การตรวจวินิจฉัยและการแพร่กระจายในแปลงปลูกของเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* สาเหตุโรคใบด่างขีดอ้อยในประเทศไทย

Diagnosis and Field Distribution of *Sugarcane streak mosaic virus*, the Causal Agent of Streak Mosaic Disease in Thailand

ปวีณา เกษมสินธุ์[1,2] พิสสวรรณ เจียมสมบัติ[3*] และรัชนี ฮงประยูร[1,2,3]

Paweena Kasemsin[1,2], Pissawan Chiemsombat[3*] and Ratchanee Hongprayoon[1,2,3]

Abstract

Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV) causes a streak mosaic disease of sugarcane in many Asian countries and drastically decreases cane yield. The virus is flexuous rod and classified in a newly assigned genus *Poacevirus*, family *Potyviridae*. Sugarcane leaves showing yellow streak mosaic symptom were strikingly observed in farmers' fields in Kanchanaburi and Nakhon Pathom Provinces, but the causal agent has not been investigated. In this study, antibody to SCSMV was produced for use in virus diagnosis and field distribution. Purified virions of SCSMV isolate NP3 was used as an antigen to produce polyclonal antisera. Two immunological methods, the direct antigen coating enzyme-linked immunosorbent assay (DAC-ELISA), and the immunochromatographic strip (ICS), were successfully developed, revealing specific and sensitive detection methods of SCSMV in diseased plant sap at the end point dilutions of 1:5,120 and 1:40, respectively. Surveys for streak mosaic disease incidence were conducted in July 2012 at six farmer fields in Phanom Thuan, Bo Phloi, Mueang and Dan Makham Tia Districts, and in October 2014 at one germplasm collection field of Kasetsart University in Sai Yok District, Kanchanaburi Province. The infection rate of SCSMV were 43.48-90.91% in six farmer fields, while it was 63.27% in germplasm collection field. The results indicated high incidence and wide distribution of sugarcane streak mosaic disease in the important area of cane production in Thailand.

Keywords: *Sugarcane streak mosaic virus*, *Poacevirus*, sugarcane varieties, diagnosis, immunostrip test, ELISA, disease incidence

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140, Thailand

[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

[3]ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม 73140

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand

รับเรื่อง : พฤศจิกายน 2558

รับตีพิมพ์ : มกราคม 2559

*Corresponding author: agrpwc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV) เป็นสาเหตุโรคใบด่างขีดของอ้อยในหลายประเทศในทวีปเอเชีย และทำให้ผลผลิตอ้อยลดลงมาก อนุภาคไวรัสเป็นรูปท่อนยาวคด จัดอยู่ในสกุล *Poacevirus* ที่ได้รับการจัดตั้งขึ้นใหม่ในวงศ์ *Potyviridae* จากการที่พบว่าต้นอ้อยจำนวนมากในแปลงเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดกาญจนบุรีและนครปฐมแสดงอาการใบด่างขีดสีเหลือง แต่ยังไม่มีการตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุของโรค งานวิจัยนี้จึงได้ผลิตแอนติซีรัมเพื่อใช้ตรวจวินิจฉัยโรคและศึกษาการแพร่กระจายในแปลงปลูก โดยนำสารละลายไวรัสบริสุทธิ์ของเชื้อ SCSMV ไอโซเลท NP3 นำมาใช้เป็นแอนติเจนและฉีดเข้าสู่กระต่ายเพื่อผลิตแอนติ-ซีรัม สกัดแอนติบอดีมาใช้ในการพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ SCSMV ด้วยวิธี DAC-ELISA และผลิตชุดตรวจสำเร็จรูปแบบ immunochromatographic strip (ICS) ผลการศึกษาพบว่าทั้งสองวิธีมีความจำเพาะและมีความไวในการตรวจเชื้อ SCSMV ที่อัตราการเจือจางสุดท้าย 1:5,120 และ 1:40 เท่าตามลำดับ ดำเนินการสำรวจโรคใบด่างขีดอ้อยเมื่อเดือนกรกฎาคม 2555 ในแปลงปลูกอ้อยของเกษตรกร 6 แห่งในเขตอำเภอพนมทวน บ่อพลอย เมือง และด่านมะขามเตี้ย และเดือนตุลาคม 2557 ในแปลงรวมพันธุ์อ้อยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี พบต้นอ้อยเป็นโรคใบด่างขีดในอัตรา 43.48-90.91% ในแปลงปลูกของเกษตรกร และ 63.27% ในแปลงรวมพันธุ์อ้อย งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการเกิดโรคใบด่างขีดอ้อยในอัตราสูงและมีการแพร่กระจายของเชื้อ SCSMV ในพื้นที่ปลูกอ้อยที่สำคัญของประเทศไทย

