รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **แผนงานวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร
2. **โครงการวิจัย** : วิจัยและพัฒนาวิธีการตรวจหาศัตรูพืชโดยเทคนิคทางเซรุ่มวิทยา และชีวโมเลกุลเพื่อการนำเข้าและส่งออกสินค้าเกษตร

   กิจกรรม : การพัฒนาการตรวจสอบศัตรูพืชและศัตรูธรรมชาติ ในประเทศเพื่อการป้องกันกำจัดและการส่งออก
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีเพื่อตรวจสอบโรคใบด่างลายของข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Production of Polyclonal Antibodies for Detection of Maize Mosaic Disease caused by *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)
4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

   หัวหน้าการทดลอง : นายภูวนารถ มณีโชติ[1/]

   ผู้ร่วมงาน : นางสาวกาญจนา วาระวิชะนี[1/]

   นางสาววาสนา รุ่งสว่าง[2/]

   นายภานุวัฒน์ มูลจันทะ[3/]

5. **บทคัดย่อ**

โรคใบด่างลายข้าวโพดที่เกิดจากเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) ก่อให้เกิดความเสียหายกับข้าวโพดเป็นอย่างมาก จากการเก็บตัวอย่างข้าวโพดใน 6 จังหวัด จำนวน 260 ตัวอย่าง ตัวอย่างตรวจพบเชื้อ SCMV จำนวน 89 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค DAS-ELISA เมื่อปลูกเชื้อบนข้าวโพดหวานลูกผสมจัมโบ้ สวีท F1 และข้าวฟ่างพันธุ์ UT432 พบอาการใบด่างใบในข้าวโพด จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนยีน CP มีความคล้ายคลึงกันที่ระดับ 85.1% - 99.9% และ 88.2% - 99.7% ตามลำดับ การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SCMV-NSW (PAb-SCMV-NSW) มีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 6,400 - 12,800 โดย PAb-SCMV-NSW ครั้งที่ 4 (AS4) มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดคือ 12,800 โดยอัตราความเจือจางที่ 1:1,000 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพด และมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพดโดยไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสชนิดอื่น ๆ เช่น เชื้อไวรัส MCMV CVMV และ PRSV

[1/] กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/] กลุ่มวิจัยการกักกันพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[3/] ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน

Abstract

Sugarcane mosaic virus (SCMV) is one of the most important plant viruses infecting corn in Thailand. The 260 samples were collected in production areas in 6 provinces of Thailand. Eighty-nine samples were positive for SCMV infected by Das-ELISA. Five isolates of SCMV namely NSW, KB, LB, SB and NM induced mosaic symptoms on sweet corn variety Jumbo sweet F1 and sorghum variety UT432. Nucleotide and amino acid analysis, The CP gene shared sequence identities at 85.1% - 99.9% and 88.2% - 99.7%, respectively. Production of polyclonal antibody specific to SCMV was raised by using SCMV-NSW. The titer of PAb-SCMV-NSW was determined by indirect PTA-ELISA. The titers were ranged from 6,400-12,800. The 4th antibody (AS4) showed highest titer at 12,800. The produced antibody was specific to SCMV and was not cross-reacted to MCMV, CVMV and PRSV.

6. คำนำ

ข้าวโพดจัดเป็นพืชไรศรษฐกิจอีกหนึ่งชนิดที่มีการส่งออกและสร้างรายได้แก่ประเทศไทยเป็นจำนวนมาก โดยพบว่าประเทศมีพื้นที่การปลูกข้าวโพดเพิ่มมากขึ้น และพบว่าปัญหาและอุปสรรคที่สำคัญต่อการผลิตข้าวโพดนั้น คือ ความเสียหายที่เกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัส ได้แก่โรค โรคเตี้ยแคระของข้าวโพด (Maize dwarf mosaic disease) ซึ่งส่งผลให้ข้าวโพดนั้นได้ผลผลิตลดลงหรือมีผลให้ต้นข้าวโดพที่ติดเชื้อไวรัสนั้นตาย และเกิดการระบาดของโรคเป็นวงกว้าง โดยเชื้อไวรัสที่พบว่าก่อโรคในข้าวโพดที่สำคัญ ได้แก่ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) (Li *et al*., 2007)

เชื้อไวรัส SCMV อยู่ในวงศ์ *Potyviridae* สกุล *Potyvirus* มีอนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคด (flexuous rod) มีความยาวของอนุภาคอยู่ในช่วง 730-755 nm ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางอนุภาคประมาณ 12-13 nm (Tosic and Ford, 1972) เชื้อไวรัส SCMV มีพืชอาศัยจำกัดอยู่ในวงศ์ Gramineae เช่น ข้าวโพด อ้อย ข้าวฟ่าง รวมทั้งหญ้าชนิดต่าง ๆ ที่พบในแปลงปลูก เช่น หญ้าปากควาย หญ้าขจรจบ หญ้าตีนนก เป็นต้น (ธีระ, 2532)

ในประเทศไทยโรคไวรัสที่ก่อความเสียหายให้กับข้าวโพดมากที่สุดคือ โรคใบด่างลายที่เกิดจากเชื้อ SCMV strain MDB (SCMV-MDB) โดยพืชที่ติดเชื้อจะแสดงอาการเกิดอาการด่างประเป็นขีดเล็ก ๆ สีขาวบริเวณโคนใบจากนั้นอาการด่างจะแพร่กระจายทั่วใบแต่สังเกตอาการได้ชัดเจนบริเวณใบอ่อน (พิสสวรรณ และคณะ 2546) สามารถถ่ายทอดได้ด้วยวิธีกล และมีเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะในรูปแบบ nonpersistent manner เช่น เพลี้ยอ่อนข้าวโพด (*Rhopalosiphum maidis* Fitch) และเพลี้ยอ่อนหญ้า (*Hysteroneura setariae*) (ธีระ, 2532) จากการศึกษาวิจัยของ Li *et al*. (2004) พบว่า เชื้อ SCMV สามารถติดมาได้กับเมล็ดข้าวโพด โดยพบอนุภาคและอินคลูชั่นบอดี้ของเชื้อ SCMV อยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มเล็ดชั้นนอก (testa), aleuronic layer ของเอนโดเสปิร์มและเอมบริโอ แต่จะไม่พบในส่วนของชั้นแป้งของเอมบริ

โอ ต่อมา Li *et al*. (2007) ได้ศึกษาการถ่ายทอดโรคโดยเมล็ดเมล็ดพบว่า เมล็ดจากต้นที่เป็นโรคทำให้ต้นกล้าข้าวโพดที่งอกใหม่เกิดโรค 4.81 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งทำให้สรุปได้ว่าเชื้อ SCMV สามารถถ่ายทอดโรคโดยเมล็ดได้

การตรวจสอบเชื้อ SCMV ที่เข้าติดเชื้อในข้าวโพดสามารถวินิจฉัยได้หลายวิธี เช่น การตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เทคนิค SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) และ เทคนิคทางซีรัมวิทยา ได้แก่ เทคนิค enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ซึ่งกำลังเป็นที่ยมนำมาใช้ตรวจสอบเชื้อ SCMV ในข้าวโพดในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นวิธีการตรวจสอบที่สามารถตรวจสอบตัวอย่างพืชได้คราวละหลายตัวอย่างและทำได้ง่าย มีความรวดเร็วและแม่นยำ

การวิจัยครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ SCMV เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพดได้อย่างถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็ว

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เก็บตัวอย่าง ได้แก่ กรรไกร ถุงพลาสติก กระดาษบันทึก ปากกาเคมี เครื่องระบุพิกัด
2. ซีรัมสำหรับตรวจสอบเชื้อ SCMV (Agdia, USA)
3. ชุดสกัดอาร์เอ็นเอ FavorPrep Plant Total RNA Mini Kit (Favorgen, Taiwan)
4. ชุดเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แบบ One step RT-PCR (Biotechrabbit, Germany)
5. SeaKem LE Agarose (Cambrex, USA)
6. เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม C1000 Thermal Cycler (BioRad, USA)
7. เครื่องดูเจล ChemiDoc Gel Imaging System (BioRad, USA)
8. RedSafe Nucleic Acid Straining Solution (iNtRON Biotecnology, South Korea)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูง (Ultracentrifuge)
10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Thermo Scientific Multiskan GO
11. ข้าวโพดหวานลูกผสม จัมโบ้ สวีท F1
11. ข้าวฟ่าง (UT432B)

