

การตรวจ Cymbidium mosaic virus ด้วยวิธี Dot-ELISA และ DAS-ELISA

สุรภี กิริยะอังกูร กิตติศักดิ์ กิริยะอังกูร และ นวลจันทร์ คีมา¹

บทคัดย่อ

ในการตรวจสอบ Cymbidium mosaic virus (CyMV) บนกล้วยไม้พันธุ์ต่างๆ ด้วยวิธี dot-ELISA ซึ่งเป็นวิธีการตรวจสอบที่ใช้ nitro cellulose membrane (NCM), Millipore ขนาด 0.45 μ m เป็นที่รองรับปฏิกิริยา โดยใช้ส่วนผสมของ Naphthol AS-MX phosphate และ fast red TR salt (5-chloro 2 toluidinediazonium chloride hemizene chloride) เป็น substrate นั้น สามารถตรวจพบปริมาณของเชื้อไวรัสในน้ำคั้นของพืชที่เจือจางไปได้มากกว่า 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การตรวจสอบด้วย DAS-ELISA ซึ่งก็คือ double-antibody sandwich ELISA ธรรมดาซึ่งใช้ polystyrene microtiter plate เป็นที่รองรับปฏิกิริยา และมี para-nitrophenyl phosphate เป็น substrate เป็นปฏิกิริยาบนแผ่น NCM ที่ฝั่งแห้งแล้วสามารถเก็บไว้ตรวจผลได้เป็นเวลานาน โดยสีชมพูของปฏิกิริยายังคงเดิม ทั้งยังสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้รวดเร็วและคราวละมากๆ เช่นเดียวกับ DAS-ELISA

กล้วยไม้ เป็นไม้ตัดดอกที่มีมูลค่าการส่งออกที่สูงขึ้นเรื่อยๆ ทุกปี จากสถิติที่กรมพาณิชย์สัมพันธ์ กระทรวงพาณิชย์ รวบรวมไว้ ดูจากปี พ.ศ. 2526-2529 มีมูลค่าเฉลี่ยปีละ 400 กว่าล้านบาท ปี พ.ศ. 2530 ประมาณ 480 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2531 สูงขึ้นเป็นประมาณ 600 กว่าล้านบาท (Anon., 1986) มีการขยายการเพาะปลูกเพิ่มขึ้นจนขณะนี้ มีจำนวนรังกล้วยไม้ถึง 3,000 กว่ารัง ในปี พ.ศ. 2531 ขนาดโดยเฉลี่ย 5-20 ไร่ (บริษัทบางกอกฟลาวเวอร์เซ็นเตอร์ จำกัด) มีบางบริษัทใหญ่ที่ส่งออกขยายขนาดของรังออกไปใหญ่สุดประมาณ 100 กว่าไร่ อยู่บริเวณ อ. บางเลน จ. นครปฐม รังกล้วยไม้ส่วนใหญ่จะอยู่ในเขตจังหวัดนครปฐม กรุงเทพฯ สมุทรสาคร ออยุธยา และมีบ้างในเขตจังหวัดอื่น เช่น เชียงใหม่ อุดรธานี ลพบุรี เป็นต้น กล้วยไม้ของไทยถูกส่งไปยังตลาดทั่วโลกมากกว่า 40 ประเทศ ประเทศที่ส่งไปมากที่สุด คือ ประเทศญี่ปุ่น มีมูลค่าถึง 200 กว่าล้านบาท รองลงไป ได้แก่ เยอรมัน อิตาลี เนเธอร์แลนด์ สหรัฐอเมริกา มีมูลค่าใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 40-50 ล้านบาท (Anon. 1988) นอกนั้นเป็นรายย่อยๆ จะเห็นว่าตลาดการส่งออกยังน่าจะขยายได้อีกมากในอนาคต ทั้งประเทศไทยมีความเหมาะสมในด้านต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นสภาพอากาศที่ปลูกเลี้ยงกล้วยไม้ได้ตลอดปีในทุกภาค

ของประเทศ ค่าแรงยังไม่สูง ชนิดและสีของกล้วยไม้ก็มีความสวยงามไม่แพ้ประเทศคู่แข่งอื่นเลย แต่ควรมีการปรับปรุงดูแลในด้านคุณภาพและการเพิ่มผลผลิตต่อต้น ซึ่งไปเกี่ยวพันในหลายด้าน เช่น การขนส่ง อายุการตัดดอก การดูแลควบคุมด้านโรคและแมลง

