การทดสอบความต้านทานต่อโรคจุดวงแหวนในมะละกอพันธุ์ต่างๆ

Screening for Papaya varieties to resistant to *Papaya ringspot virus*

นายปริเชษฐ์ ตั้งกาญจนภาสน์[๑/] นางสาววันเพ็ญ ศรีทองชัย[๑/]
นางสาวกาญจนา วาระวิชะนี[๑/] นายธวัชชัย นิ่มกิ่งรัตน์[๒/]

บทคัดย่อ

เชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) เป็นศัตรูพืชที่สำคัญของมะละกอ ทำให้เกิดโรคด่างวงแหวน สร้างความเสียหายกับการผลิตมะละกอ โดยทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพที่ได้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งมะละกอสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดหลายสายพันธุ์ เช่น แขกดำ และขอนแก่น ๑, ๒ มีความอ่อนแอต่อโรคนี้มาก ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการดัดแปลงตัดต่อสารพันธุกรรมให้พืชมีความสามารถในการต้านทานโรคด่างวงแหวนได้ แต่พบว่ากลับไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศเนื่องจากการความกังวลของผู้บริโภคต่อความปลอดภัยในการบริโภค และความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น การผสมกับพันธุ์พื้นเมือง เป็นต้น ทำให้ปัญหาการเข้าทำความเสียหายของโรคด่างวงแหวนยังคงเป็นปัญหาสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตมะละกอต่อไป วิธีการคัดเลือกพันธุ์แบบดั้งเดิมโดยนักปรับปรุงพันธุ์จึงเป็นทางแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ แต่อย่างไรก็ดีการตรวจคัดเลือกสายพันธุ์มะละกอที่ผ่านกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ว่ามีคุณสมบัติในการต้านทานโรคได้หรือไม่เป็นสิ่งที่สำคัญที่นักไวรัสวิทยาความจำต้องเข้ามาร่วมประสานงานทำการทดสอบพันธุ์ต้านทานโรค เพื่อให้มะละกอสายพันธุ์ต้านทานที่กรมวิชาการเกษตรผลิตได้มีคุณภาพและเข้าถึงเกษตรกรไทยได้ จากผลการทดลองพบว่ามะละกอทั้ง ๒๙ สายพันธุ์ คือ KDDNS, KDLS๑, KDLS๒, KNLS๑, LN, MA, Maradol, MIR, SEW ๕๘, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ ๓, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HO, HOS no.๑, HOS no.๒, HOS no.๓, KD-Si, KK ๘๐, KN (SR), MI, SK ๐๐๑, SK ๐๐๒, SK ๐๐๓, SK ๐๐๔ และ เบอร์ ๑๒ พบว่าทั้ง ๒๙ สายพันธุ์ไม่ต้านทานต่อเชื้อ *Papaya ringspot virus* แต่พบว่ามี ๔ พันธุ์ที่แสดงลักษณะการทนทานต่อโรคได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ คือพันธุ์ ปากช่อง, MI, SK ๐๐๓ และ SK ๐๐๔ ซึ่งอาจมีศักยภาพนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์มะละกอทนทานต่อโรคได้

[๑/]สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช
[๒/]ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ

๖. คำนำ

มะละกอ: (*Carica papaya* Linn.) จัดอยู่ในวงศ์ *Carecaceae* เป็น ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว ๕-๙ แฉก เกาะกลุ่มอยู่ด้านบนสุดของลำต้น ภายในก้านใบและใบมียางเหนียวสีขาวอยู่ มะละกอบางต้นอาจมีดอกเพียงเพศเดียว แต่บางต้นอาจมีดอกได้ทั้งสองเพศก็ได้ มะละกอเป็นผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทย ทั้งการทานผลไม้สด การนำมาทำอาหารคาว และการนำมาแปรรูปในเชิงอุตสาหกรรม ศัตรูพืชที่สำคัญอย่างหนึ่งของมะละกอคือเชื้อ *Papaya ringspot virus* (PRSV) ซึ่งทำให้เกิดโรคด่างวงแหวน เชื้อไวรัสชนิดนี้เข้าทำความเสียหายกับการผลิตมะละกอ โดยทำให้ผลผลิตลดลงและคุณภาพที่ได้ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ซึ่งมะละกอสายพันธุ์ที่เป็นที่นิยมในท้องตลาดหลายสายพันธุ์ เช่น แขกดำ และขอนแก่น ๑, ๒ มีความอ่อนแอต่อโรคนี้มาก ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาแก้ปัญหาดังกล่าวโดยการดัดแปลงตัดต่อสารพันธุกรรมให้พืชมีความสามารถในการต้านทานโรคด่างวงแหวนได้ แต่พบว่ากลับไม่เป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เนื่องจากการความกังวลของผู้บริโภคต่อความปลอดภัยในการบริโภค และความเสี่ยงด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ เช่น การผสมกับพันธุ์พื้นเมือง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่ามะละกอดัดต่อสารพันธุกรรมที่พัฒนาขึ้นมาหลายสายพันธุ์มีช่วงความต้านทานที่แคบ คือแสดงความต้านทานได้เฉพาะเชื้อ PRSV สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการดัดแปลงพันธุกรรมพืชแต่ไม่สามารถต้านทานเชื้อ PRSV สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันได้ ทำให้ปัญหาจากการเข้าทำความเสียหายของโรคด่างวงแหวนยังคงเป็นปัญหาสำหรับเกษตรกรผู้ผลิตมะละกอต่อไป

