การตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus

Detection of mosaic disease of orchids cause by Potyvirus

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[1/] สุรภี กีรติยะอังกูร[2/]
[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
[2/]สำนักผู้เชี่ยวชาญ

บทคัดย่อ

การตรวจวินิจฉัยโรคใบด่างของกล้วยไม้ที่เกิดจากเชื้อไวรัสกลุ่ม Potyvirus ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุล ฟาเลนอพซิส (*Phalaenopsis*) ออนซิเดียม (*Oncidium*) แวนด้า (Vanda) ช้างแดง ช้างพลาย (Rhynchostylis) และกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) มอคคาล่า ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยใช้เทคนิค Brandes' dip พบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนตรงสั้น (stiff rod) (ขนาด300 นาโนเมตร) ทำการพิสูจน์เชื้อพบว่าเป็น ORSV และพบเชื้อไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาดความยาว 550- 650 และ 750-900 นาโนเมตร รวมปะปนกัน ได้ตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธี Immuno electron microscope (IEM) และตรวจด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA) พบว่าตัวอย่างไวรัสทั้งหมดเป็น CyMV เนื่องจากอนุภาคไวรัสทั้งหมดถูกเคลือบด้วย IgG ของ CyMV แต่ไม่เคลือบด้วย IgG ของ MAb Poty1 เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ IgG ของ ORSV และ CyMV แต่ให้ปฏิกิริยาเป็นลบกับ IgG ของ MAb-Poty1 ในวิธี NCM-ELISA ส่วนการศึกษาการถ่ายทอดเชื้อตรวจไม่พบอาการ systemic บนพืชทดสอบและพืชอาศัยทั้ง 4 ชนิด คือ *Nicotiana benthamiana*, *Chenopodium quinoa, Capsicum annuum, Lycopersicon esculentum* ซึ่งเป็นลักษณะของ Potyvirus บนกล้วยไม้ แต่จะพบอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบพืชทดสอบ ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากเชื้อ CyMV ซึ่งจากการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้เพื่อหาเชื้อกลุ่ม Potyvirus ทั้ง 3 วิธีจึงสรุปได้ว่ายังไม่พบเชื้อ Potyvirus ของกล้วยไม้ระบาดในประเทศไทย

รหัสโครงการ 09-01-49-02-03-04-06

คำนำ

ประเทศไทยมีการส่งออกต้นกล้วยไม้เพิ่มปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ บางประเทศมีข้อกำหนดให้มีใบรับรองการปลอดเชื้อไวรัส มากกว่า 2 ชนิด ของ CyMV และ ORSV บางประเทศต้องการการปลอดจากเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วย บริษัทหลายแห่งผู้รับปั่นตาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อให้กับลูกค้าที่ส่งมาจากประเทศในยุโรป มีความต้องการให้ช่วยตรวจสอบต้นพันธุ์เพื่อคัดเลือกให้ปลอดเชื้อจาก CyMV , ORSV , Potyvirus และ Tospovirus ซึ่งมีรายงานการศึกษาโดย Franki (1985) พบว่าเชื้อไวรัสอีกชนิดที่ทำให้กล้วยไม้พันธุ์ *Dendrobium* spp. มีอาการด่างคือเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus เป็น *Dendrobium Mosaic Virus* (DeMV) ซึ่งมี coat protein gene ขนาด 1,143 bp สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเชื้อไวรัสชนิดนี้ จากตัวอย่างที่นำเข้ามาจากต่างประเทศเป็นพันธุ์ Dendrobium, Oncidium, Phalaenopsis และ Grammatophylum พบอาการด่าง แต่ตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบของเชื้อ CyMV และ ORSV แล้วพบว่าเกิดจากเชื้อ ทั้ง 2 ชนิดนี้ และพบเป็นเชื้อไวรัสที่มีอนุภาคเป็นท่อนยาวคดประมาณ 750 นาโนเมตร ซึ่งเป็นเชื้อ CyMV ที่มีขนาดตั้งแต่ช่วง 550-900 นาโนเมตร แต่อนุภาคขนาด 750-900 นาโนเมตร มีจำนวนน้อยเพียง ซึ่งแนวทางในการศึกษาเพื่อการจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุของอาการด่างที่ไม่ได้เกิดจากเชื้อ CyMV และ ORSV โดยการตรวจสอบด้วยชุดตรวจสอบของไวรัสทั้งสองชนิด แล้วยังต้องหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจวินิจฉัยเชื้อ Potyvirus ออกจากเชื้อ CyMV ให้ชัดเจนเพื่อการป้องกันกำจัดและป้องกันเชื้อกลุ่ม Poryvirus เข้ามายังประเทศไทย