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างข้าวโพดที่เป็นโรค (ปี 2561)

เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่มีลักษณะอาการใบด่างประหรือด่างขีดเล็ก ๆ จากแหล่งปลูกข้าวโพด ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา นครปฐม กาญจนบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และลพบุรี โดยการสำรวจในพื้นที่ประมาณ 2 ไร่ ทำการสำรวจทุกแถวปลูก ในกรณีที่พื้นที่สำรวจมีพื้นที่มากกว่า 2 ไร่ขึ้นไป จะทำการสุ่มสำรวจโดยสำรวจแถวเว้นแถว พร้อมทั้งถ่ายภาพในแปลงปลูก ลักษณะอาการที่พบในข้าวโพดและบันทึกพิกัดทางภูมิศาสตร์

2. การตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ในตัวอย่างข้าวโพดเทคนิค Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA

ตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ในตัวอย่างข้าวโพดเทคนิคด้วยวิธี DAS-ELISA โดยใช้ Anti-SCMV ที่มีจำหน่ายทางการค้าของบริษัท Agdia Inc. (USA) ตามวิธีการและคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้ เคลือบ capture antibody ลงในหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม บดใบพืชหนัก 0.1 กรัม บดให้ละเอียดใน carbonate coating buffer (0.05 M sodium carbonate , pH 9.6 ที่ เติม 0.2% sodium diethyl dithiocarbamate ก่อนใช้) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ดูดน้ำคั้นพืชใส่ในหลุม ELISA plate ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที ปริมาตร 200 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วเติม enzyme conjugate หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST 3 ครั้ง และเติม substrate solution (10% diethanolamine, pH 9.8 ที่มี *p*–nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มที่ณหภูมิห้อง นาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (O.D.) ด้วยเครื่อง Thermo Scientific Multiskan GO ที่ความยาวคลื่นแสง 405 นาโนเมตร

3. การสกัดอาร์เอ็นเอรวมจากใบข้าวโพด

สกัดอาร์เอ็นเอรวมจากพืชด้วยชุดสกัด FavorPrep Plant Total RNA Mini Kit ตามคำแนะนำของบริษัท มีขั้นตอนดังนี้

1. ชั่งใบข้าวโพดปริมาณ 100 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียดด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วย้ายมาใส่ในหลอดขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเติมบัพเฟอร์ FARB ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และเติม β-ME ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

2. ย้ายส่วนของพืชใน ข้อ 1 มาใส่ Filter Column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที จากนั้นดูดส่วนของเหลวใสใส่ในหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปริมาตร 450 ไมโครลิตร แล้วเติม 70% Ethanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

3. ย้ายส่วนของเหลวใน ข้อ 2 มาใส่ใน FARB Mini Column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที ทิ้งส่วนใส

4. เติม Wash Buffer 1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนของเหลวใส แล้วล้างด้วย Wash Buffer 2 ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 1 นาที ทิ้งส่วนใสแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 3 นาที

5. นำ FARB Mini Column มาวางบนหลอดใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 2 นาที เสร็จแล้วเก็บ RNA ที่ได้ไว้ใช้งานในขั้นตอนต่อไป

4. ไพรเมอร์และการเพิ่มปริมาณยีนห่อหุ้มอนุภาค (Coat protein: CP) ของเชื้อไวรัส SCMV

ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน CP ของไวรัส ได้ใช้ไพรเมอร์ที่รายงานโดย Gemechu *et al*. (2006) ซึ่งจะได้ขนาดชิ้นดีเอ็นเอ 942-966 คู่เบส

Forward primer SCP1 5’-CGGAAATTTTATGCGTGGCTTC-3’

Reverse primer SCP2 5’-CTAGTGGTGCTGCTGCACTC-3’

สังเคราะห์ยีน CP ของเชื้อไวรัส SCMV จากอาร์เอ็นเอรวมที่เตรียมได้ โดยใช้ส่วนผสมของ one step RT-PCR (QIAGEN) ทำปฏิกิริยาในหลอดพีซีอาร์ขนาด 200 ไมโครลิตร ปริมาตรส่วนผสมรวม 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย

nuclease free water	11	ไมโครลิตร
5x buffer	4	ไมโครลิตร
10 mM dNTPs	1	ไมโครลิตร
10 pmole SCP1	0.5	ไมโครลิตร
10 pmole SCP2	0.5	ไมโครลิตร
enzyme mix	1	ไมโครลิตร
RNA template	2	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler) โดยทำปฏิกิริยาในการสังเคราะห์ดังนี้

1) First strand synthesis	50 °C	30 นาที
Predenaturation	94 °C	15 นาที
2) Three step-cycling 35 cycles		
Denaturation	94 °C	30 วินาที
Annealing	58 °C	30 วินาที
Extension	72 °C	60 วินาที
3) Final extension	72 °C	10 นาที

เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบดีเอ็นเอผลผลิตด้วย 1.2% agarose gel electrophoresis ที่เติม RedSafe Nucleic Acid Straining Solution (iNtRON Biotecnology, South Korea) ใน 1X TAE buffer ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 35 นาที ตรวจดูแถบดีเอ็นเอผลผลิตในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง ChemiDoc Gel Imaging System นำดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI 3730XL DNA Analyzer (SolGent, South Korea)

5. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโน

วิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ของดีเอ็นเอผลผลิตจากปฏิกิริยา RT-PCR มาจำแนกยีนด้วยโปรแกรม Blastn และ Blastp (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/Blast) แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโนของเชื้อ SCMV ที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรทางพันธุกรรมจากข้อมูลยีนโปรตีนด้วยโปรแกรม Clustal Omega จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์และจัดกลุ่มของ SCMV ไอโซเลตต่าง ๆ จากการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 10

6. การเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัส SCMV

การแยกเชื้อโดยนำตัวอย่างข้าวโพดที่ให้ผลการตรวจทางซีรัมวิทยาเป็นบวก มาปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกลลงบนข้าวฟ่างพันธุ์ UT432B ที่มีอายุ 14 วันหลังงอก โดยบดใบข้าวโพดในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.1 Mpotassium phosphate buffer, pH 7.2 ในอัตราส่วน 1 : 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในโกร่งที่นึ่งฆ่าเชื้อและแช่เย็น เติมผงคาร์บอรันดัมในน้ำคั้น ผสมให้เข้ากัน แล้วทาน้ำคั้นที่ได้ลงบนใบพืชให้ทั่วทั้งใบทิ้งไว้ 5 นาที แล้วจึงล้างใบข้าวฟ่างด้วยน้ำ เมื่อพืชแสดงอาการหรือหลังทำการปลูกเชื้อ 7 วัน ตรวจ ยืนยันผลด้วยวิธี DAS ELISA และเก็บเชื้อไว้ในข้าวฟ่างในสภาพโรงเรือนกันแมลงเพื่อไว้ใช้ทดลองต่อไป

7. การเตรียมไวรัส SCMV บริสุทธิ์

ตัดใบข้าวฟ่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1x1 เซนติเมตร น้าหนัก 150 กรัม แช่แข็งที่ –20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 คืน นามาบดในเครื่องบด Blender โดยเติม 0.5 M sodium citrate buffer pH 8.0 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่ผสม 2-mercaptoethanol ปริมาตร 3 มิลลิลิตร กรองผ่านผ้าขาวบางกำจัดเศษพืช เอาแต่ส่วนน้าคั้น ปริมาตรประมาณ 300 มิลลิลิตร เติมคลอโรฟอร์ม ปริมาตร 150 มิลลิลิตร กวนบนน้ำแข็ง นาน 45 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เก็บน้ำใสปริมาตร 300 มิลลิลิตร ใส่บีกเกอร์ แล้วเติม polyethylene glycol 6000 อัตรา 5% และ triton X-100 อัตรา 1% ของปริมาตรของเหลว กวนบนน้ำแข็ง นาน 1.30 ชั่วโมง แล้วหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที เทของเหลวทิ้ง ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.5 M Potassium phosphate buffer pH 7.5 ที่เติม 0.5 M Urea ปริมาตร 100 มิลลิลิตร กวนในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนามาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บของเหลวที่มีไวรัส นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 40,000 rpm นาน 1.30 ชั่วโมงที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย 0.05M Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

8. การผลิตและตรวจสอบคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SCMV

นำสารแขวนลอยไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ ได้แก่ ไอโซเลต NSW (SCMV-NSW) ฉีดกระตุ้นกระต่ายให้สร้างภูมิคุ้มกันโดยใช้กระต่ายสายพันธุ์ New Zealand white อายุประมาณ 3 เดือน ก่อนการกระตุ้นเก็บ normal serum โดยเช็ดหลังใบหูด้วย 70% ethanol และ เจาะเลือดปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อใช้เปรียบเทียบปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป เตรียมแอนติเจนเพื่อฉีดกระตุ้นครั้งแรกด้วยไวรัสบริสุทธิ์ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ใน Complete Freund’s Adjuvant (CFA) อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ผสมให้เข้ากันจนเป็น emulsion ฉีดกระตุ้นด้วยวิธี subcutaneous injection (SC) บริเวณต้นคอด้านหลัง เว้นระยะห่างหนึ่งสัปดาห์จึงกระตุ้นภูมิซ้ำ เตรียมแอนติเจนเพื่อฉีดครั้งที่ 2 ผสมไวรัสบริสุทธิ์ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม ใน Incomplete Freund’s Adjuvant (IFA) จากนั้น 1 สัปดาห์ เจาะเลือดใส่บีกเกอร์ปลอดเชื้อเพื่อเก็บแอนติซีรัมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกสัปดาห์ นาน 4 สัปดาห์ แต่ละครั้งจะแยกแอนติซีรัมจากเม็ดเลือดโดยวางเลือดในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน และปั่นตกตะกอนด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกเก็บแอนติซีรัมซึ่งเป็นส่วนใสด้านบนในขวดซีรัมโดยเติม NaN_3 ความเข้มข้น สุดท้าย 0.02% โดยปริมาตร เพื่อป้องกันเชื้อแบคทีเรีย เก็บแอนติซีรัมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. การตรวจสอบค่าไตเตอร์และความจำเพาะของแอนติซีรัมในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV

ตรวจสอบค่าไตเตอร์ (titer) ของแอนติซีรัมต่อเชื้อ SCMV ด้วยวิธี PTA-ELISA โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Clark and Adam (1977) เพื่อหาค่าความเจือจางสูงสุดของแอนติซีรัมที่ยังคงให้ผลบวก (มากกว่า 2 เท่าของค่า A_{405} ของพืชปกติ) โดยใช้แอนติซีรัมแต่ละครั้งที่เก็บได้ทำปฏิกิริยากับไวรัสบริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางใน carbonate coating buffer, pH 9.6 เป็นแอนติเจนสำหรับหยดลงในหลุม ELISA plate โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมแต่ละครั้งที่เก็บได้แบบ 2-fold dilutions เริ่มจากความเข้มข้น 1:200 ถึง 1:819,200 เพื่อใช้เป็น primary antibody และ Goat anti rabbit IgG conjugated with alkaline phosphatase (GAR) เป็น secondary antibody เปรียบเทียบกับ normal serum

ทดสอบความจำเพาะของแอนติซีรัมที่ค่าความเจือจางที่เหมาะสมด้วยวิธี Indirect ELISA โดยพืชเป็นโรคที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV และเชื้อไวรัสสกุล *Potyvirus* อื่น ๆ ตรวจสอบดวยเทคนิค Indirect PTA-ELISA

เวลาและสถานที่

ระยะเวลา ตุลาคม 2560 – กันยายน 2562

สถานที่ทำการทดลอง
1. แปลงข้าวโพดในจังหวัดนครราชสีมา นครปฐม กาญจนบุรี สระบุรี นครสวรรค์ และลพบุรี
2. ห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยา กลุ่มงานวิทยาไมโค กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ตัวอย่างข้าวโพดแสดงอาการใบด่าง

เก็บตัวอย่างใบข้าวโพดที่แสดงอาการใบด่างที่พบแปลงปลูกข้าวโพดในจังหวัดนครสวรรค์ นครราชสีมา สระบุรี ลพบุรี กาญจนบุรี และนครปฐม รวมจำนวนตัวอย่างทั้งสิ้น 260 ตัวอย่าง (ตารางที่ 1) โดยใบข้าวโพดที่พบจะแสดงอาการใบด่างประเป็นขีดสีเขียวซีดขนาดเล็กตรงบริเวณโคนใบของใบยอด ส่วนใบถัดจากใบยอดลงมาจะพบอาการด่างจะแพร่กระจายทั่วใบ (ภาพที่ 1)

2. การตรวจสอบเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* ในตัวอย่างใบข้าวโพดด้วยเทคนิค Double Antibody Sandwich (DAS) ELISA

จากการตรวจสอบตัวอย่างใบข้าวโพดด้วย Anti-SCMV โดยวิธี DAS – ELISA พบตัวอย่างใบข้าวโพดที่มีเชื้อ SCMV จำนวน 89 ตัวอย่าง นอกจากนี้ยังตรวจสอบเชื้อ Maize chlorotic mottle virus (MCMV) ซึ่งเป็นเชื้อไวรัสอีกชนิดที่มีรายงานว่าเข้าทำลายข้าวโพดได้ โดยการตรวจสอบด้วย Anti-MCMV พบใบข้าวโพดจำนวน 5 ตัวอย่าง ที่มีเชื้อ MCMV และยังพบการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อ SCMV และ MCMV จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยได้แสดงผลการตรวจไว้ในตารางที่ 1

3. ลักษณะอาการในต้นข้าวโพดหวานลูกผสม จัมโบ้ สวีท F1 และการเพิ่มปปริมาณเชื้อ SCMV ในข้าวฟ่างพันธุ์ UT432

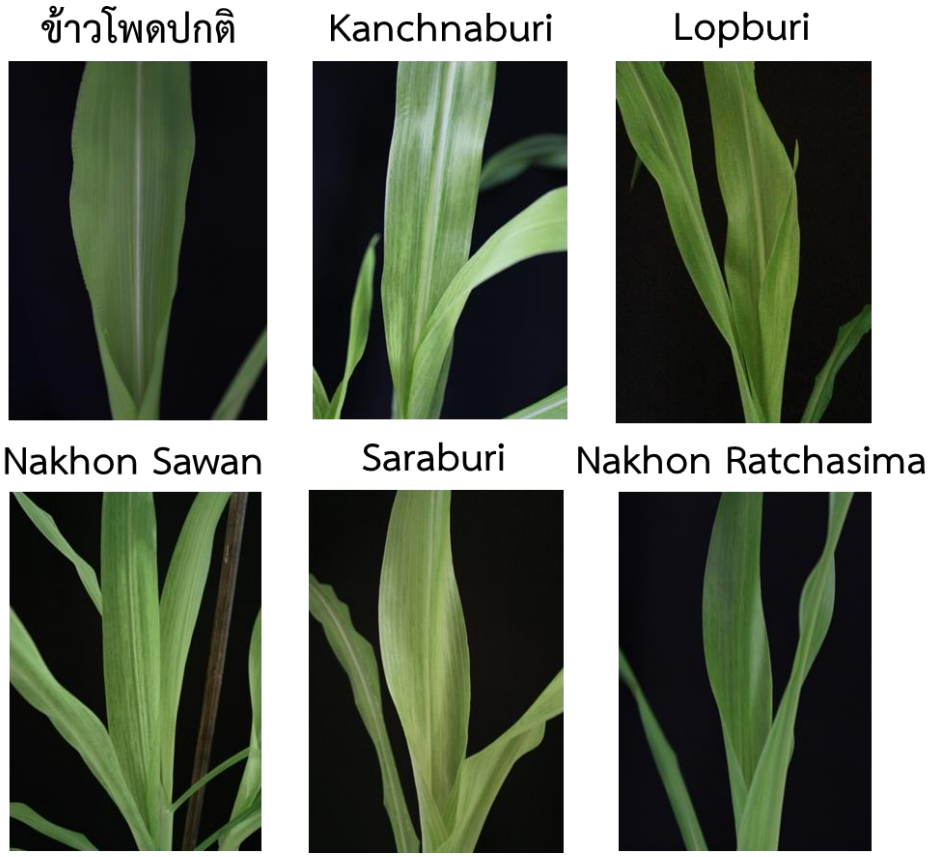
ทำการปลูกเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลต ลงบนข้าวโพดหวานลูกผสม จัมโบ้ สวีท F1 และข้าวฟ่างพันธุ์ UT432 เพื่อศึกษาลักษณะอาการและเพื่อเพิ่มปริมาณไวรัส หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน ข้าวโพดหวานที่ได้รับการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต Kanchanaburi Lopburi และ Nakhon Sawan พบอาการใบด่างและเป็นขีดขนาดเล็ก ๆ ส่วนไอโซเลต Saraburi และ Nakhon Ratchasima พบอาการใบด่างประ (ภาพที่ 2)

