใบล่างจะแสดงอาการเหลืองตรงปลายใบ และต้นพืชจะมีอาการเหี่ยวเล็กน้อย หลังจากนั้น 7 วัน ต้นพืชมีลักษณะการตายนึ่งทั้งต้น โดยใบที่เหลืองจะมีอาการเหี่ยวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำซึ่งอาการจะเกิดที่ก้านใบล่างแล้วลุกลามไปจนถึงส่วนยอดของต้นพืช ทำให้ต้นพืชเกิดการทรุดโทรมและตายในที่สุด ( ดังภาพที่ 14 )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 11 แสดงลักษณะอาการของต้นเคหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสใบแสดงอาการด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้มขนานไปตามแนวเส้นใบ การเจริญเติบโตของต้นพืชช้า

ภาพที่ 12 แสดงลักษณะอาการของต้นเคหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทั้งใบยอดและใบล่างจะมีลักษณะบิดม้วนลง ต้นพืชเหี่ยวเล็กน้อยมีสีเขียวจางลงแต่ยังสามารถเจริญเติบโตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 13 แสดงลักษณะอาการของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสบริเวณโคนต้นและก้านใบล่างมีสีเหลืองสลับเขียว ปลายยอดของพืชจะแสดงอาการเหลืองเพียงเล็กน้อย

ภาพที่ 14 แสดงลักษณะอาการของต้นเดหลีพันธุ์ใบมันที่เลี้ยงในอาหารสูตร MS ปกติที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ต้นพืชมีลักษณะการตายนึ่งทั้งต้น โดยใบที่เหลืองเหี่ยวและเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลดำลุกลามทั้งต้นพืช ทำให้ต้นพืชตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3. การตรวจสอบปริมาณการติดเชื้อไวรัสของเดหลีพันธุ์ใบมันหลังจากการทดสอบด้วยความร้อนด้วยเทคนิค ELISA แบบ indirect ELISA**

จากการตรวจสอบพบว่าปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใน polystyrene plate จะแบ่งปฏิกิริยาออกเป็น 4 ระดับ คือ ระดับ 3 สีเหลืองเข้ม หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสสูง ระดับ 2 สีเหลือง หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสปานกลาง ระดับ 1 สีเหลืองอ่อน หมายถึง มีปริมาณของเชื้อต่ำ ระดับ 0 ไม่เกิดสี หมายถึง ไม่มีปริมาณของเชื้อไวรัสอยู่เลย โดยทำการเปรียบเทียบกับหลุมเปรียบเทียบ 2 ชนิด คือ substrate control 8 หลุม และ enzyme control 8 หลุม

น้ำคั้นพืชจากตัวอย่างของชิ้นส่วน ที่เลี้ยงในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อจากการทดสอบด้วยความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 3 ระดับ 2 ที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 3 ระดับ 2 ที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 3 ระดับ 2 ระดับ และ ระดับ 1 ส่วนในหลุมเปรียบเทียบ 2 ชนิด คือ substrate control และ enzyme control คือระดับ 0 และระดับ 1 ตามลำดับ (ดังแสดงในภาพที่ 15 )

จากปริมาณของเชื้อไวรัสที่พบจากการตรวจสอบในตัวอย่างที่ระดับอุณหภูมิ 25 , 30 , 35 และ40 องศาเซลเซียส แต่ละอุณหภูมิ ใช้ 20 ตัวอย่าง สามารถคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนระดับการเกิดปฏิกิริยาโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA Test จากพืชทดลองที่เลี้ยงไว้ในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Heat treatment

| อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง ( องศาเซลเซียส ) | ระดับการเกิดปฏิกิริยา | จำนวนตัวอย่างที่เกิดปฏิกิริยา | จำนวนเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยา ( % ) |
|---|---|---|---|
| Control 25 | 3 | 20 | 100 |
| 25 | 3 | 19 | 95 |
| | 2 | 1 | 5 |
| Control 25 | 3 | 18 | 90 |
| | 2 | 2 | 10 |
| 30 | 3 | 18 | 90 |
| | 2 | 2 | 10 |