กล้วยไม้มีโรคไวรัสอยู่หลายชนิด แต่ชนิดที่พบมากและสร้างความเสียหายให้แก่กล้วยไม้ที่ควรควบคุมการแพร่ระบาดของโรค คือ Cymbidium mosaic virus (CyMV) จะทำให้กล้วยไม้พวก *Dendrobium* sp. ลำต้นบิด ข้อสั้น ใบต่างลาย ข้อดอกสั้น ดอกด่าง ผลผลิตน้อยลง ถ้าเป็นโรคกับ *Oncidium* sp. จะทำให้ดินแคะแกระ ใบด่าง (Fig. 1) ใบมีรูปร่างใบมีลักษณะเป็นเส้น เนื้อใบหดหายไป ข้อดอกสั้น ดอกผิดปกติ บางส่วนของดอกแห้งหายไป (Fig. 2) ดอกเล็กลง ร่วงง่าย การออกดอกไม่สม่ำเสมอ บางรังเป็นถึง 100% กับ *Oncidium* sp. เกิดจากการแยกหน่อเองภายในรังจากต้นเป็นโรค ถ้าเกิดบน *Cattleya* sp. จะทำให้ดอกด่าง (Fig. 3) ดอกเสียคุณภาพไป CyMV เป็นไวรัสที่มีขนาดอนุภาคประมาณ 450-500 nm สามารถถ่ายทอดได้ด้วยวิธีสัมผัส และติดไปกับส่วนขยายพันธุ์ของกล้วยไม้

ปัญหาของการควบคุมโรคไม่ได้ขณะนี้คือ เกษตรกรส่วนใหญ่ไม่รู้จักหรือคุ้นเคยกับลักษณะอาการของโรค และไม่มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคไวรัส จึงขาดความเอาใจใส่

¹กลุ่มงานวิทยาศาสตร์ กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร



Fig. 1. The mosaic symptom on infected leaves of *Oncidium* sp.



Fig. 2. The tearing and deformed symptom of the flowers from infected *Oncidium* sp.



Fig. 3. Mosaic symptom on a cattleya flower which was infected by CyMV.

ที่จะป้องกันกำจัด บางรายไม่เข้าใจถึงการเป็นโรคไวรัส แล้วมีผลต่อการเสื่อมโทรมของต้น ทำให้ไม่สามารถให้ผลผลิตในระยะยาวได้ ตลอดจนไม่รู้จักวิธีการควบคุมโรคในโรงกล้วยไม้ ด้วยตนเองดังกล่าวข้างต้น เป็นข้อมูลจากการแจกแบบสอบถามจำนวน 150 ราย มีเพียง 15 รายที่มีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับโรคไวรัสของกล้วยไม้

ดังนั้น จึงควรศึกษาหาแนวทางในการพัฒนาการตรวจสอบโรคไวรัสของกล้วยไม้ให้รวดเร็ว เหมาะสม เพื่อการเผยแพร่หรือให้บริการแก่เจ้าหน้าที่ส่งเสริม เพื่อส่งเสริมแก่เกษตรกรหรือเปิดให้มีการฝึกอบรมเกษตรกรโดยตรง แต่หัวใจของการจะตรวจสอบให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว แม่นยำ และทั้งสะดวกเหมาะสม จำเป็นต้องมีแอนติซีรัม (As) ของไวรัสชนิดนั้น ๆ อย่างเพียงพอ ในการทดลองครั้งนี้ ทดลองการแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์เพื่อผลิต As และทดสอบการตรวจสอบ CyMV ด้วย dot-ELISA และ DAS-ELISA ซึ่ง dot-ELISA นั้น Banttari and Goodwin (1985) ได้กล่าวว่าเป็นวิธีการตรวจสอบเชื้อที่ค่อนข้างมีประสิทธิภาพดีกว่า DAS-ELISA โดยที่ทั้งสองวิธีเป็นการตรวจสอบแบบใช้หลักการของ enzyme linked immunosorbent assay แต่ dot-ELISA จะใช้ nitro cellulose membrane (NCM) เป็นตัวรองรับปฏิกิริยาสีชมพู เพราะใช้ substrate ที่เป็นส่วนผสมของ Naphthol AS-MX phosphate กับ fast red TR salt (5-chloro-2 toluidinediazonium chloride hemizene chloride) เป็นตัวตรวจสอบปฏิกิริยา ในขณะที่ DAS-ELISA ใช้ polystyrene microtiter plate เป็นตัวรองรับปฏิกิริยาสีเหลือง ที่ใช้ substrate para-nitrophenyl phosphate