ตารางที่ 1 การตรวจสอบเชื้อ SCMV ในข้าวโพดที่แสดงอาการด่างที่เก็บจากแปลงปลูกข้าวโพด ใน 6 จังหวัด ด้วยเทคนิค DAS - ELISA

จังหวัด	**จำนวนตัวอย่าง**	**ผลการตรวจด้วย ELISA (ตัวอย่าง)**		
		SCMV	**MCMV [1/]**	**SCMV + MCMV**
นครสวรรค์	17	11	-	-
นครราชสีมา	132	46	3	7
สระบุรี	33	24	-	1
ลพบุรี	13	2	-	0
กาญจนบุรี	42	6	1	0
นครปฐม	23	-	1	0
รวม	**260**	**89**	**5**	**8**

[1/] MCMV : *Maize chlorotic mottle virus*

ภาพที่ 1 ใบข้าวโพดที่แสดงอาการใบด่างประเป็นขีดสีเขียวซีดขนาดเล็กที่พบในแปลงปลูกข้าวโพด



ภาพที่ 2 ลักษณะอาการบนข้าวโพดหวานลูกผสม จัมโบ้ สวีท F1ที่ได้รับการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต Kanchanaburi (KB), Lopburi (LB), Nakhon Sawan (NSW), Saraburi (SB) และ Nakhon Ratchasima (NM)

4. ลำดับนิวคลิโอไทด์และกรดอะมิโน

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลิโอไทด์ (ภาพที่ 3) และกรดอะมิโน (ภาพที่ 4) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (Coat protein: CP) ของเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ไอโซเลต Lopburi (LB) และ Nakhon Ratchasima (NM) มีขนาด 942 นิวคลิโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 313 เรซิดิวส์ และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต Saraburi (SB) Kanchanaburi (KB) และ Nakhon Sawan (NSW) มีขนาด 966 นิวคลิโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 321 เรซิดิวส์

จากการทำ multiple alignment ของเชื้อ SCMV ทั้ง 2 กลุ่ม พบว่า กลุ่มที่ 1 ไอโซเลต LB และ NM มีความคล้ายคลึงกันของนิวคลิโอไทด์อยู่ระหว่าง 99.9% และกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 99.7% ส่วนกลุ่มที่ 2 ไอโซเลต SB KB และ NSW มีความคล้ายคลึงกันของนิวคลิโอไทด์อยู่ระหว่าง 94.1% - 97.2% และกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 97.2% - 98.4% เมื่อเปรียบเทียบกันทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของนิวคลิโอไทด์ และกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 85.1% - 99.9% และ 88.2% - 99.7% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) จากค่าความเหมือนที่วิเคราะห์ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัส SCMV ในประเทศไทยนั้นมีความผันแปรทางพันธุกรรมถึงแม้ว่าจะเข้าทำลายข้าวโพดเหมือนกัน

ผลการวิเคราะห์วิเคราะห์ Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 10 พบว่าเชื้อ SCMV ที่ได้จากข้าวโพดในประเทศไทยไอโซเลต LB และ NM จับกลุ่มอยู่กับ SCMV ที่พบในประเทศไทยและแยกออกมาจากเชื้อ SCMV ที่พบในต่างประเทศ ส่วนไอโซเลต NSW และ KB จับกลุ่มอยู่กับ SCMV ที่พบในต่างประเทศ (ภาพที่ 5) สำหรับไอโซเลต SB ถึงแม้ว่าจะมีขนาดของยีน CP เท่ากับไอโซเลต NSW และ KB แต่ก็ยังจับกลุ่มอยู่กับเชื้อไวรัส SCMV ที่พบในประเทศไทย

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของ *Sugarcane mosaic virus* ทั้ง 5 ไอโซเลตที่แยกจากข้าวโพด

	กรดอะมิโน				
ไอโซเลต	**NSW**	**KB**	**SB**	**LB**	**NM**
NSW		98.4	97.2	88.5	88.2
KB	97.2		98.1	88.8	88.5
SB	94.1	94.8		89.7	89.4
LB	85.2	85.6	89.6		99.7
NM	85.1	85.5	89.5	99.9	
	นิวคลิโอไทด์				

หมายเหตุ - NSW: ไอโซเลต Nakhon Sawan - KB: ไอโซเลต Kanchanaburi
- SB: ไอโซเลต Saraburi - LB: ไอโซเลต Lopburi
- NM: ไอโซเลต Nakhon Ratchasima

```
LB      TCTGGTCAAGTTGACGCAGGGAGACAGGGCGGTAGCGGCGCTCAAGGAGGCACACCACCA      60
NM      TCTGGTCAAGTTGACGCAGGGAGACAGGGCGGTAGCGGCGCTCAAGGAGGCACACCACCA      60
SB      TCTGGCCATGTTGATGCAGGGAGACAAGGCGGTAGCGGCGGTCAAGGAGGCACACCACCT      60
KB      TCTGGCCATGTTGATGCAGGGAGACAAGGCGGTAGCGGCGGTCAAGGAGGCACACCACCT      60
NSW     TCTGGCCATGTTGATGCAGGGAGACAAGGCGGTAGCGGCGGTCAAGGAGGCACACCACCT      60
        ***** ** ***** *********** ************* ******************

LB      GCA-------------------------------------------------GGAAGT      69
NM      GCA-------------------------------------------------GGAAGT      69
SB      GCAGGAAATGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGGCCGGCGGAGGCCAGACAGGAGGAAGT      120
KB      GCAGGAAATGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGGGCCGGCGGAGGCCAGACAGGAGGAAAT      120
NSW     GCAGGAAATGGTGGTCAACAAGGGTCCGGTGGAAACGGCGGAGGCCAGACAGGAGGAAGT      120
        ***                                                     **** *

LB      GGAGGCACTGGATCTGGCGCTCAAGGCAATGGGGGTCAGACGGGGTCCCAAGGAAGTGGT      129
NM      GGAGGCACTGGATCTGGCGCTCAAGGCAATGGGGGTCAGACGGGGTCCCAAGGAAGTGGT      129
SB      GGAGGCACTGGAACTGGCACTCAAGGCAATGGGGGTCAGACGGGATCCCAAGGAAATGGT      180
KB      GGAGGCACTGGATCTGGCACTCAAGGTAATGGGGGTCAGACGGGATCCCAAGGAAATGGT      180
NSW     GGAGGCACTGGCTCTGGCACTCAAGGTAATGGGGGCCAGACGGGACCCCAAGGAAGTGGT      180
        ***********  ***** ******* ******** ********  ********* ****

LB      GGTCAACAAGGGTCCGGTAGGGGCACTGGTCAAGGAGCAGCTGGAAACAACGGCGGAGGT      189
NM      GGTCAACAAGAGTCCGGTAGGGGCACTGGTCAAGGAGCAGCTGGAAACAACGGCGGAGGT      189
SB      GGTCAA---------------------------CAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGC      213
KB      GGTCAA---------------------------CAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGC      213
NSW     GGTCAA---------------------------CAAGGGTCCGGTGGGAACGGCGGAGGC      213
        ******                             **   * **    ***********

LB      CAGACAGGAGGCTCTAGTGGGGCAGCTGGTCAGAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG      249
NM      CAGACAGGAGGCTCTAGTGGGGCAGCTGGTCAGAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG      249
SB      CAGACAGGAGGTTCTGGTGGGACAGCTGGTCAAAGGGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG      273
KB      CAGACAGGAGGTTCTGGTGGGACAGCTGGTCAAAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG      273
NSW     CAGACAGGAGGTTCTGGTGGGACAGCTGGTCAAAGAGATAAGGACGTTGACGCAGGCTCG      273
        *********** *** ***** ********** ** ************************

LB      GCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAG      309
NM      GCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAG      309
SB      GCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAG      333
KB      GCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCAAAG      333
NSW     TCTGGAAAGATATCCGTACCAAAGCTTAAAGCCATGTCAAAGAAAATGCGCTTGCCGAAG      333
         ******************************************************** ***

LB      GCAAAAGGAAAAGACGTCTTGCATTTGGACTTTTTGTTGACATACAAGCCACAACAGCAG      369
NM      GCAAAAGGAAAAGACGTCTTGCATTTGGACTTTTTGTTGACATACAAGCCACAACAGCAG      369
SB      GCAAAAGGAAAAGACGTCTTGCATTTGGACTTTTTGTTGACATACAAGCCACAACAACAG      393
KB      GCAAAAGGAAAAGACGTCTTGCATTTGGATTTCTTGTTGACATACAAGCCACAACAGCAA      393
NSW     GCAAAAGGAAAAGATGTCTTGCATTTGGACTTTTTGTTGACATACAAGCCACAACAACAA      393
        ************** ************** ** ************************ **

LB      GACATATCGAACACAAGAGCAACTAAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGACGCCATAAAG      429
NM      GACATATCGAACACAAGAGCAACTAAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGACGCCATAAAG      429
SB      GACATATCGAACACAAGAGCAACTAAGGAAGAGTTCGATAGATGGTACGACGCCATAAAG      453
KB      GACATATCGAACACAAGAGCAACTAAGGAGGAGTTCGATAGATGGTATGATGCCATAAAG      453
NSW     GACATATCGAACACAAGAGCAACCAAGGAAGAGTTCGATAGATGGTATGATGCCATAAAG      453
        ************************ ***** ***************** ** *********
```