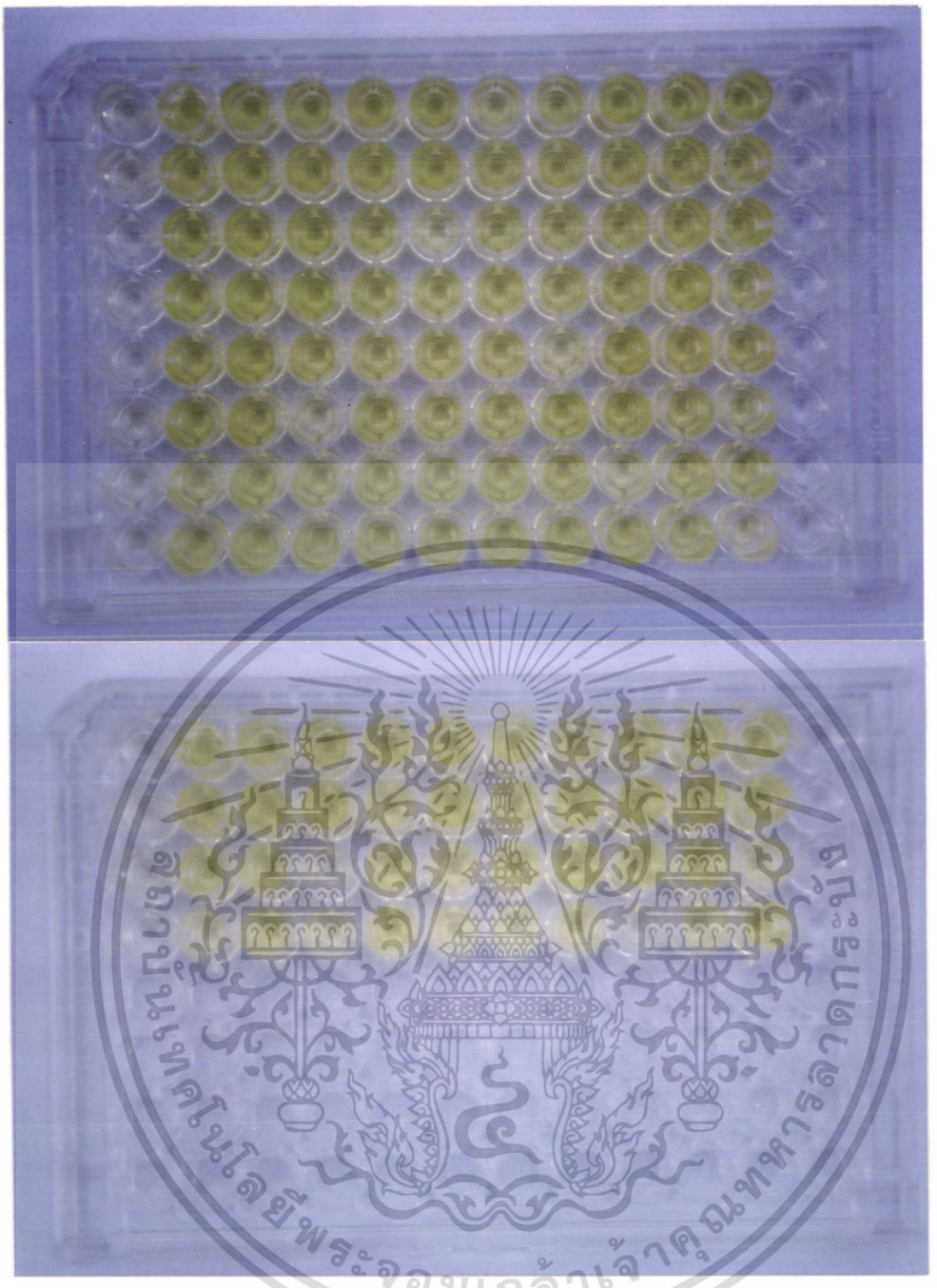
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ( ต่อ ) แสดงจำนวนระดับการเกิดปฏิกิริยาโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบปริมาณ เชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA Test จากพืชทดลองที่เลี้ยงไว้ในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Heat treatment

| อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง ( องศาเซลเซียส ) | ระดับการเกิดปฏิกิริยา | จำนวนตัวอย่างที่เกิดปฏิกิริยา | จำนวนเปอร์เซ็นต์การเกิดปฏิกิริยา ( % ) |
|---|---|---|---|
| Control 25 | 3 | 20 | 100 |
| 35 | 3 | 14 | 70 |
| | 2 | 4 | 20 |
| | 1 | 2 | 10 |

จากตารางการตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค ELISA Test จากพืชทดลองที่เลี้ยงไว้ในขวดเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Heat treatment จำนวนระดับการเกิดปฏิกิริยาโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิปกติ ( ที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ) ซึ่งเป็นกลุ่มเปรียบเทียบ พบว่ามีปริมาณของเชื้อไวรัสสูงมาก คือ 90-100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กลุ่มที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า มีปริมาณของเชื้อไวรัสอยู่ในระดับที่สูงมากเช่นเดียวกับที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสพบว่า มีปริมาณของเชื้อไวรัสอยู่ในระดับที่ลดลงแต่ก็ไม่สามารถที่จะทำให้ปลอดจากเชื้อไวรัสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 15 แสดงระดับการเกิดปฏิกิริยาของพืชทดลอง ที่ทดสอบความร้อนที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

A. 25 องศาเซลเซียส

B. 30 องศาเซลเซียส

C. 35 องศาเซลเซียส

D. substrate control

E. enzyme control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สรุปผลการทดลอง

จากการผลิตเดหลีพันธุ์ใบมันให้ปลอดไวรัสโดยวิธี Heat treatment พบว่าการใช้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำให้ต้นไม้ไม่สามารถที่จะทนต่อความร้อนได้ พืชจะเสื่อมโทรมอย่างมากที่สุดและจะทำให้ต้นพืชตาย รองลงมาคือ ที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ต้นพืชจะมีสีเหลืองสลับเขียว ใบยอดจะยังมีสีเขียวแต่ปลายใบบิดม้วนลงมีทั้งต้นที่สด คือเขียวทั้งต้นและปรากฏอาการเหี่ยวบางต้น ต้นพืชสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ไม่มีต้นตาย ส่วนที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส ต้นพืชจะมีลักษณะใกล้เคียงกัน คือ ต้นพืชจะมีสีเขียวเข้ม เจริญเติบโตช้า แต่ที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใบพืชจะบิดม้วนลงและต้นมีอาการเหี่ยวกว่าที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งจะไม่ปรากฏอาการเหี่ยวและใบพืชไม่บิดม้วน

ในการทดสอบปฏิกิริยาของ ELISA เพื่อตรวจสอบปริมาณของเชื้อไวรัสจากชิ้นส่วนของพืชที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ไม่สามารถที่จะนำใบพืชมาตรวจสอบได้เนื่องจากใบพืชเหี่ยวแห้งและต้นพืชตาย ส่วนที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ช่วยให้ต้นพืชที่มีลักษณะของอาการด่างจากการติดเชื้อไวรัส สามารถยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสได้เพียงบางส่วน และที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถที่จะยับยั้งการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัสได้เลย การทดลองนี้ยังเป็นการบอกให้ทราบว่าถึงแม้ว่าการเจริญของต้นเดหลี ภายหลังจากที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะสามารถยับยั้งปริมาณของเชื้อไวรัสได้บางส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส แต่ก็ไม่ได้หมายความว่าต้นเดหลีดังกล่าวนั้นปราศจากเชื้อไวรัส แม้กระทั่งที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งต้นพืชตาย เมื่อตรวจสอบปริมาณเชื้อไวรัสอาจจะมีเชื้อไวรัสอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิจารณ์ผลการทดลอง