คำนำ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย จากข้อมูลของสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทรายปีการผลิต 2555/56 รายงานว่า ที่จังหวัดนครราชสีมา มีพื้นที่ปลูกอ้อย 640,508 ไร่ มากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และจัดเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ รองลงมาได้แก่ ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออก ต่อมาในปีการผลิต 2557/58 ปรากฏว่าจังหวัดกาญจนบุรีมีพื้นที่ปลูกอ้อยเพิ่มขึ้นเป็น 723,828 ไร่ คิดเป็น 24.2% ของพื้นที่ปลูกภาคกลาง ซึ่งเป็นอันดับหนึ่งของประเทศและของภาคกลาง พันธุ์อ้อยที่เหมาะสมสำหรับภาคกลางได้แก่ K76-4, K90-77, LK92-14, UT9, UT84-10, UT84-11, UT84-12, KPK98-40 เป็นต้น ปัญหาสำคัญประการหนึ่งได้แก่ ต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้นจากค่าสารเคมีกำจัดวัชพืช และโรคแมลงศัตรูพืช ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนถึงร้อยละ 6.69 ของต้นทุนรวม (Jaisil, 2014) โรคพืชที่ร้ายแรงและทำลายผลผลิตอ้อยมากที่สุดได้แก่ โรคใบขาวที่เกิดจากเชื้อไฟโตพลาสมา (Sugarcane white leaf Phytoplasma) โรคอื่นๆ ที่พบนอกจากนี้ได้แก่ โรคเหี่ยวเน่าแดง โรคเน่าคออ้อย โรคแส้ดำที่เกิดจากเชื้อรา และโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) (Gemechu *et al*., 2006) Chatenet *et al*. (2005) รายงานการตรวจพบเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) ที่ทำให้เกิดโรคใบด่างขีดในอ้อยลักษณะคล้ายกับอาการของโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ SCMV จากประเทศบังกลาเทศ อินเดีย ปากีสถาน ศรีลังกา ไทยและ เวียดนาม จากนั้น Damayanti and Putra (2011) รายงานการพบเชื้อ SCSMV ในประเทศอินโดนีเซีย และต่อมา Kasemsin *et al*. (2011) ตรวจพบเชื้อ SCSMV ในตัวอย่างอ้อยที่แสดงอาการใบด่างขีดที่เก็บมาจากแปลงเกษตรกรในจังหวัดนครปฐม (ไอโซเลท THA-NP3) โดยใช้วิธี RT-PCR รวมทั้งศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein, CP) ของเชื้อดังกล่าวพบว่ามีความคล้ายคลึงกันสูงสุด

ที่ระดับ 97% กับเชื้อ SCSMV-JP1 จากประเทศจีน

เชื้อ SCSMV มีอนุภาคเป็นรูปท่อนยาวคด (flexuous rod) ขนาด 890 × 15 นาโนเมตร มีจีโนมเป็น RNA สายเดี่ยวแบบ positive sense ขนาดประมาณ 10 กิโลเบส ได้รับการจัดจำแนกให้อยู่ในสกุล (genus) ใหม่ชื่อ *Poacevirus* (Xu *et al*., 2010) เนื่องจากจีโนมของเชื้อ SCSMV มีความแตกต่างจากเชื้อ SCMV ที่อยู่ในสกุล *Potyvirus* และเชื้อในสกุลอื่นของวงศ์ (family) *Potyviridae* พืชอาศัยในธรรมชาติของเชื้อ SCSMV ได้แก่ อ้อย ข้าวฟ่าง (*Sorghum bicolor*) และหญ้าปากควาย (*Dactyloctenium aegyptium*) (Damayanti and Putra, 2011) วิธีตรวจวินิจฉัยเชื้อ SCSMV ที่ให้ผลถูกต้องแม่นยำ ได้แก่ วิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน CP (Chatenet *et al*., 2005) หรือโดยการใช้แอนติบอดี (Hema *et al*. 2003) โดยมีการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ SCSMV จากอินเดีย (ไอโซเลท AP) รวมทั้งพัฒนาวิธีตรวจแบบ direct antigen coating enzyme-linked immunosorbent assay (DAC-ELISA) และวิธี immunocapture reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) ซึ่งทั้งสองวิธีสามารถตรวจสอบเชื้อ SCSMV จากตัวอย่างน้ำคั้นใบพืชได้อย่างจำเพาะ แต่สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับวิธีการวินิจฉัยโรคนี้รวมทั้งไม่มีรายงานการแพร่กระจายของเชื้อ SCSMV ในแปลงอ้อย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแอนติบอดีและพัฒนาวิธีการตรวจวินิจฉัยเชื้อ SCSMV ด้วยเทคนิค DAC-ELISA และ immunochromatographic strip (ICS) เพื่อนำมาใช้ในการสำรวจการแพร่กระจายของเชื้อ SCSMV ในแปลงปลูกอ้อยที่จังหวัดกาญจนบุรี และในแปลงรวมพันธุ์อ้อยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่บ้านทุ่งก้างย่าง อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี

อุปกรณ์และวิธีการ

การผลิตแอนติบอดีของเชื้อ SCSMV

ใช้เชื้อ SCSMV ไอโซเลท THA-NP3 ที่เตรียมให้เป็นไวรัสบริสุทธิ์ (Kasemsin *et al*., 2011) นำมาใช้เป็นแอนติเจนฉีดเข้ากระต่ายเพศเมียพันธุ์ New Zealand White เพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดี ในสัปดาห์แรกเตรียมแอนติเจนสำหรับฉีดโดยปรับความเข้มข้นของไวรัสบริสุทธิ์เป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันดีกับ Freund's complete adjuvant ปริมาตรเท่ากัน ฉีดเข้าผิวหนัง (Intradermal injection, ID) บริเวณแผ่นหลังของกระต่ายจำนวน 10 จุด จุดละ 100 ไมโครลิตร ต่อมาในสัปดาห์ที่สามเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ให้มีความเข้มข้นเท่าเดิมแต่ผสมกับ Freund's incomplete adjuvant ปริมาตรเท่ากัน ฉีดเข้ากล้ามเนื้อขาหลัง (Intramuscular injection, IM) ของกระต่าย หลังจากนั้นเก็บเลือดทุกสัปดาห์รวม 7 ครั้ง แต่ละครั้งแยกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นซีรัมมาเติม sodium azide ในอัตรา 0.02% (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการตรวจสอบไตเตอร์ (titer) ของแอนติซีรัม แล้วนำแอนติซีรัมมากำจัดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะด้วยวิธี cross absorption โดยใช้น้ำคั้นใบข้าวฟ่างปกติที่เจริญจากการเพาะเมล็ด เตรียมน้ำคั้นโดยบดใบอ่อนของข้าวฟ่างในบัฟเฟอร์ PBS, pH 7.4 อัตราส่วนใบพืช 1 กรัม ต่อบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร แยกเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใสมาใช้ โดยผสมแอนติซีรัมที่ผลิตได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับน้ำคั้นที่เตรียมไว้ในสัดส่วน 1:500 กวนให้ส่วนผสมเข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่นตกตะกอนที่ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่มีแอนติซีรัมไปสกัดอิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin G) และทำการทดสอบปฏิกิริยาทางซีรัมวิทยากับเชื้อ SCSMV ในน้ำคั้นใบพืช

การเตรียมอิมมูโนโกลบูลิน (IgG) และทดสอบความจำเพาะ (specificity)

นำแอนติซีรัมที่ผ่านการกำจัดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะแล้วมาเจือจางใน binding buffer (20 mM CH_3COONa, pH 7.4) ในอัตรา 1:1 โดยปริมาตร แล้วสกัด IgG โดยใช้ Protein G plus agarose column chromatography ตามวิธีที่ระบุโดยบริษัทผู้ผลิต (Pierce: Thermo Scientific, USA) ชะ IgG ออกจากคอลัมน์ด้วย elution buffer (0.1M CH_3COONa, pH 3.5) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปรับ pH ของสารละลาย IgG ที่ได้ในแต่ละ fraction ด้วย neutralization buffer (1 M Tris, pH 9.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำการไดอะไลซีส (dialysis) ใน phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4 และเก็บรักษา IgG ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