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
- Ultra centrifuge
- Spectrophotometer
- แอนติซีรัม monoclonal antibody ของเชื้อกลุ่ม Potyvirus (MAb-Poty) virus
- ตู้แช่แข็ง -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการปลูกเชื้อไวรัส
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
- พืชทดสอบและพืชอาศัย

วิธีการ

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และเตรียมแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้

ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้ที่พบลักษณะอาการ จากแปลงปลูกกล้วยไม้รวมทั้งตัวอย่างนำเข้าในพื้นที่ต่างๆ มาศึกษาลักษณะอาการ และสั่งซื้อแอนติซีรัม monoclonal antibody ของเชื้อกลุ่ม Potyvirus (MAb-Poty) ซึ่งมีคุณสมบัติในการตรวจเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.1 ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำตัวอย่างกล้วยไม้จากรังกล้วยไม้ ในแต่ละแหล่งปลูกที่เก็บรวบรวมในข้อ 1 มาตรวจสอบหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip โดยบดตัวอย่างใบพืชใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 บนแผ่นไสลด์ นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh (มีช่องสี่เหลี่ยม 300 ช่องต่อตารางนิ้ว) มาคว่ำลงบนน้ำคั้นทิ้งไว้ 1 นาที ใช้คีมคีบกริดขึ้นจากน้ำคั้น ซับส่วนที่เป็นของเหลวรอบกริด หยดน้ำกลั่นลงบนกริดเพื่อชะล้างสารโมเลกุลใหญ่ เช่นเกลือต่างๆออกไป ทำการย้อมสีแบบ negative staining ซึ่งเป็นการย้อมสีพื้นที่รอบๆอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วย 2% Phosphotungstic acid (PTA) นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.2 ตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธี IEM (Immuno electron microscope)

นำตัวอย่างกล้วยไม้ที่ตรวจพบอนุภาค 550-900 นาโนเมตร มาตรวจสอบด้วยวิธี IEM โดยบดตัวอย่างใบพืชใน 0.05 M โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.2 บนแผ่นไสลด์ ได้น้ำคั้นพืช นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh (300 ช่องต่อตารางนิ้ว) ที่เคลือบด้วย colloidien และ carbon พร้อมใช้ มาคว่ำลงบนน้ำคั้น 6 กริด ทิ้งไว้ 1-3 นาที ใช้ Forceps คีบกริดขึ้นจากน้ำคั้น ซับส่วนที่เป็นของเหลวรอบกริดออก หยดน้ำกลั่นลงบนกริด 10 หยด เพื่อชะล้างเศษพืชชิ้นใหญ่ออกไป แล้วนำกริดไปคว่ำลงบนหยด IgG ของ CyMV และ MAb Poty1 แยกกัน ทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วย้อมสีด้วยการหยดสารละลาย 2% Uranyl acetate ผ่านหน้ากริด 10 หยด แล้วหยดน้ำกลั่นล้างผ่านหน้ากริด 10 หยด ซับรอบกริดให้แห้งด้วยกระดาษกรอง ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

3. ตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA)

