การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus*

Antiserum Production of *Bean yellow mosaic virus*

สิทธิศักดิ์ แสไพศาล[1/] วันเพ็ญ ศรีทองชัย[2/]

กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
ผู้เชี่ยวชาญ สำนักวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

Bean yellow mosaic virus พบอาการปรากฏชัดบนใบและดอก เป็นรอยด่างเป็นทางขีดสีขาว ทำให้ดอกแกลดิโอลัสด่างโดยมีเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) เป็นแมลงพาหะทำให้เกิดการระบาดได้มากและรวดเร็วในแปลงเมื่อศึกษาบนพืชทดสอบ chenopodium โดยทำการปลูกเชื้อ (inoculation) ลงบนใบต้น chenopodium ด้วย sap inoculation พบแสดงอาการ chlorotic local lesions ใบป็นจุดสีเหลืองถึงน้ำตาลและใบมีรูปร่างผิดปกติ และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคไวรัส BYMV เป็นท่อนยาวคด การผลิตแอนติซีรัมของเชื้อไวรัส BYMV หลังแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ และนำไปฉีดกระต่ายทำการเจาะเลือดกระต่ายครั้งที่ 4-5 มีประสิทธิภาพสูงสุดสามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000 การสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG วัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ BYMV เท่ากับ 9.6 และเมื่อนำไปตรวจหาเชื้อ ให้ปฏิกิริยาเป็นบวก IgG ของ BYMV มีสีแดงเข้ม ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ ดังนั้นจึงสามารถที่นำ IgG ของ BYMV นี้ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัสได้

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 (http://www.talaadthai.com/web/resource/) 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 (คู่มือการผลิตไม้ดอกแกลดิโอลัส กรมส่งเสริมการเกษตร : http://www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/) โดยเฉพาะโรคใบด่างดอกด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ซึ่งเชื้อสามารถติดมากับหัวพันธุ์ที่นำเข้า รวมทั้งมีเพลี้ยอ่อนและเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะ ทำให้เกิดการระบาดได้มากและรวดเร็ว ส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของดอกแกลดิโอลัส โดยจะมีอาการปรากฏชัดบนใบและดอก โดยจะเห็นรอยด่าง เป็นทางทำให้ดอกไม่สมบูรณ์

ซึ่ง Salim Khan *at al.* (2003) ได้พัฒนาวิธีจำแนกไวรัสที่รวดเร็ว ในห้องทดลองกับมันฝรั่ง 6 พันธุ์คือ Cardinal, Diamant, Dhera, Multa, Cilena and Sieglinde โดยการปลูกเชื้อไวรัส PVA, PVY, PVV, PVM, PVS, PVX และ PLRV บนต้นมันฝรั่ง แล้วจำแนกด้วยวิธี DAS-ELISA เปรียบเทียบกับต้นที่ไม่ปลูกเชื้อ กิตติศักดิ์และคณะ (2532) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA พบว่าวิธี ELISA เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบ รวดเร็วและแม่นยำ ดีกว่าอีก 2 วิธี Hochleitner and Kraus (2002) ได้พัฒนาวิธี Lateral flow test ใช้ Colloidal Gold เป็นวัสดุแสดงปฏิกิริยาในการทำ dipstick ตรวจสอบไวรัสโดยใช้หลักการทางเซรุ่มวิทยา สุรภีและคณะ(2533) ใช้วิธีและขั้นตอนการศึกษาจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสของกล้วยไม้และทำการแยกให้ได้ไวรัสที่บริสุทธิ์ นำไปผลิตแอนติซีรัมที่มีคุณภาพที่ดีแล้วทดลองนำวิธีการตรวจสอบแบบ NCM ELISA มาปรับใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสที่รวดเร็ว