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ CyMV

นำใบของ *Oncidium* sp. ที่เป็นโรคเกิดจาก CyMV จำนวน 400 กรัม มาบดใน 0.5 M Na-phosphate buffer pH 7.5 ในอัตราส่วน 1 : 2 (น้ำหนัก : ปริมาตร) กรองเอาน้ำคั้นผสมให้เข้ากันกับ chloroform และ CCl_4 ในปริมาณที่เท่ากัน เป็นอัตราส่วน 25% ในน้ำคั้น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาส่วนที่เป็นน้ำใสมาทวนกับ 5% ของ Polyethylene glycol 6,000 และ 1% ของ triton X-100 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทใส่หลอดหมุนเหวี่ยงวางทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมงในตู้เย็น หลังจากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง 8,000 g เป็นเวลา 30 นาที แล้ว

นำตะกอนมาละลายด้วย 0.1 M Na-phosphate buffer pH 7.5 โดยใช้เครื่อง homogenizer เมื่อละลายดีแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที นำน้ำใสไปหมุนเหวี่ยงที่ 30,000 g เป็นเวลา $1\frac{1}{2}$ ชั่วโมง นำตะกอนที่ได้มาละลายและหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที อีกครั้ง นำน้ำใสไปผ่านชั้นของน้ำตาล (sucrose density gradient) ที่มีความเข้มข้น 10–40% ตามลำดับ ในหลอดหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 24,000 g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แยกชั้นของไวรัสแต่ละชั้นออกจากกันด้วย fractionator นำแต่ละชั้นไปตกตะกอนไวรัสออกจากน้ำตาล

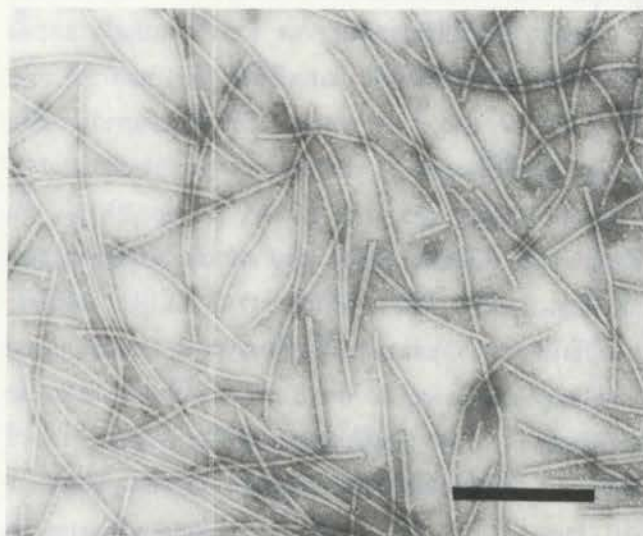


Fig. 4. Electron micrograph of purified CyMV, negatively stained with 2% phosphotungstic acid pH 7.0, Bar = 300 nm.

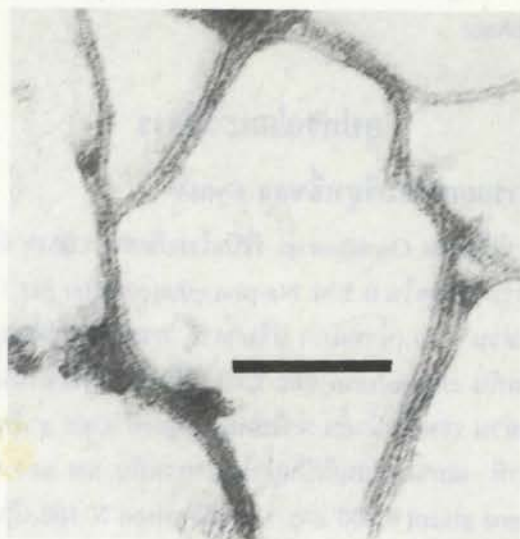


Fig. 5. CyMV particles were decorated by AsCyMV and observed under EM. Bar = 300 nm.

