การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus*

Antiserum production of *Bean yellow mosaic virus*

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล วันเพ็ญ ศรีทองชัย

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

รายงานความก้าวหน้า

การจำแนกชนิดไวรัส พบอาการต้นแกลดิโอลัสมีอาการใบด่างเป็นแถบ ใบเล็กลง มีขีดประขาวกระจายทั้งใบและมีอาการแคระแกร็น ช่อดอกเล็กลง มีอาการดอกด่างขาว ก้านช่อดอกสั้น และเมื่อตรวจสอบดูเชื้อสาเหตุของโรคด้วยกล้องจุลทัศน์อีเล็กตรอน พบอนุภาคของเชื้อไวรัสที่มีรูปร่างเป็นท่อนยาวคด ที่มีความยาวประมาณ 750 nm ในส่วนของการถ่ายทอดโรคและพืชทดสอบนั้นใช้ต้น *Chenopodium Amaranticolor* และ *Chenopodium quinoa* หลังจากปลูกเชื้อ แสดงอาการเป็นจุดแผลสีเหลืองขอบสีแดง ส่วนต้นแกลดิโอลัสแสดงอาการด่างขีดประขาวที่ใบอ่อน หลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 1 เดือน เชื้อนี้ถ่ายทอดได้ด้วยน้ำคั้นผ่านทางบาดแผลและมีเพลี้ยอ่อน เช่น *Myzus circumflexus, Aphis fabae* เป็นแมลงพาหะ ในส่วนของการแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์และผลิตแอนติซีรัม และการทดสอบคุณภาพของแอนติซีรัมด้วยวิธี NCM-ELISA นั้นยังอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

รหัสการทดลอง 03-04-54-04-03-01-02-54

คำนำ

แกลดิโอลัสมีมากกว่า 150 ชนิด มีทั้งกลิ่นหอมและไม่มีกลิ่น ปัจจุบันมีพันธุ์ที่ปลูกเป็นการค้าเกือบ 3,000 พันธุ์ สำหรับพันธุ์ที่ปลูกในประเทศไทยไม่แน่นอน เพราะได้มีการสั่งพันธุ์ แกลดิโอลัสใหม่ ๆ เข้ามาปลูกอยู่เสมอ เพราะต้องการให้ตรงกับความนิยมของผู้ใช้ และคุณภาพ ของพันธุ์ที่ได้จากการเก็บหัวพันธุ์มาปลูกจะลดลง แกลดิโอลัสจัดเป็นไม้ดอกเมืองหนาว ที่มีการผลิตเป็นการค้ามาไม่นาน ตลาดยังไม่กว้างขวาง ราคาของดอกแกลดิโอลัสจะแตกต่างไปตามคุณภาพ ซึ่งเป็นไปตามขนาดความยาวของก้านดอกเป็นสำคัญ ราคาเฉลี่ยจะอยู่ระหว่าง 1-8 บาท ต่อช่อดอก ปัจจุบันแกลดิโอลัสหรือซ่อนกลิ่นฝรั่ง เป็นไม้ตัดดอกที่ได้รับความนิยมสูงมีสีสันสะดุดตา เช่น สีขาว เหลือง ชมพู แดง ม่วง ส้ม มีช่อดอกยาว เหมาะสำหรับปลูกเพื่อตัดดอกเป็นการค้า เพราะสามารถตัดช่อดอกได้ตั้งแต่ดอกยังไม่บาน และปัจจุบันนี้พื้นที่การปลูกแกลดิโอลัสส่วนใหญ่จะเป็นบริเวณจังหวัดทางภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ เชียงราย และในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น อ.ปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา และในพื้นที่บริเวณเขาค้อ จังหวัดเพชรบูรณ์ ส่วนใหญ่แกลดิโอลัสที่ปลูกจะส่งมาขายยังตลาด ในกรุงเทพมหานคร และส่งไปขายยังตลาดต่างประเทศอีก เช่น ซาอุดิอาระเบีย แคนาดา ซึ่งประสบปัญหาเกี่ยวกับดอกไม่สม่ำเสมอ ค่าขนส่งสูง ปลายช่อดอกโค้งงอ รวมทั้งปัญหาของโรคและแมลงที่ทำให้คุณภาพดอกลดลง โดยเฉพาะโรคใบด่างดอกด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ซึ่งเชื้อสามารถติดมากับหัวพันธุ์ที่นำเข้า รวมทั้งมีเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะ ทำให้เกิดการระบาดได้มากและรวดเร็ว ส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของดอกแกลดิโอลัส โดยจะมีอาการปรากฏชัดบนใบและดอก โดยจะเห็นรอยด่างเป็นทางทำให้ดอกไม่มีคุณภาพและไม่สมบูรณ์

