การวิจัยและพัฒนา การผลิตชุดตรวจสอบเชื้อไวรัส Sugarcane mosaic virus subgroup Maize dwarf mosic virus

Production of

เยาวภา ตันติวานิช[1/] ศิวิไล ลาภบรรจบ[2/]

[1/]กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

[2/]ศูนย์วิจัยพืชไร่นครสวรรค์ สถาบันวิจัยพืชไร่

รายงานความก้าวหน้า

เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการใบด่างและมีอาการเตี้ยแคระจากแปลงปลูกข้าวโพด อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์ นำมาตรวจสอบไวรัสด้วย เทคนิค Indirect ELISA (DAC-ELISA) นำตัวอย่างที่ตรวจพบไวรัส มาเพิ่มปริมาณบนข้าวฟ่าง โดยบดใบข้าวโพดใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 จากนั้นนำน้ำคั้นไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกล รอจนใบข้าวฟ่างแสดงอาการด่างให้เห็นชัดเจนจึง การแยกสกัดอาร์เอ็นเอ โดยใช้ RLT buffer (QIAGEN®) ดัดแปลงวิธีของ QIAGEN (2001) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ เตรียมนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้ม อนุภาคต่อไป

รหัสโครงการ 03-04-54-04-03-01-04-54

คำนำ

ข้าวโพดเป็นธัญพืชที่สำคัญมากพืชหนึ่งของโลก ผลผลิตประมาณครึ่งหนึ่งใช้เป็นอาหารมนุษย์ นอกจากนั้นใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์และอื่นๆ ข้าวโพดมีถิ่นกำเนิดแถบบริเวณประเทศตะวันตก และเป็นที่นิยมบริโภคกันแถบประเทศทวีปอเมริกากลางและใต้ สำหรับประเทศไทย ข้าวโพดเป็นที่รู้จักและนิยมบริโภคในรูปอาหารว่างระหว่างมื้ออาหารมาช้านานแล้ว และยังมีการปลูกข้าวโพดเพื่อการเลี้ยงสัตว์กันมาก จนถึงปัจจุบันข้าวโพดนับเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศอีกด้วย สำหรับข้าวโพดหวานจัดเป็นข้าวโพดที่สำคัญที่สุดในการส่งออก ในปี 2548 ประเทศไทยส่งออกข้าวโพดหวานในรูปแบบต่างๆ เป็นมูลค่ารวม 3,200 ล้านบาท แต่ในช่วงที่ผ่านมาพบว่าเกษตรกรประสบปัญหาความแห้งแล้งร่วมกับการระบาดของไวรัสและโรคใบไหม้แผลใหญ่จากเชื้อรา ทำให้ปริมาณผลผลิตลดลง ไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ตั้งแต่ปี 2547 เป็นต้นมา มีรายงานว่าพบโรคไวรัสระบาดอย่างหนักจนเกิดความเสียหายไปทั่วพื้นที่ปลูกข้าวโพดเลี้ยงสัตว์และข้าวโพดหวาน ทั้งในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจุบันมีการใช้เทคนิคการตรวจสอบสาเหตุโรคหลายชนิดในการตรวจสอบไวรัสนี้ เช่น เทคนิค dot blot hybridization Direct antigen coating ELISA (DAC-ELISA) Tissue blot immunoassay (TBIA) RT-PCR และ Real Time PCR ซึ่งเทคนิคต่างๆ เหล่านั้นอาจต้องใช้เวลาในการตรวจสอบนาน และ/หรือมีค่าใช้จ่ายสูง ไม่สะดวกต่อการปฏิบัติงานในภาคสนามและการให้บริการตรวจสอบผลิตผลเกษตร งานวิจัยนี้จึงได้นำ เทคนิค GLIFT Kit (Gold Labeling IgG Flow Test) มาปรับใช้ในการตรวจสอบไวรัสชนิดนี้ เพื่อให้สามารถตรวจสอบไวรัสได้อย่างมีประสิทธิภาพ สะดวกรวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