การตรวจเชื้อไวรัสจัดว่ามีความจำเป็นเพื่อป้องกันการระบาด และเพื่อสนับสนุนการตรวจวินิจฉัยโรค การจำแนกเชื้อสาเหตุอาจใช้วิธีการทางสรีรวิทยา สัญฐานวิทยา ซึ่งต้องใช้เวลาในการตรวจสอบ เพราะฉะนั้นวิธีการทางเซรุ่มวิทยาจึงเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีประสิทธิภาพ ดังนั้นการผลิต

แอนติซีรัม จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งเพราะมีความจำเพาะเจาะจงสูงกับเชื้อสาเหตุ เพื่อนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อสาเหตุได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวดเร็ว ถูกต้องและแม่นยำ เพื่อให้ได้ต้นพันธุ์หรือหัวพันธุ์ที่มีคุณภาพและปลอดโรค และเพื่อเป็นการพัฒนาคุณภาพการผลิตในประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ดังนั้นการศึกษาและพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) จึงมีความจำเป็นและมีความสำคัญต่อการตรวจสอบและคัดเลือกหัวพันธุ์ที่ปลอดโรค

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่อง centrifuge
- เครื่อง Spectrophotometer
- กล้อง electron microscopy
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
  เช่น Goat Anti-Rabbit+Phosphatase, non-fat milk, FR-TR salt และ Nitrocellulose membrane เป็นต้น

วิธีการ

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างแกลดิโอลัสจากแปลงปลูกของเกษตรกร

ทำการออกสำรวจและเก็บตัวอย่างแกลดิโอลัสในพื้นที่ปลูก เพื่อเก็บตัวอย่างแกลดิโอลัสที่มีอาการคล้ายโรคใบด่างดอกด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในพื้นที่จังหวัดเชียงราย เพื่อนำมาปลูกทดลองเพิ่มปริมาณเชื้อใน chenopodium และศึกษาลักษณะอาการ

2. การแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์

ทำการเตรียมและแยกเชื้อไวรัส สำหรับใช้ผลิตแอนติซีรัมพร้อมทั้งเตรียมพืชอาศัยของเชื้อไวรัส BYMV ไว้สำหรับปลูกเชื้อโดยบดตัวอย่างใบ chenopodium ที่เป็นโรคจำนวน 100 gm ใน lander กับ 200 ml ของ 0.5 M sodiumcitrate pH 6.5 ที่มี 5 mM EDTA และ 0.5 thioglycollic acid บดในสภาพเย็น กรองกากพืชทิ้งไปด้วยผากรอง นำน้ำคั้นผสมกับ 25% chloroform ให้เข้ากัน ตกตะกอนเอาเศษพืชออกไปด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 3,000 g นาน 10 นาท นำน้ำใสส่วนบนมาเติม polyethyleneglycol (mol.wt. 6,000) จำนวน 10% ของของเหลวโดยกวนให้เข้าก้นที่ 4°C นาน 1 ชั่วโมงแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 g นาน 30 นาท ละลายตะกอนด้วย 50 ml ของ 5 mM soidum borate buffer ที่มี 0.5 mM EDTA pH 8.0 แล้วเติม Triton X-100 ลงไป

2% ของของเหลวกวนให้เข้ากันนาน 30 นาท หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 g นาน 15 นาที นำสารละลายข้างบนมาหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วสูง เพื่อตกตะกอนไวรัสลงมาที่ความเร็ว 37,000 g นาน 1½ ชั่วโมง ละลายตะกอนด้วย 2 ml ของ 5 mM soidum borate buffer มี 0.5 mM EDTA pH 8.0 นำมาผ่านวิธีการ sucrose density gradient ที่มีน้ำตาลที่ 10-40% แล้วหมุนเหวี่ยงทที่ 24,000 g นาน 1½ ชั่วโมง ดึงแถบสีขาวของไวรัสออกจากชั้นของน้ำตาลแล้วเจือจางด้วย 5 mM soidum borate buffer มี 0.5 mM EDTA pH 8.0 นำมาตกตะกอนไวรัสด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 37,000 g นาน 2 ชั่วโมง ละลายตะกอนของไวรัส นำไปตรวจสอบขนาดอนุภาคของเชื้อด้วยกลองจุลทรรศอิเล็กตรอน