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่ติดมากับหัวพันธุ์ จึงจัดว่ามีความจำเป็นเพื่อป้องกันการระบาด และเพื่อสนับสนุนการการผลิตแกลดิโอลัสให้มีคุณภาพ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้เพื่อวิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ที่ติดมากับหัวพันธุ์แกลดิโอลัส ให้มีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ เพื่อให้ได้หัวพันธุ์ที่มีคุณภาพและปลอดโรค และเพื่อส่งเสริมการผลิตแกลดิโอลัสให้มีคุณภาพ เป็นการพัฒนาคุณภาพการผลิตในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- ตัวอย่างแกลดิโอลัสเป็นโรคใบด่าง
- กล้องจุลทัศน์อีเล็กตรอน, ultracentrifuge, เครื่อง Thermal Cycler
- กระต่ายทดลอง และกรงเลี้ยงกระต่าย

วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1 การจำแนกชนิดไวรัส เชื้อสาเหตุ Bean yellow mosaic virus

ลักษณะอาการของโรค

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างแกลดิโอลัสที่แสดงอาการใบด่างมาศึกษา โดยทำควบคู่ไปกับการตรวจสอบดูเชื้อสาเหตุของโรคด้วยกล้องจุลทัศน์อีเล็กตรอน และทดลองปลูกเชื้อบนต้นแกลดิโอลัสที่ปลูกจากหัวพันธุ์ที่ได้รับการตรวจสอบแล้วว่าปลอดโรคไวรัส เก็บต้นไว้ ตรวจดูอาการติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน

ศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อไวรัส

สำรวจและเก็บตัวอย่างแกลดิโอลัส นำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทัศน์อิเล็กตรอน ด้วยการบดตัวอย่างเป็นโรคในสารละลาย phosphotungstic acid 2% pH 6.8 ใช้แผ่นกริดที่เคลือบหน้ากริดด้วย colloidient และเคลือบทับด้วยผง carbon บริสุทธิ์ ขนาด 300 mesh วางผึ่งจนกริดที่จับตัวอย่างแห้งแล้วจึงนำไปตรวจสอบอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทัศน์อิเล็กตรอน

ศึกษาการถ่ายทอดโรคและพืชทดสอบ

นำน้ำคั้นของตัวอย่างแกลดิโอลัส มาปลูกเชื้อลงบนต้นแกลดิโอลัสและพืชทดสอบ *Chenopodium amaranticolor, C. quinoa,* ที่มีใบ 3-5 ใบ โดยบดตัวอย่างเป็นโรคในสารละลาย 0.1 M Sodium phosphate buffer pH 7.5 ที่มี 0.2% Sodium sulphyte แล้วไปทาลงบนใบพืชแต่ละชนิดที่โรยผง celite ตรวจอาการของโรคเป็นเวลา 1-3 เดือน ในกรงกันแมลง

ขั้นตอนที่ 2 การแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์และผลิตแอนติซีรัม

บดตัวอย่างใบ Chenopodium ที่เป็นโรคจำนวน 100 gm ใน blander กับ 300 ml ของ 0.5M sodium citrate pH 6.5 ที่มี 5 mM EDTA และ 0.5 thioglycollic acid บดในสภาพเย็น กรองกากพืชทิ้งไปด้วยผ้ากรอง นำน้ำคั้นผสมกับ 25% chloroform ให้เข้ากันดี ตกตะกอนเอาเศษพืชออกไปด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 g นาน 10 นาที นำน้ำใสส่วนบนมาเติม polyethyleneglycol (mol.wt. 6,000) จำนวน 10% ของของเหลวโดยกวนให้เข้ากันดีที่ 4°C นาน 1 ชั่วโมงแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 g นาน 30 นาที ละลายตะกอนด้วย 50