นำตัวอย่างใบพืชที่ต้องการตรวจสอบใส่ในถุงพลาสติก เติม Extraction buffer (0.02 M Tris, 0.2 M NaN_3, 0.2% Na_2SO_3, pH 7.5) ในอัตราส่วน (ใบพืช : บัฟเฟอร์ = 1:5) แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียด ทำการวางรูปแบบของแผ่น Nitrocellulose membrane (NCM) ขนาด 0.45 µm ชนิด High bone N+ ด้วยการตีเป็นช่องตารางสี่เหลี่ยม (ขนาด 1X1 ตารางเซนติเมตร) ทำเครื่องหมายที่ตารางของตัวแผ่น NCM หัวท้ายเพื่อเรียงลำดับตัวอย่างจาก 1 ถึงตัวอย่างสุดท้าย นำแผ่น NCM พร้อมกับวางกระดาษกรองเบอร์ 1 ที่ตัดให้มีขนาดพอดีกับแผ่น NCM แช่ใน TBS (0.02M Tris, 0.5 M NaCl, pH 7.5) ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นคีบแผ่นกระดาษกรองเบอร์ 1 ขึ้นมาพร้อมกับแผ่น NCM ที่แช่ไว้ด้วยกัน วางลงบนแผ่นกระดาษกรองแผ่นใหม่ที่แห้งและมีขนาดใหญ่กว่า โดยใช้ pasteur pipette ที่สะอาดรีดแผ่น NCM ให้แนบติดกับกระดาษกรอง ทำการหยดตัวอย่างน้ำคั้นพืช 1 หยด หรือประมาณ 20-25 ไมโครลิตร ลงในช่องตารางบนแผ่น NCM ตามรูปแบบที่วางไว้ เมื่อหยดตัวอย่างเสร็จแล้วคีบแผ่น NCM ออกมาวางบนกระดาษสะอาดผึ่งไว้ประมาณ 10-20 นาที นำแผ่นตัวอย่างที่แห้งแล้วแช่ลงในกล่องสี่เหลี่ยมที่มี blocking buffer (2% non fat milk ใน TBS pH 7.5) อยู่ 10 มิลลิลิตร + 0.8 มิลลิลิตร ของ 25% titonx100 แช่นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือประมาณ 27-30°C หลังจากนั้นเท blocking buffer ออก ใส่ส่วนผสมของ IgG ของ Potyvirus ที่ละลายอยู่ใน blocking buffer ใหม่ ในอัตรา 1:500 แช่แผ่น NCM นั้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ประมาณ 27-30°C แล้วจึงล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เทส่วนผสม Goat anti-rabbit conjugated Alkaline phosphatase (SIGMA A7778) ที่เจือ

จางเป็น 1:3000 ในสารละลาย blocking buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที แล้วเทส่วนผสม substrate (ละลาย 0.25% AS- MX จำนวน 1 มิลลิลิตร ใน 5 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 และละลายสาร Fast red TR-salt (FR-TR) ใน 6 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Tris HCl , pH 8.2 เทส่วนผสมทั้ง 2 รวมกัน แล้วเทลงในกล่องแช่แผ่น NCM เขย่าเบาๆ) รอดูผลของปฏิกิริยา ประมาณ 5-30 นาที เมื่อเกิดปฏิกิริยาเห็นสีชมพูชัดเจนแล้วเท substrate ออก แล้วเทน้ำกลั่นลงแทน เพื่อเป็นการล้างและหยุดปฏิกิริยา

4. ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อและการแยกเชื้อ Potyvirus โดยใช้พืชทดสอบ

นำตัวอย่างที่ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบแต่เชื้อ CyMV ที่มีขนาดอนุภาค 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร นำมาปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ *Nicotiana benthamiana, Chenopodium quinoa* พริกและมะเขือเทศ เพื่อแยกเชื้อ Potyvirus ออกจาก CyMV โดยนำตัวอย่างใบกล้วยไม้ผสมกับ sodium phosphate buffer pH 7.5 แล้วบดให้ละเอียด นำน้ำคั้นมาทาลงบนใบพืชทดสอบ ที่โรยผงซีไลท์ (celite) นำพืชทดสอบไปไว้ในโรงเรือนทดลองเป็นเวลา 2 เดือน หลังจากนั้นทำการตรวจสอบอาการของพืชทดสอบเปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา เริ่มเดือนตุลาคม 2551 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2553