ทดสอบความจำเพาะของ IgG ต่อเชื้อ SCSMV ด้วยวิธี DAC-ELISA โดยทดสอบปฏิกิริยาของ IgG กับน้ำคั้นตัวอย่างอ้อยและข้าวฟ่างที่มีเชื้อ SCSMV และน้ำคั้นพืชที่มีเชื้อไวรัสชนิดอื่น 6 ชนิด ประกอบด้วยตัวอย่างที่ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร กำแพงแสน ได้แก่ อ้อยเป็นโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ SCMV-SC ข้าวโพดเป็นโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อ SCMV-KR ข้าวโพดเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อ MCMV และอีก 3 ตัวอย่างสั่งซื้อจากบริษัท Agdia Inc, USA เป็นน้ำคั้นพืชที่ติดเชื้อไวรัส (positive control) 3 ชนิด ได้แก่ *Johnsongrass mosaic virus* (JGMV), *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV), *Sugarcane bacilliform virus* (SCBV)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อ SCSMV ด้วย วิธี DAC-ELISA

ทำตามขั้นตอนที่รายงานโดย Chiemsombat *et al*. (2010) บดใบอ้อยในบัฟเฟอร์ PBS, pH 7.4 ที่เติม 0.1% sodiumdiethyldithiocarbamate ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ดูดส่วนใสมาเจือจางใน coating buffer (0.05 M carbonate buffer, pH 9.6) อัตราส่วน 1:10 ใส่น้ำคั้นพืชปริมาตร 100 ไมโครลิตรในหลุมของ microtiter plate บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นเติมสารแต่ละชนิดตามลำดับขั้นตอนต่อไปนี้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ละชนิดบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เริ่มด้วย blocking reagent ใช้ skim milk ที่ละลายใน PBST ความเข้มข้น 3% ครบเวลาแล้วล้าง plate ด้วย PBST และเติมแอนติบอดีต่อเชื้อ SCSMV (cross-absorbed serum) ที่เจือจาง 1:500 เท่า ล้างเช่นเดิมและเติม goat anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate ที่เจือจาง 1:10,000 เท่าขั้นสุดท้ายเติมสับสเตรท 4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (Sigma, USA) ที่ละลายใน diethanolamine buffer pH 9.6 ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 60 นาที แล้วอ่านผลของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง ELISA reader จากค่าการดูดกลืนแสงที่ A405

การเตรียมส่วนประกอบของชุดตรวจโรคแบบ ICS

เตรียม colloidal gold conjugated SCSMV-IgG (CG-SCSMV-IgG) และแผ่น conjugate releasing pad (CRP) ขั้นตอนแรกนำสารแขวนลอยอนุภาคทอง colloidal gold (CG) ขนาด 40 นาโนเมตร (Heron Diagnostic, บริษัทไบโอจีโนเมดจำกัด ผู้แทนจำหน่าย, USA) ปริมาตร 10 มิลลิลิตรมาปรับค่า pH ให้ได้ 7.3 ด้วย 0.2 M KCO_3 (pH 8.0) นำมาผสมกับสารละลาย SCSMV-IgG เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 10% bovine serum albumin (BSA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ปั่นตกตะกอน CG-SCSMV-IgG ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนของ CG-SCSMV-IgG ด้วยบัฟเฟอร์ gold diluted buffer (0.02 M Na_2HPO_4, 0.1% NaN3, 1% BSA, pH 7.4) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมซูโครสในอัตรา 20%

(น้ำหนักต่อปริมาตร) เขย่าเบาๆ เพื่อให้ละลาย ขั้นตอนต่อมาใช้พู่กันเบอร์ 0 จุ่มและทา CG-SCSMV-IgG ลงบนแผ่นกลาสไฟเบอร์ (glass fiber, standard 17, Whatman, England) ในอัตรา 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร นำแผ่น CRP ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเตรียม antibody coated membrane โดยใช้แผ่นเมมเบรนไนโตรเซลลูโลส ขนาด 8 ไมครอน (AE99, Whatman, England) ใช้เครื่อง Biodot XY 2000 (BioDot Inc, USA) ฉีดแอนติบอดีสองแถบ แถบแรกเป็น test line (T) ฉีดสารละลาย SCSMV-IgG ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตรา 5 ไมโครลิตรต่อเซนติเมตร ปล่อยให้แห้ง จากนั้นฉีดแถบที่สอง เป็น control line (C) สารละลาย goat-antirabbit IgG (GAR) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในอัตราเดิม โดยเว้นระยะห่างจาก test line 0.5 เซนติเมตร จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนที่มีแถบ T และ C lines ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการประกอบชุดตรวจโรคแบบ ICS ซึ่งมีส่วนประกอบ 4 ชิ้น ได้แก่ sample pad (SP), antibody coated -nitrocellulose membrane (NCM), conjugate release pad (CRP) และ absorbent pad (AP) เริ่มจากวางแผ่นรอง backing pad ไว้ชั้นล่างสุด จากนั้นวางแผ่น NCM ที่เตรียมไว้ ตามด้วยแผ่น CRP ซึ่งวางให้เกยทับแผ่น NCM ทางด้านขวาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร วางแผ่น SP ให้เกยทับแผ่น CRP ประมาณ 1-2 มิลลิเมตร และวางแผ่น AP (หรือ wick) ให้เกยทับแผ่น NCM ทางด้านซ้ายประมาณ 1-2 มิลลิเมตร เมื่อวางส่วนประกอบครบทั้ง 4 ชิ้นแล้ว นำแผ่น ICS ที่ได้มาตัดแบ่งด้วยเครื่องตัดกระดาษ ให้เป็นแถบเล็ก (strip) แต่ละชิ้นมีขนาดกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 6 เซนติเมตร