ภาพที่ 3 ลำดับนิวคลิโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของเชื้อ SCMV ทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega

LB: ไอโซเลต Lopburi NM: ไอโซเลต Nakhon Ratchasima SB: ไอโซเลต Saraburi KB: ไอโซเลต Kanchanaburi และ NSW: ไอโซเลต Nakhon Sawan

(.) ระบุนิวคลิโอไทด์ที่เหมือนกัน

(-) ระบุนิวคลิโอไทด์ที่ไม่มีในโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค

```
LB      AAGGAGTACGAGATTGATGATACACAAATGACAGTCGTCATGAGTGGTCTGATGGTCTGG      489
NM      AAGGAGTACGAGATTGATGATACACAAATGACAGTCGTCATGAGTGGTCTGATGGTCTGG      489
SB      AAGGAGTACGAGATCGATGATACACAAATGACAGTCGTCATGAGTGGTCTGATGGTCTGG      513
KB      AAGGAGTATGAGATCGATGATACACAAATGACAGTTATCATGAGTGGTCTAATGGTCTGG      513
NSW     AAGGAGTACGAGATCGATGATACACAAATGACAGTTATCATGAGTGGTCTGATGGTCTGG      513
        ******** ***** ********************  ************* *********

LB      TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGGAAATTGGACGATGATGGATGGGGAT      549
NM      TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGGAAATTGGACGATGATGGATGGGGAT      549
SB      TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGGAAATTGGACGATGATGGATGGGGAT      573
KB      TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCGAATATAAACGGGAATTGGACAATGATGGATGGAGAA      573
NSW     TGCATCGAAAATGGTTGCTCACCAAATATAAACGGGAATTGGACGATGATGGATGGAGAA      573
        ************************ ** ******** ******** *********** **

LB      GAACAAAGAGTTTTCCCACTGAAACCAGTTATTGAAAACGCATCTCCAACTTTTCGACAA      609
NM      GAACAAAGAGTTTTCCCACTGAAACCAGTTATTGAAAACGCATCTCCAACTTTTCGACAA      609
SB      GAACAAAGAGTTTTCCCACTAAAACCAGTTATTGAAAACGCATCTCCAACTTTTCGACAA      633
KB      GAACAACGAGTTTTTCCATTAAAACCAGTCATCGAAAACGCATCTCCAACTTTCCGACAA      633
NSW     GAACAACGAGTTTTTCCATTAAAACCAGTCATCGAAAACGCATCTCCAACTTTCCGACAA      633
        ****** ******* *** * ******** ** ******************** ******

LB      GTTATGCATCATTTCAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAGAATACAGAAATTCTACTGAG      669
NM      GTTATGCATCATTTCAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAGAATACAGAAATTCTACTGAG      669
SB      GTTATGCATCATTTCAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAGAATACAGAAATTCTACTGAG      693
KB      ATAATGCACCACTTTAGTGATGCAGCTGAAGCGTACATTGAGTATAGAAACTCTACAGAG      693
NSW     ATAATGCACCACTTTAGTGATGCAGCTGAAGCGTACATAGAGTATAGAAACTCTACAGAG      693
         * ***** ** ** ******************** ** ** ** ***** ***** ***

LB      CGATACATGCCAAGATATGGACTTCAGCGAAATCTCACCGACTATAGCTTAGCGCGGTAT      729
NM      CGATACATGCCAAGATATGGACTTCAGCGAAATCTCACCGACTATAGCTTAGCGCGGTAT      729
SB      CGATACATGCCAAGATATGGACTTCAGCGAAATCTCACCGACTATAGCTTAGCGCGGTAC      753
KB      CGATATATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCGACTATAGCCTAGCACGGTAT      753
NSW     CGGTATATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCGACTATAGCCTAGCACGGTAT      753
        ** ** *********** ****************************** **** *****

LB      GCTTTTGATTTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCCACATG      789
NM      GCTTTTGATTTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCCACATG      789
SB      GCTTTTGATTTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCCACATG      813
KB      GCATTTGATTTCTATGAAATGACCTCACGCACACCAGCTAGAGCTAAGGAAGCCCACATG      813
NSW     GCATTTGATTTTTATGAAATGACCTCACGCACACCAGCCAGAGCTAAAGAAGCCCACATG      813
        ** ******** *********** ************** ******** ************

LB      CAGATGAAGGCCGCAGCTGTTCGTGGTTCAAACACACGACTGTTCGGCTTGGACGGAAAT      849
NM      CAGATGAAGGCCGCAGCTGTTCGTGGTTCAAACACACGACTGTTCGGCTTGGACGGAAAT      849
SB      CAGATGAAAGCCGCAGCAGTTCGTGGTTCAAACACACGACTGTTCGGCTTGGACGGAAAT      873
KB      CAGATGAAAGCCGCAGCAGTTCGTGGTTCAAACACACGACTGTTCGGTCTGGACGGAAAT      873
NSW     CAGATGAAAGCCGCAGCAGTTCGTGGTTCAAATACACGATTGTTCGGTCTGGACGGAAAT      873
        ******** ******** ************** ****** *******  ***********

LB      GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAATATG      909
NM      GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAATATG      909
SB      GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGCCGCAATATG      933
KB      GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAACATG      933
NSW     GTCGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTGGCGACGTTAGTCGCAACATG      933
        ************************************************** ***** ***

LB      CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAACACCACTAG 942
NM      CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAaCACCACTAG 942
SB      CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAACACCACTAG 966
KB      CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAGCACAACTAG 966
NSW     CACTCTCTGTTGGGAGTGCAGCAGCACAACTAG 966
        ************************ *** *****
```