Papaya ringspot virus (PRSV) เป็นเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สำคัญในมะละกอ ทำให้ใบมีอาการผิดรูป ด่างจุด มีอาการด่างจุดวงแหวนที่ผล ลำต้นและก้านใบแคระแกร็น ผลที่ได้มีขนาดและปริมาณน้อยลง และอาการจะทวีความรุนแรงในช่วงอากาศหนาว เชื้อ PRSV จัดจำแนกอยู่ในวงศ์ *Potyviridae* สกุล *Potyvirus* ถ่ายทอดโรคผ่านทางแมลงพาหะ เพลี้ยอ่อนสองชนิด (*Myzus persicae* และ *Aphis gossypii*) โดยมีการถ่ายทอดโรคแบบ non-persistent ไวรัสชนิดนี้สามารถถ่ายทอดโรคได้ด้วยวิธีกล แต่ไม่สามารถถ่ายทอดโรคผ่านทางเมล็ดพันธุ์ได้ เชื้อ PRSV สามารถจำแนกออกได้เป็น ๒ สายพันธุ์ใหญ่ ๆ คือ P strain และ W strain ซึ่งสายพันธุ์ P สามารถเข้าทำลายได้ทั้งมะละกอและพืชในกลุ่ม cucurbits ในขณะที่สายพันธุ์ W จะเข้าทำลายเฉพาะพืชในกลุ่ม cucurbits เท่านั้น เชื้อ PRSV เป็นสาเหตุปัญหาสำคัญกับทั้งการผลิตมะละกอและพืชในกลุ่ม cucurbits โดยเฉพาะในมะละกอจะทำให้ผลผลิตลดลงอย่างรุนแรง รวมถึงทำให้ระดับน้ำตาลในผลลดลงได้มากถึง ๕๐ เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า

๗. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

๑. โรงเรือนมุ้งกันแมลง
๒. ตู้แช่ ๔ องศาเซลเซียส
๓. เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม ๓ ตำแหน่ง
๔. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส
๕. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge)
๖. ชุดตรวจสอบเชื้อ PRSV reagent set (Agdia)
๗. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการปลูกเชื้อบนพืชด้วยวิธีกล
๘. สารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค ELISA
๙. วัสดุการเกษตรต่าง ๆ ดินและปุ๋ยเคมี

- วิธีการ

๑. สืบค้นข้อมูลทางชีววิทยา วิธีการตรวจวินิจฉัย และการถ่ายทอดโรคของเชื้อ *Papaya ringspot virus* และวางแผนการทดลอง

๒. เตรียมโรงเรือน วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ ที่จำเป็นในขั้นตอนต่าง ๆ รวมถึงการจัดเตรียมไพรเมอร์และแอนติซีรัมสำหรับใช้ตรวจสอบโรค

๓. สำรวจและเก็บรวบรวมไอโซเลตของเชื้อ *Papaya ringspot virus* จากแหล่งปลูกสำคัญของประเทศไทย เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลาง และปลูกเชื้อบนมะละกอพันธุ์แขกดำเพื่อใช้เป็นแหล่งของเชื้อในการทดลอง