สถานที่ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างกล้วยไม้และเตรียมแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างกล้วยไม้

ได้ทำการเก็บตัวอย่างกล้วยไม้สกุล ฟาเลนอพซิส (*Phalaenopsis*) ออนซิเดียม (*Oncidium*) แวนด้า (Vanda) ช้างแดง ช้างพลาย (Rhynchostylis) และกล้วยไม้สกุลหวาย (*Dendrobium*) มอคคาล่า จากแปลงปลูกกล้วยไม้ของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรี จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดสระบุรี จังหวัดนนทบุรี จำนวนทั้งสิ้น 237 ตัวอย่าง และได้สั่งซื้อแอนติซีรัม monoclonal antibody ของเชื้อกลุ่ม Potyvirus (MAb-Poty) ซึ่งมีคุณสมบัติในการตรวจเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ได้หลายชนิดจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ผลิตโดย ดร. อรประไพ คชนันทน์ (MAb-Poty1) และ บริษัท AGDIA จำกัด (MAb-Poty2) MAb ของ Potyvirus จากบริษัท AGDIA มีรายงานจากทางบริษัทว่าสามารถใช้ตรวจสอบจำแนก

เชื้อ *Dendrobium mosaic virus* (DeMV) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ตรวจสอบ *Ceratobium mosaic virus* (CeMV) ไวรัสกลุ่ม potyvirus ในประเทศออสเตรเลีย และตรวจสอบ *Phalaenopsis chlorotic spot virus* (PhCSV) ในกล้วยไม้สกุล Phalaenopsis ในไต้หวัน

2. ตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

2.1 ตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ทำการตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Potyvirus โดยตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนด้วยเทคนิค Brandes' dip โดยได้นำตัวอย่างกล้วยไม้พันธุ์ต่างๆจำนวน 237 ตัวอย่างมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าการตรวจดูด้วยกล้องนั้น แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ด้วยกัน ดังนี้คือ กลุ่มที่ 1 เป็นตัวอย่างที่พบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนตรงสั้น (stiff rod) มีขนาดความยาวประมาณ 300 นาโนเมตร เพียงชนิดเดียว เป็นอนุภาคของเชื้อ ORSV

กลุ่มที่ 2 เป็นตัวอย่างที่พบอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) มีขนาดความยาวประมาณ 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร รวมอยู่กับอนุภาคของ ORSV ขนาด 300 นาโนเมตร

กลุ่มที่ 3 เป็นอนุภาคไวรัสชนิดท่อนยาวคด (flexuous rod) ที่มีขนาดอนุภาค 550- 650 และ 750-900 นาโนเมตร ไม่มี ORSV ปน

2.2 ตรวจจำแนกเชื้อไวรัสด้วยวิธี Immuno electron microscope (IEM)

เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าอนุภาคทั้งหมดที่มีขนาด 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร ถูกเคลือบด้วย IgG ของ CyMV แต่ไม่เคลือบด้วย IgG ของ MAb Poty1 จึงสรุปได้ว่าเชื้อที่พบเป็น CyMV ทั้งหมด และมีขนาดตั้งแต่ 550-900 นาโนเมตร

3. ตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA)