การทดสอบประสิทธิภาพของชุดตรวจโรคแบบ ICS

ทดสอบบัฟเฟอร์ 4 ชนิด ที่จะใช้เตรียมน้ำคั้นพืชสำหรับใช้กับชุดตรวจ ได้แก่ sample buffer 3 ชนิดจากบริษัท Adgen (United Kingdom), Bioreba (Switzerland), Agdia (USA) และ borate buffer อีกหนึ่งชนิดที่เตรียมขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ หยดบัฟเฟอร์ 3 หยด ที่บริเวณ sample pad (SP) แล้วอ่านผลภายในเวลา 5 นาที เลือกบัฟเฟอร์ที่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับ C line เป็นเส้นสีม่วง แต่ไม่เกิดบน T line นำมาใช้บดตัวอย่างใบพืชเป็นโรคในอัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 10 มิลลิลิตร ทำการทดสอบความไวของชุดตรวจจากค่าการเจือจางสุดท้าย (end point dilution) ของน้ำคั้นพืช โดยเจือจางแบบ 2-fold dilution อัตราส่วน 1:5 - 1:320 ทำทั้งใบพืชปกติและเป็นโรค แล้วหยดน้ำคั้นพืชแต่ละความเข้มข้น(ประมาณ 130 ไมโครลิตร) ลงบน sample pad อ่านผลของปฏิกิริยาเกิดเส้นสีม่วงบน C และ T lines ภายในเวลา 5 นาที

การสำรวจโรคใบด่างขีดอ้อยในจังหวัดกาญจนบุรี

สำรวจโรคและตรวจดูการแพร่กระจายของเชื้อ SCSMV ในแปลงปลูกอ้อยของเกษตรกรใน 4 อำเภอของจังหวัดกาญจนบุรี ได้แก่ อำเภอเมือง พนมทวน บ่อพลอย และด่านมะขามเตี้ย ซึ่งดำเนินการในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2555 และในแปลงรวมพันธุ์อ้อยของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ที่บ้านทุ่งก้างย่าง อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งดำเนินการในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557 เก็บตัวอย่างใบอ้อยที่มีอาการด่างขีดสีเหลืองหรืออาการที่คล้ายกับโรคไวรัส ใส่ในถุงพลาสติก แช่เย็น และนำกลับมาตรวจวินิจฉัยเชื้อ SCSMV ในห้องปฏิบัติการด้วยวิธี DAC-ELISA

ผลและวิจารณ์

การผลิตแอนติบอดีและการทดสอบปฏิกิริยาต่อเชื้อ SCSMV ในน้ำคั้นพืช

เก็บแอนติซีรัมจากกระต่ายทั้งหมด 7 ครั้ง ได้ปริมาตรรวม 80 มิลลิลิตร ผลการทดสอบไตเตอร์ด้วยวิธี DAC-ELISA พบว่าแอนติซีรัมในสัปดาห์ที่

สามให้ค่าไตเตอร์สูงสุดเท่ากับ 409,600 แอนติซีรัม และ IgG ที่ผ่านการกำจัดปฏิกิริยาไม่จำเพาะด้วยวิธี cross absorption ไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นใบข้าวฟ่างปกติ (เจือจางในอัตราส่วน 1:10) และมีความจำเพาะกับเชื้อ SCSMV โดยไม่เกิดปฏิกิริยากับน้ำคั้นพืชเป็นโรคจากไวรัสชนิดอื่นอีก 6 ชนิดที่นำมาทดสอบ cross-absorbed IgG ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:400 สามารถตรวจพบเชื้อ SCSMV ในน้ำคั้นใบพืชที่อัตราการเจือจางสุดท้าย (end point dilution) 1:5,120 เท่า เมื่อตรวจสอบยืนยันความน่าเชื่อถือของวิธีการ DAC-ELISA ที่พัฒนาขึ้นด้วยวิธี RT-PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน CP ของเชื้อ SCSMV ตามวิธีของ Kasemsin *et al.* (2010) พบว่าทั้งสองวิธีให้ผลการวินิจฉัยโรคที่สอดคล้องกัน