3. การฉีดกระต่ายและเจาะเลือดเก็บแอนติซีรัม

ทำการละลายเชื้อ BYMV ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant 1 ml ให้เข้ากันดี แล้วจึงฉีดเข้ากล้ามเนื้อสะโพกของกระต่ายเพศเมีย สีขาว ตาแดง พันธุ์ New Zealand White อายุ 3-4 เดือน สลับกันสัปดาห์ละข้าง 3 สัปดาห์หลังจากฉีดครั้งสุดท้ายแล้ว 20 วัน เจาะเลือดติดต่อกันสัปดาห์ละครั้ง 6 ครั้ง วางเลือดที่เจาะมาได้ในตู้เย็นให้เม็ดเลือดแดงเกาะตัวกันเป็นก้อน จึงแยกเม็ดเลือดแดงออกทิ้งไป แล้วเก็บแอนติซีรัม แบ่งใส่หลอดขนาด 1.5 ml เก็บแอนติซีรัมไว้ที่ –40°C

4. การเตรียมแอนติซีรัมและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัส

นำแอนติซีรัม BYMV ที่เจาะครั้งที่ 2, 5 และ 7 มาสกัด IgG อย่างละ 1 ml แยกกันผสมกับน้ำกลั่น 9 ml แล้วผสมกับ ammonium sulfate ที่อิ่มตัว 10 ml แล้วผสมให้เข้ากันดี นำไปตกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C ละลายตะกอนด้วย 4 ml ของ ½ เท่า PBS แล้วใส่ถุง dialysis tubing เพื่อ dialyse ใน PBS 1 ลิตร นาน 3 ชั่วโมง 2 ครั้งวัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย spectrophotometer แล้วปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD280 = 1.4 เพื่อให้มีความเข้มข้นของโปรตีน = 1 mg/ml

5. การทดสอบประสิทธิภาพ IgG ของ CMV ในการตรวจเชื้อไวรัสใบด่างแตงด้วยเทคนิค 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 หรือ ประมาณ 27-30°C หลังจากนั้นเท blocking buffer ออก ใส่ส่วนผสมของ IgG ของ CMV ที่ละลายอยู่ใน blocking buffer ใหม่ ในอัตรา 1:500 แช่แผ่น NCM นั้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง หรือประมาณ 27-30°C แล้วจึงล้างแผ่น NCM ด้วย TBS-Tween 3 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที เทส่วนผสม Goat anti-rabbit conjugated Alkaline phosphatase (SIGMA A7778) ที่เจือจางเป็น 1:3000 ในสารละลาย blocking buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย TBS-Tween 3 ครั้งๆ 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

เวลาและสถานที่

<u>ระยะเวลา</u> เริ่มเดือนตุลาคม 2553 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2555

<u>สถานที่</u> ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานไวรัสวิทยา กลุ่มวิจัยโรคพืช
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างแกลดิโอลัสจากแปลงปลูกของเกษตรกร

ได้ทำการเก็บตัวอย่างใบและต้นแกลดิโอลัส ในพื้นที่จังหวัดเชียงราย พบอาการปรากฏชัดบนใบและดอก โดยจะเห็นรอยด่างเป็นทางขีดๆ สีขาว และส่งผลทำให้ดอกแกลดิโอลัสด่างเป็นขีดๆ และพบเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) ซึ่งเป็นแมลงพาหะ ทำให้เกิดการระบาดได้มากและรวดเร็วในแปลง จึงได้เก็บรวบรวมตัวอย่างใบเพื่อนำมาตรวจสอบและนำต้นที่เป็นโรคมาปลูกเพื่อทำการทดลองต่อไป โดยนำใบที่แสดงอาการของโรคมาทำการปลูกเชื้อ (inoculation) ลงบนใบต้น chenopodium ด้วย sap inoculation ทำให้ใบที่ปลูกเชื้อแสดงอาการ chlorotic local lesions ใบเป็นจุดสีเหลืองถึงน้ำตาลและใบมีรูปร่างผิดปกติ

2. การแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์

จากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัส BYMV เป็นท่อนยาวคดแต่มีจำนวนน้อยไม่เพียงพอที่จะใช้ในการผลิตแอนติซีรัมจึงทำการการแยกเชื้ออีกครั้งโดยเพิ่มใบ chenopodium เป็น 300 กรัม และตัดขั้นตอนการผสม TritonX 100 2% ออกไป ทำให้มีอนุภาคแต่จะมีสิ่งสกปรกติดปะปนมามกว่าวิธีการแรก จึงนำไปกวนด้วย chloroform เพื่อตกตะกอนสิ่งสกปรกออกไป จึงได้ไวรัสที่บริสุธิ์และปริมาณมากพอฉีดกระต่ายต่อไป

3. การผลิตแอนติซีรัมด้วยการฉีดกระต่าย

ดำเนินการฉีดกระต่าย จำนวน 5-6 ครั้ง และเจาะเลือดครั้งละประมาณ 30-40 มิลลิลิตร เพื่อนำไปปั่นและเก็บน้ำใส ได้แอนติบอดีครั้งละ 10-15 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -80°C ผลการตรวจสอบคุณภาพของแอนติซีรัมที่ได้จากการเจาะเลือด จำนวน 6 ครั้ง โดยวิธี indirect ELISA โดยทำการเจือจางแอนติซีรัมจาก 1:100 ถึง 1:1,000,000 พบว่าแอนติซีรัมจากการเจาะเลือดครั้งที่ 4-5 มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000

4. การเตรียมแอนติซีรัมและการสกัด IgG ของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ใน
แกลดิโอลัส

การสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG IgG ที่สกัดออกมาเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ BYMV เท่ากับ 9.6 ปรับให้ IgG มีความเข้มข้นที่ OD^{260} เท่ากับ 1.4 เพื่อให้ IgG ที่ได้นี้มีปริมาณโปรตีนเป็น 1 mg/ml

5. การทดสอบประสิทธิภาพ IgG ของ CMV ในการตรวจเชื้อไวรัสใบด่างแตงด้วยเทคนิค
Nitrocellulose membrane-Enzyme-linked immuno sorbent assay (NCM-ELISA)

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแอนติซีรัมกับตัวอย่างแกลดิโอลัสที่แสดงอาการ โดยเปรียบเทียบกับพืชปกติด้วยวิธี NCM-ELISA พบว่าให้ปฏิกิริยาเป็นบวก IgG ของ BYMV มีสีแดงเข้มและไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ ดังนั้นสามารถที่จะนำ IgG ของ BYMV นี้ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัสได้

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) พบว่าการเจาะเลือดครั้งที่ 4-5 มีประสิทธิภาพสูงสุดสามารถทำปฏิกิริยาได้จนถึง 1:100,000 การสกัดสกัด gamma-globulin (IgG) และปรับความเข้มข้นของ IgG IgG ที่สกัดออกมาเมื่อวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยเครื่อง spectrophotomer ได้ค่าความเข้มข้น IgG ของ CMV เท่ากับ 9.6 และเมื่อ