แผ่นตัวอย่างกล้วยไม้ที่ตรวจพบอนุภาคท่อนตรงยาว 300 นาโนเมตรซึ่งเป็นกลุ่มแรก เกิดปฏิกิริยากับ IgG ของ ORSV กลุ่มที่ 2 ตัวอย่างที่พบอนุภาค 300, 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ IgG ของ ORSV และ CyMV แต่ให้ปฏิกิริยาเป็นลบกับ IgG ของ MAb-Poty1 ส่วนกลุ่มที่ 3 ที่พบอนุภาคขนาด 550-650 และ 750-900 นาโนเมตร ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ IgG ของ CyMV ให้ปฏิกิริยาเป็นลบกับ IgG ของMAb-Poty1 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอนุภาคไวรัสที่พบในกลุ่ม 3 เป็น CyMV

4. ศึกษาการถ่ายทอดเชื้อและการแยกเชื้อ Potyvirus โดยใช้พืชทดสอบ

เมื่อนำน้ำคั้นมาทาลงบนใบพืชทดสอบที่โรยด้วยผงซีไลท์ (celite) และทำการตรวจสอบอาการต้นพืชทดสอบในเรือนทดลอง หลังจากปลูกเชื้อแล้วเป็นเวลา 2 เดือน จากผลการทดลอง ตรวจไม่พบอาการ systemic บนพืชทดสอบและพืชอาศัยทั้ง 4 ชนิด ของ Potyvirus ของกล้วยไม้ ซึ่งพืชทดสอบหลังปลูกเชื้อแล้ว พบอาการดังนี้คือ

Nicotiana benthamiana เกิดจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อ หลังปลูกเชื้อแล้ว 7-11 วัน ซึ่งเป็นอาการที่เกิดจากเชื้อ CyMV เพราะถ้าเกิดจากเชื้อที่เป็น Potyvirus จะแสดงลักษณะอาการด่างเป็น systemic symptom

Chenopodium quinoa หลังปลูกเชื้อได้ 11-14 วัน จะมีอาการจุดแผลสีเหลือง (chlorotic spot) บนใบที่ปลูกเชื้อ ซึ่งเกิดจากเชื้อ CyMV ทั้งหมด แต่ถ้าเป็นอาการที่เกิดจาก Potyvirus จะเกิดอาการด่างเป็น systemic symptom

Capsicum annuum จะไม่พบลักษณะผิดปกติและไม่แสดงอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ CyMV บนต้นพืชทดสอบ เนื่องจาก *C. annuum* ไม่ใช่พืชอาศัยของ CyMV เพราะถ้าเป็นเชื้อ Potyvirus จะต้องเกิดอาการด่างเป็น systemic symptom บนต้นพืชทดสอบดังกล่าว

Lycopersicon esculentum ไม่พบลักษณะผิดปกติและอาการของโรคที่เกิดจากเชื้อ CyMV บนต้นพืชทดสอบ เพราะ *L. esculentum* ไม่ใช่พืชอาศัยของ CyMV จึงไม่เกิดอาการด่างเป็น systemic symptom บนพืชทดสอบให้เห็น

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากการทดลองที่ทำการศึกษาบนกล้วยไม้ โดยวิธี NCM-ELISA, IEM และการใช้พืชทดสอบ สรุปได้ว่าสามารถที่จะนำมาใช้ตรวจสอบเพื่อหาเชื้อ Potyvirus บนกล้วยไม้ได้ โดยวิธี NCM-ELISA สุรภีและคณะ (2534) ได้รายงานไว้ถึงการผลิตแอนติซีรัมของเชื้อ ORSV และพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ ORSV ด้วยวิธี ELISA ในกล้วยไม้และได้พัฒนาปรับวิธี ELISA ให้เป็นเครื่องมือภาคสนามสำหรับตรวจไวรัสของกล้วยไม้ได้ รวมทั้ง Banttarri และคณะ (1985) ได้ทำการศึกษาใช้วิธี Dot-ELISA มาใช้ในการตรวจเชื้อไวรัสของมันฝรั่ง PVX PVY และ PVS โดยใช้แผ่น NCM เป็นวัสดุรองรับปฏิกิริยา และได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัสหลายๆ ชนิดด้วยวิธีรวดเร็ว (multi RIPA) เพียง 2 ขั้นตอน บนแผ่นรองรับ แบบ Lateral flow test (Tsuda *et al.*,1993) และ Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา ซึ่งการศึกษาวิธีการตรวจสอบเชื้อ Potyvirus นี้สามารถใช้วิธีการและแอนติซีรัมดังกล่าวในการ