๔. นำตัวอย่างเมล็ดพันธุ์มะละกอสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษเก็บรวบรวมและพัฒนาพันธุ์ มาเพาะเพื่อทดสอบความต้านทานโรคในโรงเรือนทดลอง โดยเพาะเมล็ดพันธุ์มะละกอสายพันธุ์ที่ศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษเก็บรวบรวมไว้จำนวนทั้งสิ้น ๓๑ สายพันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS๑, KDLS๒, KNLS๑, LN, MA, Maradol, MIR, SEW ๕๘, SKLD, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ ๓, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HN, HO, HOS no.๑, HOS no.๒, HOS no.๓, KD-Si, KK ๘๐, KN (SR), MI, SK ๐๐๑, SK ๐๐๒, SK ๐๐๓, SK ๐๐๔ และ เบอร์ ๑๒ โดยใช้พันธุ์แขกดำซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมการทดสอบ

๕. ทดสอบความต้านทานต่อโรคด่างจุดวงแหวนโดยการปลูกเชื้อวิธีกล ประมาณ ๒ – ๖ สัปดาห์ จดลักษณะอาการและความรุนแรง เปรียบเทียบกับมะละกอพันธุ์แขกดำ ในกรณีที่พันธุ์ใดมีการแสดงอาการของโรคไม่ชัดเจน จะทำการปลูกเชื้อซ้ำ

๖. ตรวจสอบเชื้อ PRSV บนมะละกอด้วยวิธี ELISA (Agdia) ในกรณีที่ปลูกเชื้อซ้ำ ๒ ครั้งแล้วพืชยังไม่แสดงอาการผิดปกติ และอาจยืนยันผลซ้ำด้วยเทคนิค RT-PCR

๗. เก็บรวบรวมและวิเคราะห์ผลข้อมูลที่ได้ และจัดทำรายงาน

- เวลาและสถานที่ ตั้งแต่ ตุลาคม ๒๕๕๓ ถึง กันยายน ๒๕๕๕ รวม ๒ ปี
กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

๘. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง : จากการทดสอบมะละกอทั้ง ๓๑ สายพันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS๑, KDLS๒, KNLS๑, LN, MA, Maradol, MIR, SEW ๕๘, SKLD, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ ๓, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HN, HO, HOS no.๑, HOS no.๒, HOS no.๓, KD-Si, KK ๘๐, KN (SR), MI, SK ๐๐๑, SK ๐๐๒, SK ๐๐๓, SK ๐๐๔ และ เบอร์ ๑๒ โดยใช้พันธุ์แขกดำซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมการทดสอบ พบว่า

- ๒๑ พันธุ์ ได้แก่ KDDNS, KDLS๑, KDLS๒, KNLS๑, LN, MA, HO, HOS no.๑, HOS no.๒, ท่าพระ ๓, สีทอง, KD-Si, KK ๘๐, Maradol, MIR, SEW ๕๘, Taiwan, KN (SR), SK ๐๐๑, SK ๐๐๒ และ เบอร์ ๑๒ แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนและรุนแรงโดยมีอาการใบด่างและหงิกม้วนผิดรูป (ภาพที่ ๑)
- ๓ พันธุ์ ได้แก่ ลูกผสมออสเตรเลีย, ครั่ง และฮาวาย แสดงอาการใบด่างชัดเจน แต่ไม่มีอาการใบลดรูป (ภาพที่ ๒)
- พันธุ์ HOS no.๓ แสดงอาการใบหดลดรูปชัดเจนแต่ไม่มีอาการด่างร่วม
- ๔ พันธุ์ ได้แก่ ปากช่อง, MI, SK ๐๐๓ และ SK ๐๐๔ จะแสดงอาการโรคที่ไม่รุนแรง มีความทนทานต่อโรคได้ดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ (ภาพที่ ๓)
- ส่วนพันธุ์ SKLD และ HN เมล็ดที่ทดสอบไม่งอก ทำให้ไม่สามารถทำการทดสอบต่อได้

และเมื่อนำใบจากพันธุ์มะละกอที่แสดงอาการของโรคไม่ชัดเจนมาตรวจสอบเชื้อ PRSV พบว่าให้ผลเป็นบวก จากผลที่ได้ดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่ามะละกอทั้ง ๒๙ สายพันธุ์ ไม่มีความต้านทานต่อโรคด่างวงแหวนจุดมะละกอ แต่พันธุ์ปากช่อง, MI, SK ๐๐๓ และ SK ๐๐๔ มีความทนทานต่อโรคดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ (ตารางที่ ๑)