ด้วยการนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง แล้วเอาตะกอนไวรัสที่ได้ไปตรวจหาอนุภาคของไวรัส ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Fig. 4 และ 5)

2. การผลิตแอนติซีรัม (As)

แยกไวรัสบริสุทธิ์สัปดาห์ละ 1 ครั้ง แต่ละครั้ง ละลายไว้เป็น 1 ml แล้วผสมให้เข้ากันดีกับ Faud incomplete adjuvant 1 ml ฉีดเข้ากล้ามเนื้อสะโพกของกระต่าย 3 ครั้ง สลับกัน ข้างขวาและข้างซ้าย ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ หลังจากฉีดครั้งสุดท้าย 20 วัน เจาะเลือดกระต่ายทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 7 สัปดาห์ ทำการวัด titer ของ As แต่ละครั้งที่เจาะได้ทั้ง 7 ครั้ง

3. การสกัด gamma globulin (IgG) และ enzyme conjugate

นำ As 2 ml ผสมกับ phosphate buffer saline (PBS) แล้วนำไปผสมกับ 36% sodium sulfate 5 ml นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 g 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25–30°C นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วย 18% sodium sulfate 2 ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตะกอนโดยเอาไปหมุนเหวี่ยงที่ 5,000 g 10 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วย PBS 4 ml แล้ว dialyse ใน PBS 1 ลิตร นาน 4 ชั่วโมง 2 ครั้ง นำ IgG นี้ไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 rpm 10 นาที เอาตะกอนทิ้งไป วัดความเข้มข้นของ IgG แล้วเติม NaN_3 0.05% ใน IgG เก็บไว้ในตู้เย็นแช่แข็ง

การเตรียม enzyme conjugate โดยนำ enzyme alkaline phosphatase Type VII 0.3 ml ผสมกับ IgG ที่เจือจางมีปริมาณโปรตีนประมาณ 1 mg/ml จำนวน 0.5 ml นำส่วนผสมนี้ dialyse ใน PBS 3 ครั้ง ๆ ละ 500 ml นานครั้งละ 1 ชั่วโมง แล้วจึงผสม glutaraldehyde ที่เข้มข้น 25% ลงไปให้ได้ความเข้มข้นของ glutaraldehyde เป็น 0.6% ใน IgG conjugate กับ enzyme ตั้งส่วนผสมไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 ชั่วโมง แล้วจึง dialyse ใน PBS อีก 3 ครั้ง ๆ ละ 500 ml ที่อุณหภูมิตู้เย็น นานครั้งละ 2 ชั่วโมง จากนั้นเติม bovine serum albumin ประมาณ 5 mg/ml แล้วเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิตู้เย็นธรรมดา

4. การตรวจสอบ CyMV ด้วยวิธี dot-ELISA และ DAS-ELISA

dot-ELISA (Bantari and Goodwin, 1985)

1. แผ่น NCM ขนาด 0.45 um ลงใน As ของ CyMV ที่เจือจาง 1:100 และ 1:1000 ใน coating buffer อย่างละแผ่น แล้วนำไป incubate ที่ 37°C 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้ง

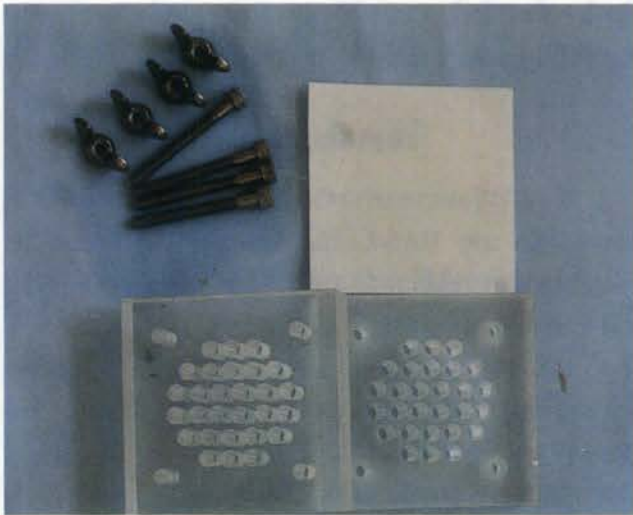


Fig. 6. The dot apparatus which is used to be a template for making spots of dot-ELISA reaction.