โรคใบด่างแคระข้าวโพดเกิดจากไวรัส Maize dwarf mosaic virus (MDMV) เป็นไวรัสตัวยาวในวงศ์ Potyviridae และเป็น subgroup ของเชื้อ Sugarcane mosaic virus (SCMV) ก่อให้เกิดความเสียหายกับการปลูกข้าวโพดมาก ตั้งแต่ลดการเจริญเติบโต ผลผลิตลดลงและทำให้ต้นข้าวโพดตายในพันธุ์ที่อ่อนแอหรือเมื่อต้นข้าวโพดได้รับไวรัสในขณะที่ยังเป็นต้นอ่อน ลักษณะอาการโดยทั่วไปข้าวโพดจะแสดงอาการเป็นจุดสีซีด (chlorotic spot) บริเวณฐานของใบอ่อนที่แตกใหม่ จากนั้นอาการจะขยายออกไปเป็นขีดสั้นๆ (broken streak) ไปตามแนวของเส้นใบ ถ้าเชื้อเข้าทำลายในระยะกล้าข้าวโพดจะชะงักการเจริญเติบโต เมื่อข้าวโพดแก่ใบเปลี่ยนเป็นสีม่วงหรือม่วงแดง ลักษณะอาการของโรคบางครั้งคล้ายกับโรคราน้ำค้าง แต่ถ้าตรวจสอบเวลาเช้ามืดอาการของโรคใบด่างจะไม่มีผงสปอร์สีขาวๆเกิดขึ้นเหมือนของราน้ำค้าง (Vock, 1978) เชื้อสามารถแพร่ระบาดไปได้โดยอาศัยเพลี้ยอ่อน (Rhopalosiphum maidis) ดูดเชื้อจากต้นเป็นโรคไปถ่ายทอดสู่ต้นปกติ การถ่ายทอดใช้เวลาอันสั้นมาก จากการสำรวจพบว่าหญ้าจอนห์สัน อ้อย ข้าวฟ่าง เป็นแหล่งเพาะเชื้อที่สำคัญของโรคนี้ นอกจากแมลงแล้วเชื้อวิสานี้ยังสามารถถ่ายทอดโดยการสัมผัส น้ำคั้นของพืชเป็นโรค (sap)

แพร่เชื้อติดไปกับเครื่องมือทางการเกษตร โรคนี้มีความสัมพันธ์กับโรคใบด่างอ้อยมาก (sugarcane mosaic virus) (De Leon, 1984)

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง
- spectrophotometer
- ตู้แช่แข็ง -20 และ -80 ^{0}C
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA
- สารเคมีและวัสดุที่ใช้ในการตรวจสอบด้าน GLIFT
- เครื่องมือใช้ในการ spray IgG, IgG-conjugate ควบคุมปริมาณได้
- เมมเบรน 7 ชนิด

วิธีการ

การเตรียมไวรัสที่ใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการใบด่างและมีอาการเตี้ยแคระจากแปลงปลูก ตรวจสอบไวรัสด้วย เทคนิค Indirect ELISA (DAC-ELISA) โดยบดตัวอย่างใบข้าวโพดใน carbonate buffer (0.015M Na2CO3, 0.035M NaHCO3 pH 9.6) ในอัตราใบพืช 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร (1:20) ดูดน้ำคั้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมของ ELISA plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ครบเวลาแล้วล้างด้วยสารละลาย PBST (140 mM Na2CO3, 2mM KH2HPO4, 8 mM Na2HPO42H2O, 2 mM KCl, 0.05% Tween20) เตรียมแอนติซีรัมเจือจาง 1:1000 ใน conjugate buffer (PBST, 2% polyvinyl- pyrrodidone, 0.2% ovalbumin) ใส่ลงในหลุมๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBST จากนั้นเติม anti rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate ใน conjugate buffer ที่เจือจางในอัตรา 1:30,000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ล้างออกและเตรียมสารละลาย substrate p-Nitrophenyl phosphate ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรใน substrate buffer (diethanolamine 9.7%, pH 9.8) ใส่หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 3M KOH หลุมละ 50 ไมโครลิตร อ่านค่า ELISA (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

นำตัวอย่างที่ตรวจพบไวรัส มาเพิ่มปริมาณบนข้าวฟ่าง โดยบดใบข้าวโพดใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 จากนั้นนำน้ำคั้นไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกล รอจนใบข้าวฟ่างแสดงอาการด่างให้เห็นชัดเจนจึงนำมาทำการทดลองต่อไป