ภาพที่ ๑ ลักษณะอาการใบด่างและรูปอย่างรุนแรง เนื่องจากเชื้อ PRSV

ภาพที่ ๒ ลักษณะอาการอาการใบด่างชัดเจน แต่ไม่มีอาการใบลดรูป เนื่องจากเชื้อ PRSV

ภาพที่ ๓ ลักษณะอาการใบด่างที่ไม่รุนแรง และไม่มีอาการใบลดรูป เนื่องจากเชื้อ PRSV

ตารางที่ ๑ ผลการทดสอบความต้านทานโรคด่างวงแหวนของมะละกอสายพันธุ์ต่าง ๆ

ลำดับ	สายพันธุ์	ลักษณะอาการ/ความรุนแรงโรค	ความต้านทานโรค
๑	แขกดำ (control)	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๒	KDDNS	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๓	KDLS๑	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๔	KDLS๒	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๕	KNLS๑	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๖	LN	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๗	MA	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๘	Maradol	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๙	MIR	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๑๐	SEW ๕๘	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๑๑	SKLD	เมล็ดไม่งอก	-
๑๒	Taiwan	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๑๓	ครั่ง	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่าง	ไม่ต้านทานโรค
๑๔	ท่าพระ ๓	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๑๕	ปากช่อง	แสดงอาการไม่รุนแรง	ทนทานต่อโรค
๑๖	ลูกผสมออสเตรเลีย	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่าง	ไม่ต้านทานโรค
๑๗	สีทอง	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างเหลือง	ไม่ต้านทานโรค
๑๘	ฮาวาย	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่าง	ไม่ต้านทานโรค
๑๙	HN	เมล็ดไม่งอก	-
๒๐	HO	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๒๑	HOS no.๑	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๒๒	HOS no.๒	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๒๓	HOS no.๓	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๒๔	KD-Si	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๒๕	KK ๘๐	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๒๖	KN (SR)	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๒๗	MI	แสดงอาการไม่รุนแรง	ทนทานต่อโรค

๒๘	SK ๐๐๑	แสดงอาการชัดเจน รุนแรงปานกลาง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๒๙	SK ๐๐๒	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค
๓๐	SK ๐๐๓	แสดงอาการไม่รุนแรง	ทนทานต่อโรค
๓๑	SK ๐๐๔	แสดงอาการไม่รุนแรง	ทนทานต่อโรค
๓๒	เบอร์ ๑๒	แสดงอาการชัดเจนและรุนแรง ใบด่างและลดรูป	ไม่ต้านทานโรค

๙. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ : จากผลการทดลองพบว่ามะละกอทั้ง ๒๙ สายพันธุ์ คือ KDDNS, KDLS๑, KDLS๒, KNLS๑, LN, MA, Maradol, MIR, SEW ๕๘, Taiwan, ครั่ง, ท่าพระ ๓, ปากช่อง, ลูกผสมออสเตรเลีย, สีทอง, ฮาวาย, HO, HOS no.๑, HOS no.๒, HOS no.๓, KD-Si, KK ๘๐, KN (SR), MI, SK ๐๐๑, SK ๐๐๒, SK ๐๐๓, SK ๐๐๔ และ เบอร์ ๑๒ ไม่ต้านทานต่อเชื้อ *Papaya ringspot virus* โดยที่พันธุ์ปากช่อง, MI, SK ๐๐๓ และ SK ๐๐๔ มีความทนทานต่อโรคดีกว่าพันธุ์อื่น ๆ ที่นำมาทดสอบ

๑๐. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์ : ได้ข้อมูลว่ามะละกอทุกพันธุ์ที่นำมาทดสอบไม่มีพันธุ์ใดมีความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อ *Papaya ringspot virus* ซึ่งทำให้ไม่สามารถนำมะละกอทั้ง ๒๙ พันธุ์นี้มาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ต้านทานได้ แต่อย่างไรก็ดีพบว่ามีมะละกอ ๔ พันธุ์คือ ปากช่อง, MI, SK ๐๐๓ และ SK ๐๐๔ mujมีความทนทานต่อโรคดีกว่าพันธุ์อื่นซึ่งอาจจะสามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ในอนาคต