เดหลีพันธุ์ใบมันก่อนที่จะนำมาทดลองนั้น มีลักษณะที่แสดงว่าเป็นเดหลีที่ติดเชื้อไวรัส ซึ่งตรงกับอาการของเดหลีที่ติดเชื้อไวรัส ที่มีรายงานในหนังสือหลายเล่ม คือ มีอาการใบด่างสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม อาการด่างเป็นแถบขนานกับเส้นใย ( Zetter *et al* ; (1970) ; Alconer and Zettler (1971) ; Chase and Zettler (1982) ) เมื่อนำชิ้นส่วนเดหลีดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหาร MS ปกติเป็นระยะเวลาหนึ่ง พบว่า อาการที่บ่งบอกลักษณะของการติดเชื้อไวรัสที่เหลืออยู่ในชิ้นส่วนเดหลีนั้นและเป็นอาการเดียวกับอาการของต้นเดหลีที่ติดเชื้อไวรัส คืออาการลำต้นเตี้ย การเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์ ( Brunt *et.al* ; 1995 ) จะเห็นว่าเชื้อไวรัสมีผลทำให้พืชมีการเจริญเติบโตได้ผิดปกติ การเจริญเติบโตช้าและไม่สมบูรณ์ พืชจะอ่อนแอและตายได้ง่าย ดังในรายงานของ De Vries Peterson *et. al*., (1992) ที่ทำการศึกษาผลของ asparagus virus ที่มีต่อการเพาะเลี้ยง apical shoot tips ของ asparagus virus พบว่าเชื้อไวรัสดังกล่าวมีผลให้การเกิดรากของชิ้นส่วนและเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดต่ำ

จากการทดลองนี้ การผลิตพืชให้ปลอดจากไวรัส โดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชร่วมกับการใช้ความร้อน พบว่า ที่ระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลอง คือ 25, 30, 35, 40, องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ดีที่สุดคือ ที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซีย จะสามารถยับยั้งปริมาณของเชื้อไวรัสให้ลดลงได้ในระดับหนึ่งและต้นพืชยังสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้อีกแต่ก็ไม่สามารถที่จะกำจัดเชื้อไวรัสให้หมดได้เพราะอุณหภูมิที่ใช้ต่ำและเวลาที่ใช้น้อยไป ในขณะที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถยับยั้งปริมาณของเชื้อไวรัสได้เลย ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ต้นพืชจะตายอาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองสูงมากเกินไป ทำให้ต้นพืชไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ แม้ว่าปริมาณของเชื้อไวรัสอาจจะลดลงมากกว่าที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ก็ตาม ดังในรายงานของ Faccioli and Colomabrini (1996) ที่ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ส่วน meristem tips ของมันฝรั่ง ร่วมกับการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 26 วัน พบว่าปลอดจากเชื้อ potato S carlavirus (PVS) และ potato M carlavirus (PVM) 85 เปอร์เซ็นต์หรือจากรายงาน Gella and Errea ( 1998 ) ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วน shoot culture ทดสอบกับพืชในกลุ่มของ Prunus 3 พันธุ์คือ apicot ( *P. armeniaca* ) ติดเชื้อ apple chlorotic leaf spot trichovirus (ACLSV ) , peach ( *P. persica* ) ติดเชื้อ prunus necrotic ring spot ilarvirus (PNRSV ) และ ACLSV , sour cherry ( *P. avium* ) ติดเชื้อ prune dwarf ilarvirus ( PDV )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ ACLSV ทำการทดลองร่วมกับการทำ heat therapy นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสระยะของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับพันธุ์และชนิดของพืชที่ใช้ทดลองอยู่ระหว่าง 15-36 วัน ซึ่งจะทำให้ปราศจากเชื้อ ACLSV 60-100 เปอร์เซ็นต์ , PNRSV 37-100 เปอร์เซ็นต์ และ PDV 85-100 เปอร์เซ็นต์ จากวิธีดังกล่าวได้มีการนำไปเปรียบเทียบใช้ในการกำจัดไวรัสในไม้ผลแต่ละชนิด