ประสิทธิภาพของชุดตรวจโรคแบบ ICS

มีบัฟเฟอร์เพียงชนิดเดียวของบริษัท Adgen (10 mM Na_2SO_3, 0.02% NaN_3, 0.14 M NaCl, 1.5 mM KH_2PO_4, 2% PVP, 0.2% ovalbumin, 0.05% Tween20) ที่ทำให้เกิดสีม่วงบนเส้น C line ของชุดตรวจโดยไม่เกิดปฏิกิริยากับ T line ส่วนบัฟเฟอร์อื่นที่นำมาทดสอบจากบริษัท Bioreba, Agdia รวมทั้ง borate buffer ที่เตรียมขึ้นเองนั้น ไม่เกิดปฏิกิริยาบนเส้น C หรือ T lines ดังนั้นจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ Adgen มาบดใบอ้อยและข้าวฟ่างเป็นโรคที่เจือจาง 1:10 เท่า หลังจากหยดน้ำคั้นลงบน sample pad พบว่าเกิดเส้นสีม่วงของ T line และ C line ได้ภายในเวลา 5 นาที (ภาพที่ 1ก) และเกิดเส้นสีม่วงบน T line ได้ชัดเจนจากน้ำคั้นพืชที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5, 1:10, 1:20, และ 1:40 แต่น้ำคั้นที่เจือจางในอัตราส่วน 1:80, 1:160 และ 1:320 เกิดเส้นสีม่วงบน T line ที่ไม่ชัดเจน ทั้งนี้ในทุกการทดสอบไม่พบปฏิกิริยาใดๆ กับน้ำคั้นใบพืชปกติทุกระดับของการเจือจาง (ภาพที่ 1ข-ค) และแม้ว่าการตรวจวินิจฉัยด้วยวิธี DAC-ELISA จะมีความไวสูงกว่าการใช้ชุดตรวจ ICS เมื่อดูจากค่า end point dilution ของน้ำคั้นพืช แต่ชุดตรวจดังกล่าวเหมาะสำหรับนำมาใช้วินิจฉัยเชื้อ SCSMV ในภาคสนาม เช่น การสำรวจโรคในแปลง

ชุดตรวจ ICS ของเชื้อ SCSMV ที่พัฒนาได้ในงานวิจัยนี้ มีความแตกต่างจากชุดตรวจสำเร็จรูปของเชื้อ SCMV ในข้าวโพดและข้าวฟ่าง (Chiemsombat *et al.*, 2010) ซึ่งมีบัฟเฟอร์ที่ใช้บดใบพืชได้ 2 ชนิด ได้แก่ ELISA extraction buffer จากบริษัท Agdia ที่ให้ผลการตรวจสอบดีที่สุด รองลงมาคือ general extraction buffer จากบริษัท Bioreba อ่านผลได้ภายในเวลา 3 นาที และตรวจพบเชื้อ SCMV ในน้ำคั้นใบข้าวฟ่างเป็นโรคที่เจือจางได้ถึง 1:1024 เท่า ทั้งนี้ประสิทธิภาพของชุดตรวจมีปัจจัยทั้งจากปริมาณไวรัสในใบพืช และคุณภาพของแอนติบอดีที่เตรียมขึ้นมาใช้งาน