๑๑. ปัญหาและอุปสรรค : เนื่องจากในช่วงกลางปี ๒๕๕๔ เกิดปัญหาหนูระบาดกัดเข้าทำลายโรงเรือนมุ้งที่ใช้ในการทำงานวิจัยนี้ (ชั้น ๕ ตึกสิทธิพร) ซึ่งเกิดจากการปรับปรุงชั้น ๔ ตึกสิทธิพร และมีการถอนเก็บเศษวัสดุไม้ ประตู ฝา ฯลฯ ไว้บริเวณชั้น ๔ และ ๕ ของตึกสิทธิพร ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่ของหนู ทำให้หนูเข้ากัดกินเมล็ดพันธุ์และทำลายต้นกล้ามะละกอสายพันธุ์ที่ทดสอบจะหมดทำให้ต้องปลูกซ้ำใหม่หลายครั้ง ทำให้การทดลองดังกล่าวได้ผลล่าช้า รวมถึงปัญหาอุปสรรคอันเนื่องมาจากสภาพอากาศฝนตกหนัก รวมถึงอุทกภัยน้ำท่วมหนักในกรุงเทพ ที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการทำการทดลองด้วย นอกจากนี้เมล็ดมะละกอบางสายพันธุ์ (SKLD และ HN) ไม่งอกและไม่สามารถขอเมล็ดเพิ่มใหม่ได้

๑๒. เอกสารอ้างอิง

: CAB *international*. ๒๐๐๗. **Crop Protection Compendium ๒๐๐๓ Edition**. (Computer Program). CAB International. Wallingford, UK.

Conover, R.A. ๑๙๖๔. Distortion ringspot, a severe virus disease of papaya in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. ๗๗: ๔๔๐-๔๔๔.

Conover, R.A. ๑๙๖๔. Mild mosaic and faint mottle ringspot, two papaya virus diseases of minor importance in Florida. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. ๗๗:๔๔๔-๔๔๘.

Tripathi, S., J.Y. Suzuki, S.A. Ferreira and D. Gonsalves. ๒๐๐๘. *Papaya ringspot virus*-P: characteristics, pathogenicity, sequence variability and control. **Mol Plant Pathol**. ๙(๓): ๒๖๙ –๒๘๐.

๑๓. ภาคผนวก

: ขั้นตอนการตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Papaya ringspot virus* ด้วยเทคนิค DAS-ELISA

๑. ลงรายละเอียดของตัวอย่างและ control ต่าง ๆ บนแผนฝังการตรวจ (loading diagram) (ภาพที่ ๔)

๒. เติม “Capture Antibody” (เจือจาง Capture Antibody ด้วย “Carbonate Coating buffer” ความเข้มข้น ๑X ในอัตราส่วนตามที่ระบุข้างหลอด (๑:๒๐๐) ผสมให้เข้ากัน) ลงใน ELISA plate ปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร ต่อ well

๓. บ่มในกล่องชื้นที่ ๓๗°C นาน ๔ ชั่วโมง หรือที่ ๔°C ข้ามคืน

๔. ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBST buffer ๔ - ๘ ครั้ง อย่างรวดเร็ว

๕. บดตัวอย่างพืชด้วย “General Extract buffer” ในอัตราส่วน ๑:๑๐ (weight : volume General Extract buffer)

๖. เติมตัวอย่างพืช positive และ negative control ปริมาตร ๑๐๐ □ ไมโครลิตร ต่อ well ลงใน ELISA plate จากนั้นบ่มในกล่องชื้นที่ ๓๗°C นาน ๒ ชั่วโมง หรือที่ ๔°C ข้ามคืน

๗. ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBST buffer ๔ - ๘ ครั้ง อย่างรวดเร็ว

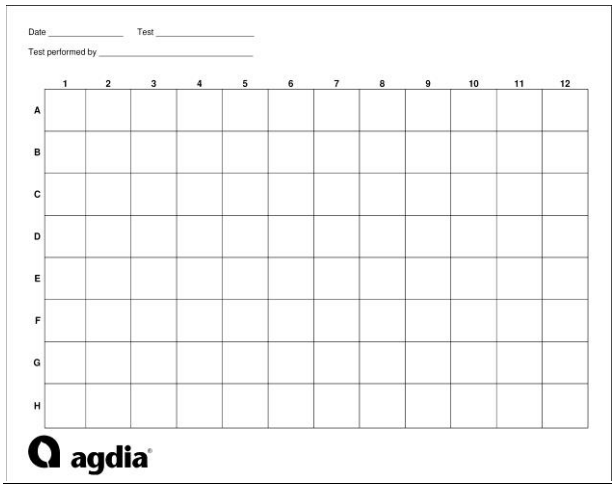
๘. เตรียม “Enzyme Conjugate” (เจือจาง Enzyme Conjugate ด้วย “ECI buffer” ความเข้มข้น ๑X ในอัตราส่วนตามที่ระบุข้างหลอด (๑:๒๐๐) ก่อนใช้งาน ๑๐ นาที) จากนั้นเติม enzyme conjugate ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร ต่อ well ลงใน ELISA plate