ในการทดสอบปฏิกิริยา ELISA จากใบพืชของชิ้นส่วนที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Heat treatment ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า ปริมาณของเชื้อไวรัสที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่ระดับ 3 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือ ระดับ 3 ที่ 90 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 2 อุณหภูมินี้ จะไม่สามารถยับยั้งปริมาณของเชื้อไวรัสได้ ซึ่งอาจจะเป็นเพราะอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองไม่สูงพอและระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองสั้น ส่วนที่ ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เกิดปฏิกิริยาที่ระดับ 3 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ระดับ 2 เพียง 20 เปอร์เซ็นต์ และระดับ 1 ที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากที่ต้นพืชผ่านการทดสอบ Heat treatment ลักษณะของต้นพืชจะมีทั้งต้นที่เขียวทั้งต้นที่เขียวบ้างเหลืองบ้าง และมีเหลืองทั้งต้นแต่ต้นพืชจะไม่ตาย ยังเจริญเติบโตต่อไปได้ แต่ก็ไม่สามารถทำให้ปลอดจากเชื้อไวรัสได้มีเพียงบางส่วนเท่านั้น และที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ต้นพืชตายมากจึงไม่สามารถทดสอบได้ แต่คาดว่าปริมาณของเชื้อไวรัสน่าจะลดลงมากกว่าที่ระดับอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสแต่อาจจะไม่สามารถปลอดจากเชื้อไวรัสได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากสาเหตุดังกล่าว จึงน่าจะมีการทดลองเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต เพื่อหาระดับอุณหภูมิ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตเดหลีให้ปราศจากเชื้อไวรัส โดยทำการเพิ่มเติมที่ระดับอุณหภูมิ 35-38 องศาเซลเซียส ซึ่งถ้าถึง 40 องศาเซลเซียสก็จะทำให้ต้นเดหลีตาย และระยะเวลาในการเพราะเลี้ยงให้มากขึ้นอาจจะอยู่ในช่วง 4—6 สัปดาห์ เพราะในการกำจัดเชื้อไวรัสด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อที่จะเพิ่มจำนวนและเคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลอื่นๆของพืชได้รวดเร็วเพียงใด ภายในพืชที่ถูกนำไว้ในอุณหภูมิดังกล่าว พืชในกลุ่มไม้ดอกไม้ประดับจะมีความสามารถในการทนความร้อนได้แตกต่างกัน ( นวลพรรณ , 2538 ) ดังในรายงานของ ปัจฉิมา และคณะ ( 2532 ) ที่นำเบญจมาศ มาทดลองเลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 37 + - 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2 ,3 , 4 , 5 , 6 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิปกติก่อนที่จะนำมาตัดเนื้อเยื่อเจริญบนอาหาร MS โดยใช้ BAP 0.4 ppm และ IAA 0.5 ppm หลังจากที่ต้นเบญจมาศเจริญจนมีขนาด 3-4 เซนติเมตร และระบบรากแข็งแรงย้ายไปปลูกในที่ปลูกที่ฆ่าเชื้อเพื่อทดสอบหาไวรัสพบว่าเบญจมาศที่ได้จากกลุ่มที่ไว้ในอุณหภูมิสูงติดต่อกันถึง 6 สัปดาห์ จะปลอดจากเชื้อไวรัส Chrysanthemum Virus B หรือจากรายงานของ นวลพรรณ (2538) ที่ทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**กำจัดเชื้อไวรัสโดยนำหวายปอมปาดัวร์มาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 เดือน จะทำให้ปริมาณเชื้อ Cymbidium mosaic virus ลดลง**



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง

ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ. 2536 . ไม้ประดับในอาคาร . บริษัทไนเต็ดท์บุ๊ค , กรุงเทพมหานคร . หน้า 74-75 .