การแยกสกัดอาร์เอ็นเอ

การแยกสกัดอาร์เอ็นเอจากข้าวฟ่าง โดยใช้ RLT buffer (QIAGEN®) ดัดแปลงวิธีของ QIAGEN (2001) นำใบข้าวฟ่างที่แสดงอาการด่าง 0.1 กรัม มาบดให้ละเอียด เติม RLT Lysis buffer (QIAGEN®) ปริมาตร 495 ไมโครลิตร เติม β- mercaptoethanol 5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเศษพืช นำน้ำใสส่วนบนใส่หลอดใหม่ เติม PCI mixture [phenol/chloroform: isoamyl alcohol (25/24:1)] ผสมให้เข้ากัน แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที นำน้ำใสใส่หลอดใหม่ เติม 3M sodium acetate pH 5.2 ปริมาตร 0.1 เท่า และ absolute ethanol ปริมาตร 2.5 เท่า นำไปไว้ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนกรดนิวคลีอิค ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง ละลายตะกอนที่ได้ด้วย RNase-free- H2O ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค

การสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคจาก RNA ของไวรัสใบด่างแคระข้าวโพดที่สกัดจากใบข้าวฟ่างที่เป็นโรคด้วยวิธี reverse transcription จากนั้นเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ cDNA ที่ได้จากปฏิกิริยา reverse transcription ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เป็นต้นแบบ (template) ในปฏิกิริยา 20 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย 50mM MgCl2 0.6 ไมโครลิตร 10xPCR buffer 2 ไมโครลิตร 10 mM dNTP 0.5 ไมโครลิตร forward primers (SsCP1) และ reverse primers (T24V) (20 ρmol/µl) 0.5 ไมโครลิตร Taq DNA polymerase 0.5 ไมโครลิตร d H2O 14.4 ไมโครลิตร และ template 1 ไมโครลิตร นำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycle) โดยตั้งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยปฏิกิริยาเพื่อให้มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณมากขึ้นในแต่ละรอบ ดังนี้ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เพื่อแยกดีเอ็นเอต้นแบบให้เป็นสายเดี่ยว (denature) เป็นเวลา 1 นาที ขั้นที่ 2 ที่อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เพื่อให้ไพรเมอร์จับคู่กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) เป็นเวลา 1 นาที และขั้นที่ 3 ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป็นเวลา 10 นาที จำนวน

35 รอบ และปฏิกิริยาขั้นสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เป็นเวลา 10 นาที เมื่อปฏิกิริยาเสร็จสมบูรณ์ตรวจสอบผลจากปฏิกิริยา PCR ด้วยวิธีเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

ผลิตชุดตรวจสอบไวรัสวิธี GLIFT kit

ผลิตแอนติเจนของ Sugarcane mosaic virus โดยใช้ cDNA ที่เพิ่มปริมาณได้ มาทำให้บริสุทธิ์และใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้ากระต่ายเพื่อการผลิตแอนติซีรัม จากนั้นทำการผลิตแอนติซีรัม สกัด IgG และทดสอบคุณภาพ IgG และทดสอบวิธีการผลิตชุดตรวจสอบไวรัสอย่างง่ายของ Sugarcane mosaic virus

เวลาและสถานที่

ต.ค.53 – ก.ย.56 ที่กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การเตรียมไวรัสที่ใช้ในการทดลอง

เก็บตัวอย่างข้าวโพดที่แสดงอาการใบด่างและมีอาการเตี้ยแคระจากแปลงปลูกข้าวโพด อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์ นำมาตรวจสอบไวรัสด้วย เทคนิค Indirect ELISA (DAC-ELISA) นำตัวอย่างที่ตรวจพบไวรัส มาเพิ่มปริมาณบนข้าวฟ่าง โดยบดใบข้าวโพดใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 จากนั้นนำน้ำคั้นไปปลูกเชื้อด้วยวิธีกล รอจนใบข้าวฟ่างแสดงอาการด่างให้เห็นชัดเจนจึงนำมาทำการทดลองต่อไป

การแยกสกัดอาร์เอ็นเอ

การแยกสกัดอาร์เอ็นเอจากข้าวฟ่าง โดยใช้ RLT buffer (QIAGEN®) ดัดแปลงวิธีของ QIAGEN (2001) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของอาร์เอ็นเอ เตรียมนำอาร์เอ็นเอที่ได้ไปการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. GLIFT kit ตรวจไวรัส
ของกล้วยไม้ใน 5 นาที. ผลงานวิจัยเพื่อพิจารณาเป็นผลงานวิจัยดีเด่นประจำปี 2547.

De Leon, C. 1984. Maize Diseases. A guide for field identification. Centro Internacional de
Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT). 3rd edition. 115 p.

Vock, N.T. 1978. A handbook of plant diseases in colour. Plant Pathology Branch. Queensland Department of Primary Industry.