ภาพที่ 3 (ต่อ)

```
LB   SGQVDAGRQGGSGAQGGTPPAGSGGT-----------------GSGAQGNGGQTGSQGSG   43
NM   SGQVDAGRQGGSGAQGGTPPAGSGGT-----------------GSGAQGNGGQTGSQGSG   43
NSW  SGHVDAGRQGGSGGQGGTPPAGNGGQQGSGGNGGGQTGGSGGTGSGTQGNGGQTGPQGSG   60
KB   SGHVDAGRQGGSGGQGGTPPAGNGGQQGSGGAGGGQTGGNGGTGSGTQGNGGQTGSQGNG   60
SB   SGHVDAGRQGGSGGQGGTPPAGNGGQQGSGGAGGGQTGGSGGTGTGTQGNGGQTGSQGNG   60
     ** ********** ******** **                  * * ******** ** *

LB   GQQGSGRGTGQGAAGNNGGGQTGGSSGAAGQRDKDVDAGSAGKISVPKLKAMSKKMRLPK   103
NM   GQQESGRGTGQGAAGNNGGGQTGGSSGAAGQRDKDVDAGSAGKISVPKLKAMSKKMRLPK   103
NSW  GQQG---------SGGNGGGQTGGSGGTAGQRDKDVDAGSSGKISVPKLKAMSKKMRLPK   111
KB   GQQG---------SGGNGGGQTGGSGGTAGQRDKDVDAGSAGKISVPKLKAMSKKMRLPK   111
SB   GQQ---------GSGGNGGGQTGGSGGTAGQRDKDVDAGSAGKISVPKLKAMSKKMRLPK   111
     ***           * ********* * ************ *******************

LB   AKGKDVLHLDFLLTYKPQQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVVMSGLMVW   163
NM   AKGKDVLHLDFLLTYKPQQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVVMSGLMVW   163
NSW  AKGKDVLHLDFLLTYKPQQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVW   171
KB   AKGKDVLHLDFLLTYKPQQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVIMSGLMVW   171
SB   AKGKDVLHLDFLLTYKPQQQDISNTRATKEEFDRWYDAIKKEYEIDDTQMTVVMSGLMVW   171
     ************************************************** *******
LB   CIENGCSPNINGNWTMMDGDEQRVFPLKPVIENASPTFRQVMHHFSDAAEAYIEYRNSTE   223
NM   CIENGCSPNINGNWTMMDGDEQRVFPLKPVIENASPTFRQVMHHFSDAAEAYIEYRNSTE   223
NSW  CIENGCSPNINGNWTMMDGEEQRVFPLKPVIENASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTE   231
KB   CIENGCSPNINGNWTMMDGEEQRVFPLKPVIENASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTE   231
SB   CIENGCSPNINGNWTMMDGDEQRVFPLKPVIENASPTFRQVMHHFSDAAEAYIEYRNSTE   231
     ******************* ******************** *******************
LB   RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQMKAAAVRGSNTRLFGLDGN   283
NM   RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQMKAAAVRGSNTRLFGLDGN   283
NSW  RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQMKAAAVRGSNTRLFGLDGN   291
KB   RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQMKAAAVRGSNTRLFGLDGN   291
SB   RYMPRYGLQRNLTDYSLARYAFDFYEMTSRTPARAKEAHMQMKAAAVRGSNTRLFGLDGN   291
     ************************************************************
LB   VGETQENTERHTAGDVSRNMHSLLGVQQHH  313
NM   VGETQENTERHTAGDVSRNMHSLLGVQQHH  313
NSW  VGETQENTERHTAGDVSRNMHSLLGVQQHN  321
KB   VGETQENTERHTAGDVSRNMHSLLGVQQHN  321
SB   VGETQENTERHTAGDVSRNMHSLLGVQQHH  321
     ****************************
```

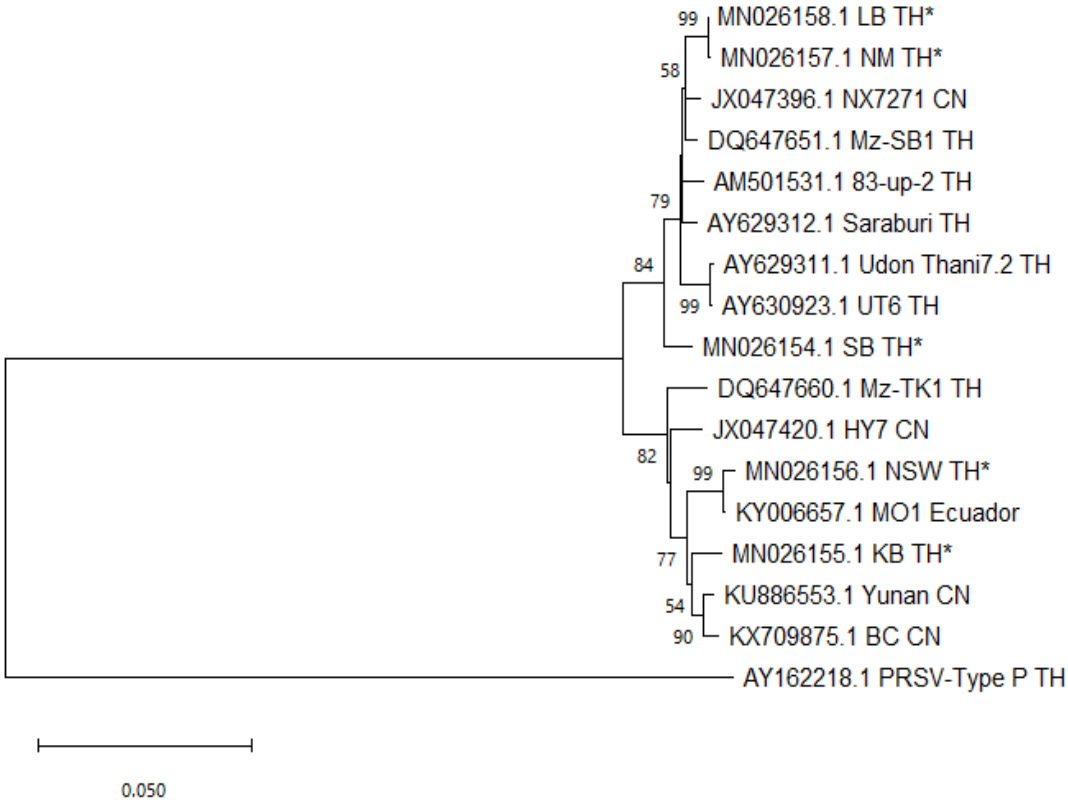
ภาพที่ 4 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (CP) ของเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลต โดยทำการวิเคราะห์แบบ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Clustal Omega

LB: ไอโซเลต Lopburi NM: ไอโซเลต Nakhon Ratchasima SB: ไอโซเลต Saraburi

KB: ไอโซเลต Kanchanaburi และ NSW: ไอโซเลต Nakhon Sawan

(*) ระบุกรดอะมิโนที่เหมือนกัน

(-) ระบุกรดอะมิโนที่ไม่มีในโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค



ภาพที่ 5 Neighbor-joining phylogenetic tree ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CP แสดงความสัมพันธ์ของเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลตที่แยกได้จากข้าวโพดในประเทศไทย (ไอโซเลทที่มีเครื่องหมาย*) กับไอโซเลตจากในประเทศไทยและในต่างประเทศ วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA 10 และใช้ค่า bootstrap จาก 1,000 replications โดยแสดงค่า bootstrap ที่มากกว่า 50% ใช้ข้อมูลของเชื้อไวรัส *Papaya ring spot virus* Type P (PRSV-Type P) เป็น outgroup

5. การผลิตและการตรวจสอบคุณภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb-SCMV-NSW) ต่อเชื้อไวรัส SCMV

5.1 ไตเตอร์ของแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SCMV-NSW

จากการผลิตแอนติบอดีโดยการฉีดเชื้อไวรัส SCMV-NSW ในกระต่าย แล้วเก็บซีรัม รวม 4 ครั้ง มาตรวจหาค่าไตเตอร์ด้วยเทคนิค Indirect PTA-ELISA โดยให้ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส SCMV-NSW ค่อนข้างบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 6,400 - 12,800 โดย PAb-SCMV-NSW ครั้งที่ 4 มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดคือ 12,800 (ตารางที่ 3 , ภาพที่ 6) จึงได้นำเอาแอนติบอดีครั้งที่ 4 มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