ชมรมพัฒนาไม้ดอกไม้ประดับ. 2539 . คู่มือไม้ดอกในอาคาร . บริษัทไนเต็ดท์บุ๊ค , กรุงเทพมหานคร . หน้า 90-91 .

นวลพรรณ งามยี่สุ่น. 2538 . การผลิตพืชปลอดโรคไวรัสและการป้องกันการเข้าทำลายซ้ำ . วารสารพระจอมเกล้า 13( 2 ) : 42-50 .

ปัจฉิมา สมิตะมาน , ประสาทพร สมิตะมาน และปัญญาศรี ธนศานติ. 2532 . การผลิตเบญจมาศปลอดเชื้อโดยการใช้ความร้อนร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญ . วารสารเกษตร 5(2): 123-135 .

ปิยะ เฉลิมกลิ่น . 2540 . ไม้ดอกหอม เล่ม 1 . บริษัท อมรินทร์พริ้นติ้งแอนพับลิชชิ่ง จำกัด ( มหาชน ) . กรุงเทพมหานคร . หน้า 88-89 .

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

วิรุฬห์รัตน์ พฤฒิเศรษฐเสนา และ ศิริพร ตรงคมาลี . 2538 . การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้สกุลหวายให้ปราศจากเชื้อไวรัสโดยใช้สารเคมี . ปัญหาพิเศษปริญญาตรีภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจาคุณทหารลาดกระบัง , กรุงเทพมหานคร .

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

สุรภี กีรติยะอังกูร และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร . 2538 . การศึกษาและการควบคุมโรคด่างแคระแกรนของคาร์เนชั่นที่เกิดจาก CaMV . หน้า 213 -218 . ใน : รายงานการประชุมวิชาการไม้ดอกไม้ประดับแห่งชาติครั้งที่ 1 . กรุงเทพมหานคร.

สุรวิช วรรณโกรโรจน์. 2542 . เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ . วารสารพืชสวน 6 (2) : 47-56 .

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alconero , R. and F. W. Zettler . 1971 . Virus infection of *Colocasia sp. and Xanthosama* in Puerto Rico . Plant Disease 55 : 506 .

Alconero , R . 1972 . Hot water treatment of corns of *Xanthosama spp.* infection with dasheen mosaic virus . Plant Disease 56:320-321 .

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

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

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

Chase , A. R. and F. W. Zettler . 1982 . Dasheen mosaic virus infection of *Dieffenbachia sp.* cutivars . Plant Disease 66:891-899 .

Christie , R. G. and J. R. Edwardson . 1977 . Light and electron microscopy of plant virus inclusion . Florida Ags.Expt.sta. monograph Series 9: 150 .

Clark , M. F. and A. N. Adams . 1977 . Characteristic of the Microplate Method of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant viruses . Journal of General Virology 34 : 475-483.

De vries-Paterson , R. M., T. A . Evans and C. T . Stephens . 1992 . The effect of asparagus virus infection on asparagus tissue culture . Plant , Tissue and Organ Culture 32 :31-35 .

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

Gella , R. and P. Errea . 1998 . Application of in vitro therapy for ilarvirus elimination in Three Prunus species. Phytopathology. 146(8): 445-449.

Hartman , R.D . and F. W. Zettler . 1974 . Effect of dasheen mosaic virus on yield of *Caladium* , *Dieffenbachia* and *Philodendron* . Phytopathology 64 : 768 .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Krussmann , G.1981 . The complete book of roses .Timber Press , Portland ,Oregon . 436 p.

Morales , F . J . and F. W. Zettler . 1977 . Aphid transmisstion characteristics of dasheen mosaic virus Fitopatol Columbina 6 : 134 .

Murashige , T. and F. Skoog . 1962 . A revised madium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture . Physiologis Plantarum 15 : 473-496 .