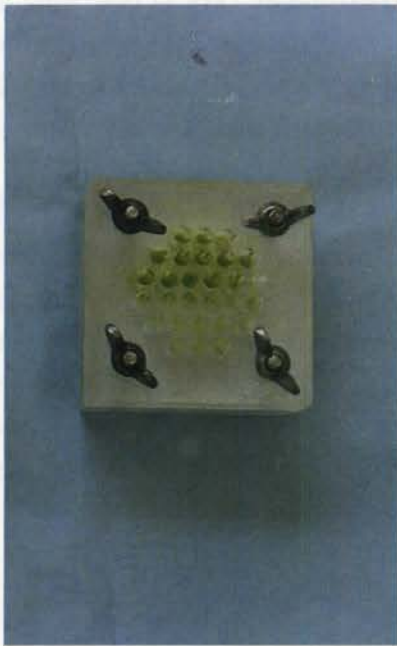


Fig. 7. The crude sap samples run through nitrocellulose membrane in the template.

ครั้งละ 5 นาที ด้วย Tris-buffer saline pH 7.4 ที่มี Tween 80 0.5% (TBS-T80)

2. เตรียมตัวอย่างน้ำคั้นจากใบ *Oncidium* sp. เป็นโรคใบดงและเชื้อจากเป็น $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:2 \times 10^5$, $1:4 \times 10^5$, $1:8 \times 10^5$ และ $1:10^6$ ด้วย phosphate buffer saline ที่มี Tween 20 0.05% และ polyvinylpyrrolidone 4000 2% (PBS-T20 + PVP) หยอดน้ำคั้นตัวอย่างละ

200 μ l ลงใน template ซึ่งเป็นแม่พิมพ์ที่รองรับตัวอย่างน้ำคั้นแต่ละตัวอย่างไม่ให้ไหลมาปะปนกัน template นั้นทำด้วยพลาสติกใสที่เจาะรูทั้งสองข้างตรงกัน (Fig. 6) เมื่อใส่แผ่น NCM ระหว่างกลางของ template แล้วขันน็อตให้แน่น หลังจากหยอดตัวอย่างแล้วจะได้ลักษณะดัง (Fig. 7) หลุมทดสอบเปรียบเทียบกับหยอด buffer PBS-T20 + PVP แล้วนำคั้นใบ *Oncidium* ปกติที่เข้มข้น $1:10^2$ อย่างละ 1 หลุม นำไป incubate ในตู้เย็นประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ น้ำคั้นไหลผ่าน NCM จนหมดจึงนำมาแกะเอา template ออก ล้าง NCM ด้วย TBS-T80 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3. นำ NCM ไป incubate อีก 1 ชั่วโมง ใน PBS-T20 ที่มี PVP 3% ที่อุณหภูมิ 37°C หลังจากนั้นล้าง 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีด้วย TBS-T80

4. incubate NCM อีก 1 ชั่วโมง ใน enzyme conjugate IgG ที่เจือจาง $1:750$ ด้วย PBS-T20 ที่มี PVP 2% และ oval oval albumin 0.2% ไว้ที่ 37°C แล้วจึงล้างดังในข้อ 1.

5. ใส่ substrate ที่มีส่วนผสมของสารละลาย fast red TR salt 6 mg/ml กับ 0.1% naphthol As-MX phosphate ใน 0.2 M Tris-Hcl buffer pH 8.2 ลงบน NCM เขย่าประมาณ 2-3 นาที เมื่อปฏิกิริยาสีชมพูขึ้นชัดเจนแล้วจึงหยุดปฏิกิริยาโดยเท substrate ทิ้งไป ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง วางผึ่งให้แห้ง ตรวจดูปฏิกิริยา

DAS-ELISA (Clark and Adams 1977; Clark, 1981)

ใช้ polystyrene plate เป็นตัวรองรับการเกิดปฏิกิริยาในการทำ DAS-ELISA ใช้อัตราความเข้มข้นของ As ของ CyMV, enzyme conjugate IgG และการเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นจากใบพืช รวมทั้งการ incubate ทำเช่นเดียวกันกับ dot-ELISA ยกเว้นการล้าง plate ใช้ PBS-T20 แทน TBS-T80 ส่วน substrate ที่ใช้ คือ para-nitrophenyl phosphate 1mg/ml ใน diethanolamine buffer และหยุดปฏิกิริยาของ substrate ด้วย 3N NaOH

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์

เชื้อไวรัสบริสุทธิ์ที่แยกได้มีปริมาณความเข้มข้นแต่ละครั้งประมาณ 7.00 mg ต่อใบ *Oncidium* sp. 400 gm.