5.2 ค่าความเจือจางที่เหมาะสมของแอนติบอดี

การหาค่าความเจือจางที่เหมาะสมของ PAb-SCMV-NSW ครั้งที่ 4 โดยเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาต่อเชื้อไวรัส SCMV-NSW ในข้าวโพด โดยเจือจาง PAb-SCMV-NSW ที่ 5 ระดับ ได้แก่ 1:250, 1:500, 1:1,000, 1:1,500 และ 1:2,000 พบว่ามีค่า A_{405} เฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 1.279, 1.123, 1.004, 0.861 และ 0.787 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับใบข้าวโพดปกติที่มีค่าความเจือจางเท่ากัน มีค่าเฉลี่ยของ A_{405} ที่ประมาณ 0.164, 0.151, 0.140, 0.128 และ 0.120 ตามลำดับ (ตารางที่ 4, ภาพที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบค่า A_{405} พบว่าอัตราความเจือจางที่ 1:1,000 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส และใช้แอนติบอดีปริมาณน้อยในการตรวจเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพด

5.3 ความจำเพาะของแอนติบอดี (PAb-SCMV-NSW) ต่อเชื้อไวรัส SCMV

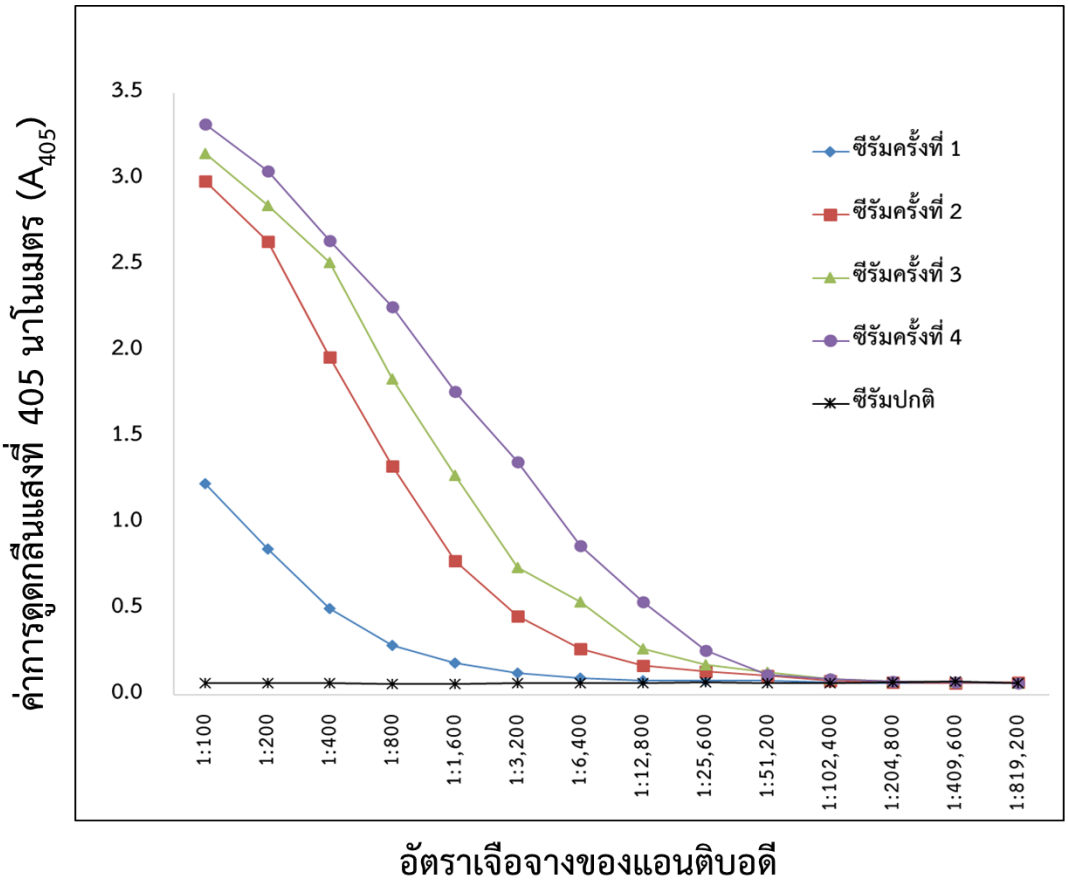
ทำการทดสอบความจำเพาะของ PAb-SCMV-NSW ต่อเชื้อไวรัส SCMV ด้วยเทคนิค Indirect PTA-ELISA โดยใช้เชื้อไวรัสทั้ง 5 ไอโซเลต เชื้อไวรัส *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) ในข้าวโพด และเชื้อไวรัสอื่น ๆ ในสกุล *Potyvirus* ได้แก่ เชื้อไวรัส *Chili veinal mottle virus* (CVMV) และ *Papaya ring spot virus* (PRSV) พบว่า PAb-SCMV-NSW ที่ผลิตได้ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพดทั้ง 5 ไอโซเลต และไม่ทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัส MCMV, CVMV และ PRSV (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 คาความเจือจางสูงสุด (dilution end point) ของแอนติบอดี PAb-SCMV-NSW เมื่อใชเชื้อไวรัส SCMV ค่อนข้างบริสุทธิ์ความเข้มข้น 5 μg/ml เปนแอนติเจน ตรวจสอบดวยเทคนิค Indirect PTA-ELISA

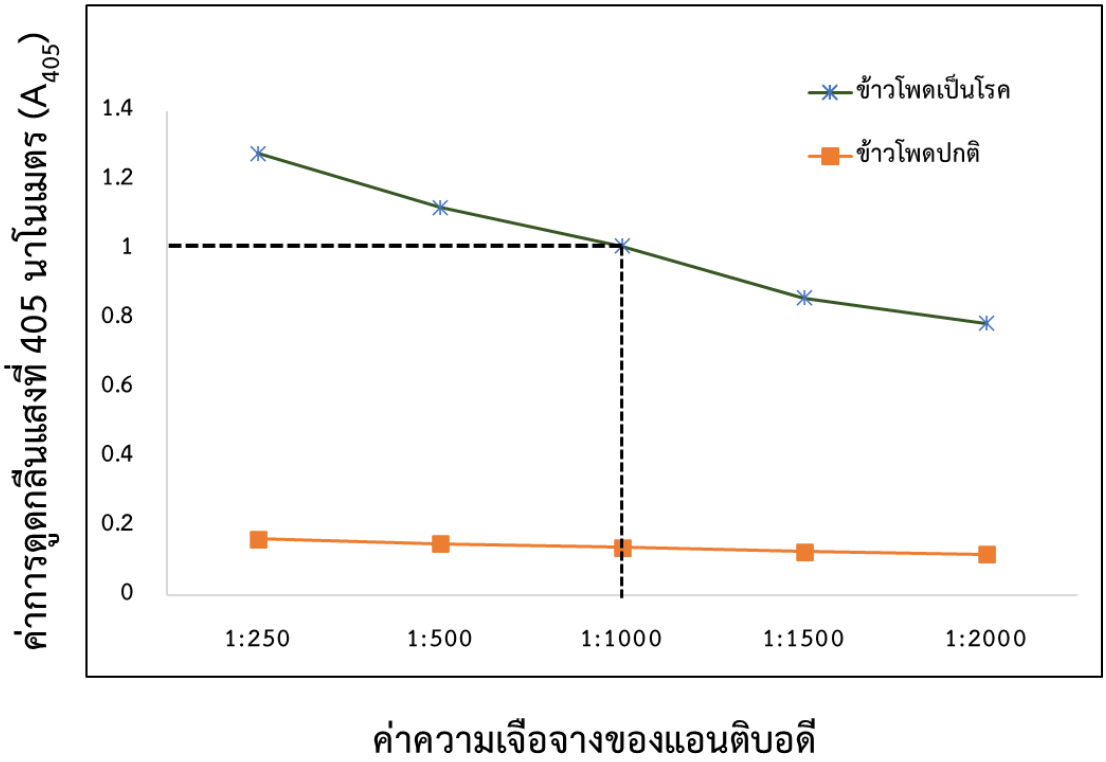
ค่าความเจือจาง	ค่า A_{405} เมื่อใช้แอนติบอดีครั้งที่				
ของแอนติบอดี	1	2	3	4	ซีรัมปกติ
1:100	1.229	2.989	3.149	3.318	0.070
1:200	0.850	2.639	2.845	3.048	0.067
1:400	0.504	1.966	2.516	2.642	0.066
1:800	0.289	1.333	1.839	2.256	0.064
1:1,600	0.187	0.779	1.279	1.764	0.064
1:3,200	0.127	0.460	0.742	1.355	0.066
1:6,400	0.096	0.267	0.539	0.868	0.069
1:12,800	0.084	0.170	0.267	0.543	0.068
1:25,600	0.085	0.138	0.176	0.260	0.072
1:51,200	0.080	0.111	0.129	0.118	0.070
1:102,400	0.071	0.085	0.093	0.092	0.068
1:204,800	0.069	0.075	0.075	0.079	0.073
1:409,600	0.070	0.070	0.071	0.071	0.079
1:819,200	0.068	0.071	0.068	0.068	0.068
Coating Buffer	0.067	0.065	0.064	0.063	0.062