ตรวจสอบได้ โดยการตรวจสอบ Potyvirus ของกล้วยไม้นั้น มีการใช้ MAb ของ Potyvirus ทั้งของ สวทช. และ AGDIA ในการตรวจจำแนกเชื้อ Potyvirus ออกจาก CyMV ได้ และจากการตรวจสอบเชื้อด้วยวิธี IEM ซึ่งเชื้อไวรัสที่พบมีขนาด 750-900 นาโนเมตร ปะปนอยู่กับเชื้อ CyMV นั้น พบว่าเป็นอนุภาคของเชื้อ CyMV ที่มีขนาดตั้งแต่ 550-900 นาโนเมตร ซึ่ง I Wayan และคณะ (1996) ได้รายงานว่าอนุภาคของไวรัส CyMV มีขนาดระหว่าง 75-950 นาโนเมตร จากการวัดอนุภาคไวรัส CyMV ทั้งหมด 300 อนุภาค นอกจากนั้น MAb ยังสามารถตรวจเชื้อ PhCSV ในกล้วยไม้นำเข้าของไต้หวันได้อีก ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถตรวจสอบหาเชื้อ Potyvirus ได้ด้วยวิธี IEM, NCM-ELISA ด้วย MAb ของ Potyvirus นอกจากนั้นการใช้พืชทดสอบเพื่อศึกษาถึงการถ่ายทอดเชื้อในพืชตระกูล Solanaceae (*Nicotiana benthamiana, Capsicum annuum*, *Lycopersicon esculentum*) และ *Chenopodium quinoa* โดยแสดงอาการด่างเป็น systemic symptom

ดังนั้นจากการศึกษาทดลองกล้วยไม้ ที่ได้เก็บตัวอย่างในพื้นที่ปลูกตามแหล่งต่างๆ มาทำการตรวจสอบนั้นจึงสรุปได้ว่ายังไม่พบเชื้อ Potyvirus ของกล้วยไม้ระบาดในประเทศไทย และสามารถนำ MAb ของ Potyvirus ทั้งของ สวทช. และ AGDIA มาใช้ในการตรวจจำแนกเชื้อ Potyvirus ออกจาก CyMV ได้

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2534. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบเชื้อ TMV-O ของกล้วยไม้พันธุ์หวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2534. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 1-8.

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ. รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 115-122.

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2534. เครื่องมือสนามสำหรับตรวจไวรัสของกล้วยไม้. หนังสือพิมพ์กสิกร ปีที่ 64 ฉบับที่ 4 หน้า 367-371.

Banttarri, E. E., and Goodwin, P. H. 1985. Detection of Potato Viruses S , X and Y by Enzyme-linked Immunosorbent Assay on Nitrocellulose Membrane (Dot-ELISA). Plant Disease. 69: 202-205.

Hochleitner, K. and Kraus, H. 2002. Introductory Workshop on Rapid Diagnostic Tests. BGM Company. Bangkok Thailand. 180 pp.

I Wayan, G., Hideki, K., Takanori, M., Koji, M. and Narinobu, I. 1996. Further Characterization of Cymbidium Mosaic Virus from *Vanda* Orchid. Research Institute for Bioresources, Okayama University 4: 163-174.

Tsuda, S., Kameya-Iwaki, M., Hanada, K., Fujisawa, I. And Tomaru, K. 1993. Simultaneous Diagnosis for Plant Infected with Multiple Viruses Employing Rapid Immunofilter Paper Assay (RIPA) with two step Method; Multi RIPA. Annaul Phytopathology Society. Japan 59: 200-203.