นำไปตรวจหาเชื้อ BYMV ให้ปฏิกิริยาเป็นบวก IgG ของ BYMV มีสีแดงเข้ม ไม่เกิดปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ ดังนั้นจึงสามารถที่นำ IgG ของ BYMV นี้ไปใช้ในการตรวจหาเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัสได้ซึ่งต้นแกลดิโอลัสที่เป็นโรคจะพบอาการปรากฏชัดบนใบและดอกเห็นรอยด่างเป็นทางขีดสีขาวทำให้ดอกแกลดิโอลัสด่างโดยมีเพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) เป็นแมลงพาหะทำให้เกิดการระบาดได้มากและรวดเร็วในแปลง เมื่อศึกษาบนพืชทดสอบchenopodium โดยทำการปลูกเชื้อ (inoculation) ลงบนใบต้น chenopodium ด้วย sap inoculation ทำให้ใบที่ปลูกเชื้อแสดงอาการ chlorotic local lesions ใบเป็นจุดสีเหลืองถึงน้ำตาลและใบมีรูปร่างผิดปกติ และเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคไวรัส BYMV เป็นท่อนยาวคดซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Arneodo *et al.* (2005) ได้รายงานถึงการตรวจสอบในขั้นต้นของเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัสโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน วิธีซีรัมและ RT-PCR ในการตรวจสอบจากใบของแกลดิโอลัส จำนวน 25 ตัวอย่าง พบว่า BYMV มีอนุภาคเป็น flexuous ยาวประมาณ 750 นาโนเมตร กว้าง 12-15 นาโนเมตร และยังพบ BYMV ใน faba bean (*Vicia faba* L.), Pae (*Pisum sativum* L.) และ Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) เป็นพืชอาศัยด้วย Meenu *et al.* (2002) ได้ศึกษา *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ในแกลดิโอลัส 32 พันธุ์ โดยใช้เทคนิค ELISA, Immono electron microscopy และ RT-PCR โดยใช้ Primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อ BYMV จากการศึกษาแสดงให้ เห็นว่าการกระจายของเชื้อ BYMV ในต้นแกลดิโอลัสจะมีการกระจายในพันธุ์ที่มีลำต้นสูงและมีใบยาว Stein *et al.* (1994) ได้รายงานว่าเชื้อ *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) ไม่สามารถตรวจในหัว พันธุ์ได้ ทั้งวิธี ELISA และ RNA hybridization แต่จะตรวจสอบได้ในน้ำคั้นพืชจากส่วนของหัวพันธุ์ที่ตัดหรือเกิดบาดแผลมาแล้ว 2-5 อาทิตย์ เนื่องจากเชื้อไวรัส BYMV ในหัวพันธุ์ของแกลดิโอลัสนั้น จะมีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ต่ำ

ดังนั้นการผลิตแอนติบอดีนี้จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัส *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) เพื่อการแยกเชื้อไวรัส ให้มีความเฉพาะเจาะจง และใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธีการทางเซรุ่มวิทยาและด้านอื่นต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร สุรภี กีรติยะอังกูร และ นวลจันทร์ ดีมา 2532. การเปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบเชื้อ PVX, PVY ด้วยวิธี EM, IEM และ ELISA.

รายงานผลงานวิจัยประจำปี. 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 103-109.

คู่มือการผลิตไม้ดอกแกลดิโอลัส กรมส่งเสริมการเกษตร : http://www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/

สุรภี กีรติยะอังกูร กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร นวลจันทร์ ดีมา. 2533. การผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบโรค Cymbidium mosaic virus ของหวายลูกผสมและสาวน้อยเต้นระบำ.

รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2532. กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 115-122.

Arneodo, J.D.; S. de Breuil, S.L. Lenardon, V.C. Conci and L.R. Conci. 2005. Detection Of Bean yellow mosaic virus and Cucumber mosaic virus infecting gladiolus in Argentina. AGRISCIENTIA, VOL. XXII (2): 87-89.

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

Meenu Katoch, Raja Ram, A. A. Zaidi and I. D. Garg, 2002. Status of bean yellow mosaic virus on Gladiolus.

Salim Khan M., M. I. Hoque, R. H. Sarker and H.-P. Muehlbach. 2003. Detection of Important Plant Viruses in In vitro Regenerated Potato Plants by Double Antibody Sandwich Method of ELISA. Plant Tissue Cult. 13(1) : 21-29, 2003.

Stein A., A. Rosner and J. Hammond. 1994. Detection of *Bean yellow mosaic virus* in Gladioli Corms.

http://www.talaadthai.com/web/resource/