หมายเหตุ - คา A_{405} เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ วัดที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

- คา A_{405} ของตัวอยางที่มากกวา 3 เท่า ของ normal serum ถือว่าใหผลเปนบวก



ภาพที่ 6 กราฟแสดงคาไตเตอรของแอนติบอดีตอเชื้อ SCMV-NSW (PAb-SCMV-NSW) จากการเจาะเลือดทั้ง 4 ครั้ง ใชเชื้อไวรัส SCMV-NSW ค่อนข้างบริสุทธิ์ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เปนแอนติเจนตรวจสอบดวยเทคนิค Indirect PTA-ELISA วัดคา ELISA ที่ A_{405} หลังจากเติม substrate นาน 60 นาที



ภาพที่ 7 กราฟแสดงคา ELISA Titer ของแอนติบอดีตอตอเชื้อ SCMV-NSW (PAb-SCMV-NSW) จากการเจาะเลือดครั้งที่ 4 เมื่อทำปฏิกิริยากับเชื้อ SCMV-NSW ในใบข้าวโพดที่เปนโรคตรวจสอบดวยเทคนิค Indirect PTA-ELISA วัดคา ELISA ที่ A_{405} หลังจากเติมsubstrate นาน 60 นาที

ตารางที่ 4 การตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดี PAb-SCMV-NSW ผลิตได้ กับเชื้อไวรัส MCMV และเชื้อไวรัสสกุล *Potyvirus* อื่น ๆ ตรวจสอบดวยเทคนิค Indirect PTA-ELISA

	ตัวอย่างพืชที่นำมาทดสอบ	**ค่า A405[1/]**
เชื้อไวรัส SCMV	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต NSW	1.203
	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต LB	1.175
	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต NM	1.117
	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต SB	1.254
	ข้าวโพดที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต KB	1.344
เชื้อไวรัสสกุล *Potyvirus*	ต้นลำโพงที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ CVMV	0.168
	ต้นมะละกอที่เป็นโรคจากการปลูกเชื้อ PRSV	0.184
	ตัวอย่างข้าวโพดที่เป็นโรคจากเชื้อไวรัส MCMV	0.159
	ข้าวโพดปกติ	0.138
	ต้นลำโพงปกติ	0.153
	ต้นมะละกอปกติ	0.146
	Coating Buffer	0.098

หมายเหตุ [1/] คาเฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ อานคา A_{405} ที่เวลา 60 นาที หลังจากเติม substrate

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. การตรวจสอบหาเชื้อ SCMV จากข้าวโพดที่แสดงอาการใบด่างจากแปลงปลูก 6 จังหวัด รวม 260 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค DAS-ELISA ตรวจพบเชื้อไวรัส SCMV จำนวน 89 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อและเพิ่มปริมาณในข้าวฟ่างพันธุ์ UT432 เพื่อรวบรวมไอโซเลตของเชื้อไวรัสทั้งสิ้น 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต Kanchanaburi (KB), Lopburi (LB), Nakhon Sawan (NSW), Saraburi (SB) และ Nakhon Ratchasima (NM)

2. ลักษณะอาการเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลต ลงบนข้าวโพดหวานลูกผสม จัมโบ้ สวีท F1 และข้าวฟ่างพันธุ์ UT432 พบว่าข้าวโพดหวานและข้าวฟางที่ได้รับการปลูกเชื้อ SCMV ไอโซเลต Kanchanaburi Lopburi และ Nakhon Sawan พบอาการใบด่างและเป็นขีดขนาดเล็ก ๆ ส่วนไอโซเลต Saraburi และ Nakhon Ratchasima พบอาการใบด่างประ

3. จากกการวิเคราะห์ยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ SCMV ทั้ง 5 ไอโซเลต สามารถบ่างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไอโซเลต Lopburi (LB) และ Nakhon Ratchasima (NM) มีขนาด 942 นิวคลิโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 313 เรซิดิวส์ และกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ไอโซเลต Saraburi (SB) Kanchanaburi (KB) และ Nakhon Sawan (NSW) มีขนาด 966 นิวคลิโอไทด์ แปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 321 เรซิดิวส์ เปรียบเทียบความคล้ายคลึงกันทั้ง 5 ไอโซเลต พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของนิวคลิโอไทด์ และกรดอะมิโนอยู่ระหว่าง 85.1% - 99.9% และ 88.2% - 99.7% ตามลำดับ

4. ผลการวิเคราะห์ Phylogenetic tree พบว่าเชื้อ SCMV ที่ได้จากข้าวโพดในประเทศไทย ไอโซเลต LB และ NM จับกลุ่มอยู่กับ SCMV ที่พบในประเทศไทย รวมทั้งไอโซเลต SB สำหรับไอโซเลต NSW และ KB จับกลุ่มอยู่กับ SCMV ที่พบในต่างประเทศ

5. การผลิตแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัส SCMV-NSW (PAb-SCMV-NSW) มีค่าไตเตอร์อยู่ในช่วง 6,400 - 12,800 โดย PAb-SCMV-NSW ครั้งที่ 4 มีค่าไตเตอร์สูงที่สุดคือ 12,800 โดยอัตราความเจือจางที่ 1:1,000 เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพด และมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส SCMV ในข้าวโพดโดยไม่ทำปฏิกิริยากับไวรัสชนิดอื่น ๆ เช่น เชื้อไวรัส MCMV CVMV และ PRSV

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. นำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส SCMV ที่เข้าทำลายข้าวโพดได้อย่างแม่นยำและรวดเร็ว

2. แอนติบอดีที่ผลิตได้มีราคาที่ถูกกว่าชุดตรวจสอบที่เป็นการค้า อีกทั้งยังมีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัส SCMV

3. แอนติบอดีที่ผลิตได้นี้สามารถนำไปต่อยอดพัฒนาชุดตรวจสอบเชื้อ SCMV ได้ เช่น ชุดตรวจสอบแบบ Strip kit ได้

11. เอกสารอ้างอิง

ธีระ สูตะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. บริษัทฟันนี่พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

Clark, M.F. and A.N. Adam. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant virus. *J. Gen. Virol*. 34: 475-483.

Gemechu A.L., Chiemsombat P., Attathom S.,Reanwarakorn K. and Lersrutaiyotin R. 2006. Cloning and sequence analysis of coat protein gene for characterization of *Sugarcane mosaic virus* isolated from sugarcane and maize in Thailand. *Arch Virol*. 151: 167–172

Li, L., Wang, X. F., and Zhou G., 2004. Study on seed transmission of *Sugarcane mosaic virus*. *Acta Phytopath*. *Sinica*. 34(1): 37-42.

Li, L., Wang, X.F., and Zhou G., 2007. Analyses of maize embryo invasion by *Sugarcane mosaic virus*. *Plant Sci.* 172(1): 132-138.

Tosic, M. and R.E. Ford. 1972. Grass differentiating *sugarcane mosaic virus* and *maize dwarf mosaic virus*. *Phytopathology* 62: 1466-1470.