๙. บ่มในกล่องชื้นที่ ๓๗°C นาน ๒ ชั่วโมง

๑๐. ล้าง ELISA plate ด้วยสารละลาย PBST buffer ๔ - ๘ ครั้ง อย่างรวดเร็ว

๑๑. เติมสารละลาย “PNP substrate buffer” ปริมาตร ๑๐๐ ไมโครลิตร ต่อ well ลงใน ELISA plate จากนั้นบ่มในกล่องชื้นที่ ๓๗°C ในที่มืดนาน ๓๐ - ๖๐ นาที

๑๒. ตรวจสอบผลของปฏิกิริยาโดยดูสีเปรียบเทียบระหว่าง control ทั้ง ๓ คือ buffer, negative และ positive กับตัวอย่าง โดยปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นบวกจะเกิดสีเหลืองใสชัดเจน ในขณะที่ปฏิกิริยาที่ให้ผลเป็นลบจะไม่เปลี่ยนสี หรือวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น λ ๔๐๕ nm จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย ๓M sodium hydroxide ปริมาตร ๕๐ ไมโครลิตร ต่อ well



ภาพที่ ๔ ELISA loading diagram (agdia)

: Buffer ต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัย

๑. Carbonate Coating buffer (๑X) (๑,๐๐๐ มิลลิลิตร)

- Sodium carbonate (anhydrous)	๑.๕๙ กรัม
- Sodium bicarbonate	๒.๙๓ กรัม
- Sodium azide	๐.๒ กรัม
- น้ำกลั่น	๑,๐๐๐ มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ ๙.๖ จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ ๑ ลิตร เก็บที่ ๔°C

๒. General Extract buffer (๑X) (๑,๐๐๐ มิลลิลิตร)

- Sodium sulfite (anhydrous)	๑.๓ กรัม
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW ๒๔-๔๐,๐๐๐	๒๐.๐ กรัม
- Sodium azide	๐.๒ กรัม
- Powdered egg (chicken) albumin, Grade II	๒.๐ กรัม
- Tween-๒๐	๒๐.๐ กรัม
- น้ำกลั่น	๑,๐๐๐ มิลลิลิตร

เติมน้ำ ๒๐ มิลลิลิตร ลงใน Buffer powder ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ ๙.๘ ด้วย HCl จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นและเติม Tween-๒๐ ลงไป ผสมจนเข้ากัน เก็บที่ ๔ °C

๓. ๑X ECI buffer (๑X) (๑,๐๐๐ มิลลิลิตร)

- Bovine serum albumin (BSA)	๒.๐ กรัม
- Polyvinylpyrrolidone (PVP) MW ๒๔-๔๐,๐๐๐	๒๐.๐ กรัม
- Sodium azide	๐.๒ กรัม

- น้ำกลั่น ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ ๗.๔ จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ ๑ ลิตร เก็บที่ ๔°C

๔. PBST buffer (๑X) (Wash Buffer) (๑,๐๐๐ มิลลิลิตร)

- Sodium chloride ๘.๐ กรัม
- Sodium phosphate, dibasic (anhydrous) ๑.๑๕ กรัม
- Potassium phosphate, monobasic (anhydrous) ๐.๒ กรัม
- Potassium chloride ๐.๒ กรัม
- Tween-๒๐ ๐.๕ กรัม
- น้ำกลั่น ๑,๐๐๐ มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ ๗.๔ จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ ๑ ลิตร เก็บที่ ๔°C

๕. PNP substrate buffer (๑X) (๑,๐๐๐ มิลลิลิตร)

- Magnesium chloride hexahydrate ๐.๑ กรัม
- Sodium azide ๐.๒ กรัม
- Diethanolamine ๙๗.๐ มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น ๘๐๐ มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ ๙.๘ จากนั้นค่อยปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรครบ ๑ ลิตร เก็บที่ ๔°C
ก่อนใช้งาน ละลาย PNP tablet ๑ เม็ด ด้วย PNP solution (๑X) ปริมาณ ๕ มิลลิลิตร ในภาชนะทึบแสง โดยเตรียมก่อนการใช้งาน ๑๕ นาที

๖. Stop reaction solution: ๓ M sodium hydroxide