ml ของ 5mM soidum borate buffer ที่มี 0.5 mM EDTA pH 9.0 แล้วเติม Triton X-100 ลงไป 2% ของของเหลวกวนให้เข้ากันนาน 30 นาที หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g นาน 15 นาที นำสารละลายข้างบนมาหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วสูง เพื่อตกตะกอนไวรัสลงมาที่ความเร็ว 77,000 g นาน 1½ ชั่วโมงละลายตะกอนด้วย 2 ml ของ 5 mM EDTA pH 9.0 นำมาผ่านวิธีการ sucrose density gradient ที่มีน้ำตาลที่ 10-40% แล้วหมุนเหวี่ยงที่ 74,000 g นาน 1½ ชั่วโมง ดึงแถบสีขาวของไวรัสออกจากชั้นของน้ำตาลแล้วเจือจางด้วย 5 mM EDTA pH 9.0 นำมาตกตะกอนไวรัสด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 77,000 g นาน 2 ชั่วโมง ละลายตะกอนของไวรัส นำไปวัด spectrophotometer เพื่อคำนวณความเข้มข้นของไวรัสและตรวจสอบขนาดอนุภาคของเชื้อด้วยกล้องจุลทัศน์อิเล็กตรอน

การฉีดกระต่ายและเจาะเลือดเก็บแอนติซีรัม

แยกเชื้อ Bean yellow mosaic virus ด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น สัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แล้วนำไปฉีดกระต่าย โดยละลาย BYMV เป็น 1 ml ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 1 ml ให้เข้ากันดี แล้วจึงฉีดเข้ากล้ามเนื้อสะโพกของกระต่ายสลับกันสัปดาห์ละข้าง 3 สัปดาห์ หลังจากฉีดครั้งสุดท้ายแล้ว 20 วัน เจาะเลือดติดต่อกันสัปดาห์ละครั้ง จำนวน 6 สัปดาห์ แยกเม็ดเลือดแดงออกทิ้งไปแล้วเก็บแอนติซีรัม โดยวางเลือดกระต่ายไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมงหรือเก็บในตู้เย็นข้ามคืน แล้วนำมาปั่นหมุนเหวี่ยงแยกเล็ดเลือกแดงทิ้งไป แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ml แล้วเก็บไว้ที่ -80°C

การเตรียม IgG ของแอนติซีรัม BYMV

การสกัด Immuno gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG โดยนำแอนติซีรัมมาผสมให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:9 แล้วเติม ammonium sulphate ที่อิ่มตัวลงไปในปริมาณที่เท่ากับสารละลายแอนติซีรัมที่เจือจางนี้ แล้วบ่มปฏิกิริยาไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm (รอบต่อนาที) นาน 20 นาที เพื่อตกตะกอนด้วย centrifuge แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยครึ่งเท่าของ phosphate buffer saline (PBS) แล้ว dialyse ใน PBS 1 ลิตร นาน 4 ชั่วโมง 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย Spectrophotometer ที่ OD 280 nm เพื่อปรับให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนเป็น 1 mg/ml ทดลองตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA ตามขั้นตอนในข้อ 1.3 โดยเจือจาง IgG เป็น 1: 500 , 1:1,000 และ 1:2,000 เท่า เตรียมน้ำคั้นพืชเจือจางเป็น 1:10 เท่า

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบคุณภาพของแอนติซีรัมด้วยวิธี NCM-ELISA

ตรวจสอบด้วยวิธี NCM-ELISA

1. แบ่งตัวอย่างใบพืชที่ต้องการตรวจสอบบดละเอียดในถุงพลาสติกด้วย Extraction buffer 1 ml
2. วางรูปแบบของแผ่น NCM ด้วยการทำเครื่องหมายที่ตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงตัวอย่างจาก 1-45 ถึงตัวอย่างสุดท้ายได้ชัดเจนตรงตารางที่เขียนขึ้น
3. แช่แผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM แช่ลงใน

TBS นาน 5 นาที

4. คีบแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่ได้แช่ไว้ วางลงบนแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 แผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า ใช้ pasture pipet ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง
5. หยดตัวอย่างน้ำคั้นของพืช 1-2 หยด หรือประมาณ 25 ul ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วคีบแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดทิ้งไว้ประมาณ 10-20 นาที (แผ่นตัวอย่างนี้สามารถเก็บใส่ถุงพลาสติกแช่ตู้เย็นไว้ได้นาน 2-3 สัปดาห์)
6. นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้วแช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี blocking solution อยู่ 10 ml (TBS 20 ml +นมพร่องไขมันเนย + 0.8 ml 25% titon X100) แช่นาน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องหรือประมาณ 27-30°C
7. เท blocking solution ออกใส่ส่วนผสมของ IgG ของ BYMV ใน buffer TBS + 2% นมพร่องไขมันเนยหรือ blocking solution นั้นเอง ในอัตรา 40 ul ต่อ 10 ml TBS + 2% milk แช่นาน 1 ชั่วโมง ในสภาพเช่นเดียวกับข้อ 6
8. ล้างแผ่น NCM ด้วย T-TBS 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที
9. เทส่วนผสม GAR 140 ul ใน 10 ml TBS+2% นมพร่องไขมันเนย บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง เช่นเดียวกับข้อ 6 แล้วล้างเช่นเดียวกับข้อ 8
10. เทส่วนผสม substrate รอดูผลประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาสีชมพูเข้มตามต้องการแล้ว เท substrate ออกและเทน้ำกลั่นลงแทน เป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา สังเกตุสีที่เกิดขึ้น