2. การผลิต As

ผลของการวัด titer ของ As ด้วยวิธี ring interface test พบว่า As ที่จะได้ในสัปดาห์ที่ 5 และ 6 มีความเข้มข้นสูงสุดคือ $1:2048$

3. การสกัด IgG และ enzyme conjugate

เมื่อทดสอบความเข้มข้นของ IgG ที่เหมาะสมในการใช้พบว่าต้องนำมาเจือจาง 1:1000 ก่อนใช้ สำหรับ enzyme conjugate พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ คือ 1:750

4. การตรวจสอบด้วยวิธี dot-ELISA และ DAS-ELISA

dot-ELISA จะเกิดปฏิกิริยาจุดสีชมพูบนแผ่น NCM ตั้งแต่ความเข้มข้นของน้ำคั้นพืชที่ $1:10^2 - 1:20^6$ โดยสีชมพูจะเข้มข้นที่สุดที่ $1:10^2$ แล้วสีจางลงตามลำดับจนถึง $1:10^6$ จุดที่เป็น buffer และน้ำคั้นใบพืชปกติจะไม่ปรากฏปฏิกิริยาของสีเลย (Fig. 8) สำหรับ DAS-ELISA จะให้ปฏิกิริยา

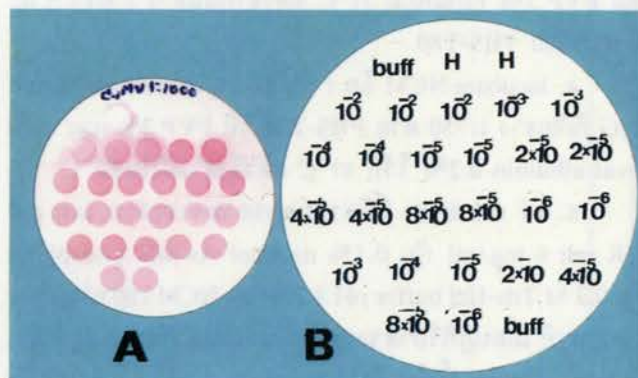


Fig. 8. A. dot-ELISA reaction of CyMV disease on nitro-cellulose membrane which was applied with AsCyMV in dilution of 1:1000. B. The explanation pattern of Figure A, which shows the dilution of crude sap samples ($10^{-2} - 10^{-6}$), healthy (H) and buffer (buff).

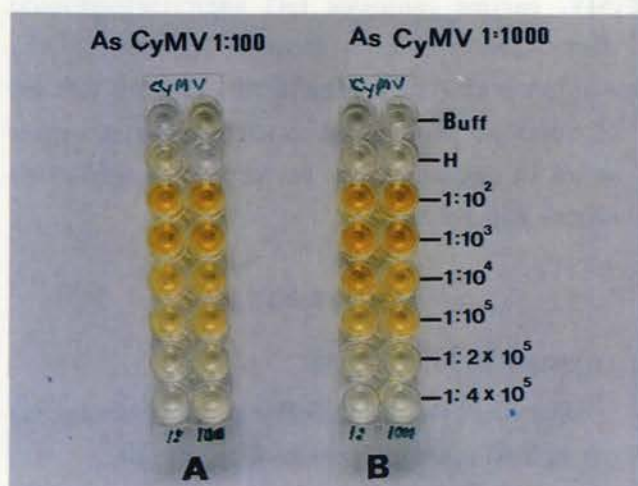


Fig. 9. DAS-ELISA test of CyMV on polystyrene microtiter plates which were applied 1:100 (A) and 1:1000 (B) of As-CyMV dilution. The positive reaction show yellow color from the dilution of $1:10^2 - 1:4 \times 10^5$ of crude sap disease on the both strips.

สีเหลือง ตั้งแต่ความเข้มข้นของพืชที่มีความเข้มข้น $1:10^2 - 1:10^5$ ส่วนหลุมที่เป็น buffer และน้ำคั้นจากใบพืชปกติจะไม่มีสี (Fig. 9)