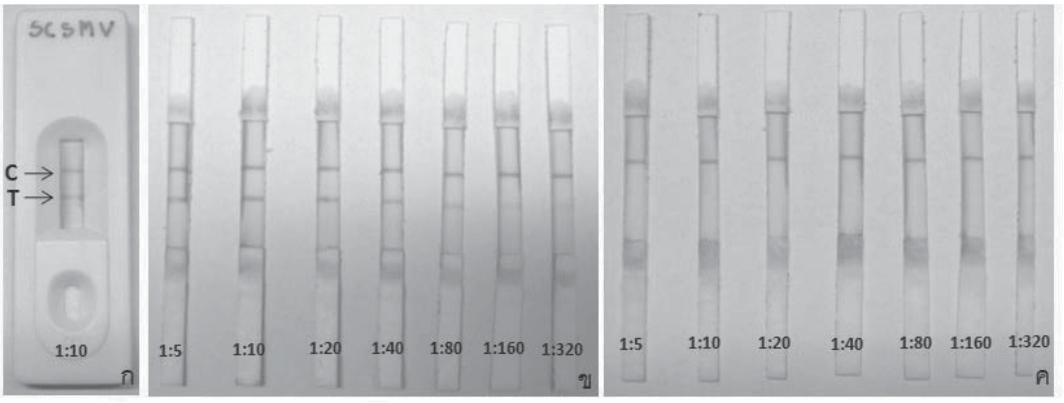
เส้นทางการสำรวจโรคใบด่างขีดอ้อยที่เกิดจากเชื้อ SCSMV ในแปลงเกษตรกร 6 แห่ง ใน อำเภอพนมทวน อำเภอบ่อพลอย อำเภอเมือง และ อำเภอด่านมะขามเตี้ย จังหวัดกาญจนบุรี ตามพิกัด GPS คิดเป็นระยะทางในการสำรวจทั้งสิ้น 270 กิโลเมตร (ภาพที่ 2ก) อาการของโรคที่พบในแปลงเกษตรกรและแปลงรวมพันธุ์มีความรุนแรงแตกต่างกันไปตามอายุของใบอ้อย กล่าวคือใบอ้อยบริเวณยอดส่วนใหญ่แสดงอาการด่างขีดสีเหลืองชัดเจน (ภาพที่ 2ข) ส่วนใบแก่บนต้นเดียวกันอาการไม่ชัดเจน ตัวอย่างอ้อยจากแปลงเกษตรกรรวม 98 ตัวอย่าง ตรวจพบเชื้อ 64 ตัวอย่าง คิดเป็นอัตรา 43.48-90.91% โดยพบโรคในอัตราสูงสุด 90.91% ที่ อำเภอด่านมะขามเตี้ย และอัตราต่ำสุด 43.48% ที่ อำเภอบ่อพลอย (ตารางที่ 2) อ้อยจากแปลงรวมพันธุ์ 98 ตัวอย่างจากอ้อย 63 พันธุ์ เป็นโรคในอัตรา 63.27% โดยพบเชื้อ 62 ตัวอย่างในอ้อย 42 พันธุ์ กลุ่มพันธุ์ UT (อู่ทอง) ได้แก่ UT3, UT10, UT11 และ UT13 มีต้นอ้อยที่แสดงอาการใบด่างขีดสีเหลืองจำนวนมาก สายพันธุ์อื่นๆ ที่ตรวจพบเชื้อ SCSMV ได้แก่ สายพันธุ์ ROC (ไต้หวัน) RT และ CP (สหรัฐอเมริกา) และ Q (ออสเตรเลีย) ส่วนสายพันธุ์ที่ตรวจไม่พบเชื้อ SCSMV ได้แก่ กลุ่มสายพันธุ์ CB (บราซิล) CHB ลูกผสมจีน-บราซิล และพันธุ์

การค้าต่างๆ ของไทย (ตารางที่ 3)

ในประเทศอินโดนีเซีย Putra *et al*. (2014) รายงานความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ SCSMV ที่ประเมินจากการทดลองปลูกเชื้อไวรัสด้วยวิธีกลให้กับอ้อยพันธุ์การค้า เช่น PS846, BL, PS862 และ PSJT941 พบว่าพันธุ์เหล่านี้มีความอ่อนแอต่อเชื้อ SCSMV และแสดงอาการอย่างรุนแรง เมื่อนำพันธุ์ PS846 มาทำการประเมินความเสียหายในสภาพแปลงพบว่าหากมีเชื้อ SCSMV เข้าทำลายอ้อยในแปลงมากกว่า 50% ผลผลิตอ้อยลดลงถึง 16 – 17% และผลผลิตน้ำตาลลดลง 19 – 21% สำหรับผลการสำรวจโรคในงานวิจัยนี้เป็นรายงานครั้งแรกที่พบว่าเชื้อ SCSMV มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางใน จังหวัดกาญจนบุรี ซึ่งจัดว่าเป็นพื้นที่ปลูกอ้อยที่สำคัญของประเทศไทย และแม้จะยังไม่มีการประเมินความเสียหายที่เกิดจากเชื้อ SCSMV หรือผลกระทบต่อผลผลิตอ้อย แต่ได้พบว่าพันธุ์อ้อยการค้าของไทยหลายพันธุ์มีความอ่อนแอต่อเชื้อ SCSMV จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อปรับปรุงพันธุ์อ้อยของไทยให้มีความต้านทานต่อโรคนี้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตรกำแพงแสน และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติสำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ และขอขอบคุณ รศ. ดร. รัตนา ตั้งวงศ์กิจ และ อ. อุดม เลียบวัน ที่ให้ความอนุเคราะห์สำรวจโรคในแปลงรวมพันธุ์อ้อยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอไทรโยค จังหวัดกาญจนบุรี