Paet , C. N. and A. B. Zamora . 1990 . Efficacy of thermotherapy and group culture of isolated potato meristem for the elimination of single and mixed infection of potato virus Y , potato virus S , potato leaf roll virus . Philippine Journal of Crop Science 15(2) : 11—118.

Svoboda , P. 1992 . Cultivation of isolated hop ( *Humulus lupulus* L. ) apices in *vitro*. Rostilinna Vyroba 38(60):523-528.

Szyndel , M. S., B. Kozera and E. Misterek. 1994 . The elimination of viruses from garlic ( *Allium sativum* L. ) plant by thermotherapy and meristem tip culture. Acta-Agrobotanica 47(1):83-88.

Tompkins ,C . M. and M. W. Garden . 1934 . Spotted wilt of Head Lettuce . Phytopathology 24 : 1135-1136 .

White , P.R. 1943 . A handbook of plant tissue culture . Jacques cattell press . USA .

Walkey , D.G.A. 1985 . Applied Plant Virology. William Heinemann Ltd., London .

Zettler , F. W., Foxe , M . J., Hartman , R. D., Edwardson, J . R. and R. G. Christae . 1970 . Filamentous Viruses Infecting Dasheen and Other Araceous plant . Phytopathology 60: 983-987.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ภาคผนวกที่ 1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige & Skoog ( MS )(1962)**

| สารเคมี | ปริมาณสาร(mg/l) |
|---|---|
| **Major inorganic nutrient** | |
| Stock 1 $NH_4NO_3$ | 1650 |
| Stock 2 $KNO_3$ | 1900 |
| Stock 3 $CaCl_2.2H_2O$ | 440 |
| Stock 4 $MgSO_4.7H_2O$ | 370 |
| Stock 5 $KH_2PO_4$ | 170 |
| Trace element | |
| Stock 6 $MnSO_4.4H_2O$ | 22.3 |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 8.6 |
| $H_3BO_3$ | 6.2 |
| KI | 0.83 |
| $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0.25 |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0.025 |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0.025 |
| **Iron Soure** | |
| Stock 7 $FeSO_4.7H_2O$ | 27.8 |
| $Na_2.EDTA.2H_2O$ | 37.3 |
| **Organic supplement** | |
| Stock 8 Thiamine HCl | 0.1 |
| Nicotinic acid | 0.5 |
| Pyridoxine HCl | 0.5 |
| Glycine | 2 |
| Inositol | 100 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวกที่ 2 สารเคมีที่ใช้ตรวจสอบหาปริมาณเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค Enzyme-linked immunosorbent assay ( ELISA )

1. Goat entiled rabbit in conjugate buffer ( IgG )
2. Coating buffer
3. PSB-Tween
4. Extraction buffer
5. Substrate
6. p-nitrophenyl phosphate

### การเตรียม Buffer

**Coating buffer ( pH 9.6 )**

| | | |
|---|---|---|
| $Na_2 Co_3$ | 1.59 | g. |
| $NaHCo_3$ | 2.00 | g. |
| $NaN_3$ | 0.20 | g. |
| เติมน้ำให้ครบ | 1 | ลิตร |

**PSB ( pH 7.4 )**

| | | |
|---|---|---|
| NaCl | 8.00 | g. |
| $KH_2PO_4$ | 0.20 | g. |
| $Na_2HPO_4.12H_2O$ | 2.90 | g. |
| KCl | 0.20 | g. |
| $NAN_3$ | 0.20 | g. |
| เติมน้ำให้ครบ | 1 | ลิตร |

**PSB-Tween**

หยด Tween 20 จำนวน 0.5 ml ลงใน PSB 1 ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Substrate buffer**

| | | |
|---|---|---|
| Diethanolamine | 97 | ml |
| $H_2O$ | 800 | ml |
| $NaN_3$ | 0.2 | g. |

ปรับ pH ให้เท่ากับ 9.8 และเติมน้ำจนครบ 1 ลิตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้