วิจารณ์และสรุป

จากการวัดผลของการตรวจสอบเชื้อ CyMV ด้วยวิธี dot-ELISA และ DAS-ELISA จะเห็นว่า dot-ELISA จะให้ผลในการตรวจได้ไวกว่า DAS-ELISA ถึง 10 เท่า และยังสามารถเก็บแผ่น NCM ที่แห้งไว้ดูปฏิกิริยาได้เป็นเวลานานนับปี โดยสีชมพูของปฏิกิริยายังคงเดิม สามารถใช้ตรวจสอบตัวอย่างได้คราวละมาก ๆ เช่นเดียวกับ DAS-ELISA แต่ dot-ELISA มีข้อจำกัดในการใช้ เพราะอาจจะมีความสะดวกไม่มากเท่ากับ DAS-ELISA ที่พัฒนาตัวภาชนะที่รองรับปฏิกิริยาเป็น microtiterplate ที่ใช้สะดวกมากกว่า NCM ที่เป็นตัวรองรับน้ำคั้นของแต่ละตัวอย่างให้แยกจากกัน นอกจากนี้ dot-ELISA ยังไม่มีการพัฒนาเครื่องอ่านค่าของความเข้มข้นของปฏิกิริยาเหมือน DAS-ELISA ดังนั้น dot-ELISA จึงเหมาะสำหรับใช้ในห้องทดลองที่จะตรวจสอบไวรัสชนิดที่มีความเข้มข้นน้อย ๆ ในพืช อย่างไรก็ตาม CyMV เป็นไวรัสที่มีปริมาณความเข้มข้นในใบพืชค่อนข้างสูง จึงสามารถใช้ DAS และ dot-ELISA ตรวจสอบให้ผลดีทั้ง 2 วิธี

การผลิต As เพื่อใช้ในการตรวจสอบไวรัสนี้ เป็นหัวใจของการนำไปสู่แนวทางการป้องกันกำจัดโรค CyMV ที่ได้ผล โดยการหลีกเลี่ยงไม่เอาต้นพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่เป็นโรคไปขยายพันธุ์ต่อ และแยกต้นเป็นโรคออกไปไม่ให้ปะปนกันกับต้นไม่เป็นโรค ซึ่งจะทำให้โครงการผลิตต้นพันธุ์ปลอดโรคมีโอกาสประสบความสำเร็จได้ กลุ่มงานวิสาวิทยาจึงมีแผนในการที่จะผลิตแอนติซีรั่มให้เพียงพอที่จะตรวจวินิจฉัยโรค และแลกเปลี่ยน As กับสถาบันวิจัยอื่น ๆ

เอกสารอ้างอิง

- Anonymous. 1986. Exports Classified by Commodity. Department of Business Economics. p. 8.
- Anonymous. 1988. Exports Classified by Commodity. Department of Business Economics. p. 33.
- Bantari, E.E. and P.H. Goodwin. 1985. Detection of Potato virus S, X and Y by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay on Nitrocellulose Membranes (Dot-ELISA). Plant Disease. 69(3) : 202 - 205.
- Clark, M.F. 1981. Immunosorbent Assay in Plant Pathology. Ann. Rev. Phytopathol. 19 : 83 - 106.
- Clark, M.F. and A.N. Adam. 1977. Characteristics of the Microplate Method Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. J. Gen. Virol. 34 : 475 - 483.

Detection of Cymbidium Mosaic Virus by Dot-ELISA and DAS-ELISA Technique

By

Surapee Kiratiya-angkul, Kittisak Kiratiya-angkul and Nualchan Deema

Plant Pathology and Microbiology Division, Department of Agriculture Bangkok, Bangkok, Thailand, 10900.

ABSTRACT

Two ELISA techniques were applied to detect Cymbidium mosaic virus (CyMV) in *Oncidium* orchid species. The dot-ELISA technique uses nitro cellulose membrane (NCM) with a millipore size of 0.45 μ m, as a support for the reaction. A mixture of Naphthol AS-MX phosphate and fast red TR salt (5-chloro-2-toluidinediazonium chloride hemizene chloride) was used as the substrate. A positive reaction of the dot-ELISA technique shows as a pink spot between the substrate and enzyme phosphatase type VII on the NCM. The DAS-ELISA (double antibody sandwich ELISA) technique uses a polystyrene microtiter plate as the support for the reaction. A positive reaction shows as a yellow colour between the substrate (Para-nitrophenyl) and enzyme alkaline phosphatase in wells of the plate. The dot-ELISA technique is about ten times more sensitive than the DAS-ELISA technique in detecting the virus particles. The pink spot of the positive reaction on the NCM in the dot-ELISA technique is permanent in dry conditions and able to be kept for a long time. Both ELISA techniques are highly efficient in diagnosing the CyMV and allow a large number of samples to be checked in a short time.