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2554 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2555

สถานที่ - ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 การจำแนกชนิดไวรัส เชื้อสาเหตุ Bean yellow mosaic virus

ลักษณะอาการของโรคและศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อไวรัส

พบอาการต้นแกลดิออลัสมีอาการใบด่างเป็นแถบ และด่างประขาวด่างเป็นขีดทั่วทั้งต้น ใบเล็กลง และมีอาการแคระแกร็น ช่อดอกเล็กลง ก้านช่อดอกสั้น มีขีดประขาวกระจายทั้งใบและช่อดอกทำให้ดอกเล็กลง มีอาการดอกด่างขาว และเมื่อตรวจสอบดูเชื้อสาเหตุของโรคด้วยกล้องจุลทัศน์อีเล็กตรอน พบอนุภาคของเชื้อไวรัสที่มีรูปร่างเป็นท่อนยาวคด ที่มีความยาวประมาณ 750 nm

ศึกษาการถ่ายทอดโรคและพืชทดสอบ

ต้น *Ch. Amaranticolor* และ *Ch. quinoa* แสดงอาการเป็นจุดแผลสีเหลืองขอบสีแดง หลังจากปลูกเชื้อ ส่วนต้นแกลดิโอลัสแสดงอาการด่างขีดประขาวที่ใบอ่อนหลังจากปลูกเชื้อแล้ว ประมาณ 1 เดือน เชื้อนี้ถ่ายทอดได้ด้วยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นผ่านทางแผลที่เกิดจากผง celite และมีแมลงพาหะมากกว่า 20 ชนิด เช่น *Myzus circumflexus, Aphis fabae*

ขั้นตอนที่ 2 และ 3 การแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์และผลิตแอนติซีรัม และการทดสอบคุณภาพของแอนติซีรัมด้วยวิธี NCM-ELISA นั้นอยู่ในระหว่างการดำเนินการ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการดำเนินงานวิจัยในขั้นตอนที่ 1 ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับโรคใบด่างบนแกลดิโอลัส ที่มีสาเหตุจากเชื้อ Bean yellow mosaic virus ที่ทำให้ต้นแกลดิออลัสมีอาการใบและดอกด่าง ซึ่งอาจมีอาการคล้ายกับเชื้อ CMV ด้วย ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้คุณภาพของดอกไม่ได้มาตราฐาน และเมื่อตรวจสอบดูเชื้อสาเหตุของโรคด้วยกล้องจุลทัศน์อีเล็กตรอน พบอนุภาคของเชื้อไวรัสที่มีรูปร่างเป็นท่อนยาวคด ที่มีความยาวประมาณ 750 nm ซึ่งสามารถถ่ายทอดได้ด้วยแมลงพาหะกว่า 20 ชนิด เช่น *Myzus persicae, Aphis fabae* รวมทั้งเชื้อถ่ายทอดได้ด้วยน้ำคั้นและสามารถติดไปกับหัวพันธุ์ได้ถึง 3% จึงทำให้เกิดการแพร่ระบาดไปได้กว้าง

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร สิทธิศักดิ์ แสไพศาล วิวัฒน์ ภาณุอำไพ เยาวภา ตันติวานิช ปรียพรรณ พงศาพิชญ์. 2551. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม: โครงการตรวจหา PVY strain และการประเมินความเสียหายของผลผลิตมันฝรั่งจากเชื้อ PVY ในประเทศไทย. กรมวิชาการเกษตร. 42 หน้า.

Gray, S., K. Perry and P. Baldauf. 2003. Report of 2003 Research activities funded by the Maine Potato Board.

McDonald, J.G. and R.P. Singh. 1996. Hostrange, symptomology and serology of isolates of potato virus Y (PVY) that shared properties with both the PVY^{n} and PVY^{O} strain groups.

Singh, R. P., D. L. McLaren, X. Nie and M. Singh. 2003. Possible Escape of a Recombinant Isolate of Potato virus Y by Serological Indexing and Methods of its Detection. Plant Disease Vol. 87 No.6:679-686.