ภาพที่ 1 ผลการตรวจหาเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) ด้วยการใช้ immunochromatographic strip (ICS) (ก) น้ำคั้นใบอ้อยที่มีเชื้อ SCSMV (ข) น้ำคั้นใบอ้อยเป็นโรคที่เจือจางในอัตราส่วน 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 และ 1: 320 (ค) น้ำคั้นใบอ้อยปกติที่เจือจางเช่นเดียวกับใบอ้อยเป็นโรค

การแพร่กระจายของโรคใบด่างขีดอ้อยในแปลงปลูก

ภาพที่ 2 เส้นทางสำรวจโรคและลักษณะอาการของโรคใบด่างขีดอ้อยในจังหวัดกาญจนบุรี (ก) แผนที่สร้างจากพิกัด GPS ตามเส้นทางเก็บตัวอย่างอ้อย อำเภอพนมทวน (จุด 1 และ 2) อำเภอบ่อพลอย (จุด 3 และ 4) อำเภอเมือง (จุด 5) และอำเภอด่านมะขามเตี้ย (จุด 6) แปลงรวมพันธุ์อ้อยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอไทรโยค(จุด 7) (ข) อาการใบด่างขีดเหลืองที่เกิดจากเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* จากแปลงเกษตรกรอำเภอด่านมะขามเตี้ยเมื่อเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2555 (ซ้าย) และใบอ้อยพันธุ์ UT13 จากแปลงรวมพันธุ์อ้อยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอไทรโยค เมื่อเดือนตุลาคม พ.ศ.2557 (ขวา)

ตารางที่ 2 ผลการตรวจหาเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* ด้วยวิธี DAC-ELISA (ค่า A_{405}) จากตัวอย่างอ้อยในแปลงของเกษตรกร (FSC) ในจังหวัดกาญจนบุรี เมื่อเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2555 และในแปลงรวมพันธุ์อ้อยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (GKB) จังหวัดกาญจนบุรี เมื่อเดือนตุลาคม พ.ศ. 2557

รหัสแปลง	อำเภอ	จำนวนที่เก็บ	จำนวนที่พบเชื้อ	% พบโรค	ค่า A_{405}
FSCPA1	พนมทวน	21	12	57.14	0.375 – 0.998
FSCPA2	พนมทวน	19	14	73.69	0.382 – 1.513
FSCBP1	บ่อพลอย	23	10	43.48	0.509 – 1.108
FSCBP2	บ่อพลอย	10	8	80.00	0.609 – 0.909
FSCMK1	เมือง	14	10	71.43	0.394 – 0.806
FSCDT1	ด่านมะขามเตี้ย	11	10	90.91	0.376 – 1.134
GKB	ไทรโยค	98	62	63.27	0.277 – 1.106

ตารางที่ 3 รายชื่อพันธุ์อ้อยในแปลงรวมพันธุ์อ้อยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดกาญจนบุรี (GKB) ที่ตรวจพบและไม่พบเชื้อ *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV)

พันธุ์ที่พบเชื้อ SCSMV	94-2-105, 94-2-106, 99-2-294, 03-287, 03-208, 95-2-213, 194, K83-74, 294, K200, 135, K84-200, 03-2-395, 02-483, 395, UT3, 435, UT10, 477, UT11, 519, UT13, 352, RT2002-041, 527, RT2003-639, 1317, RT2007-027, RT2007-091, RT2001-1800, RT2003-619, RT2003-545, ROC1, ROC7, ROC16, Q85, CP29-166, CP63-588, CP385, CP48-103, LK92-11 และ Ehaew
พันธุ์ที่ไม่พบเชื้อ SCSMV	94-128, K03-109, K06-23, KK61, UT1, UT4, UT12, RT2004-077, RT07-068, RT01-1800, RT03-510, RT04-078, RT03-503, 254, 03-003, 85-2-352, Q229, CP29-221, CB1 (Brazil1), CB2 (Brazil2), CHB106-143 และ CHB06-3-3575

เอกสารอ้างอิง

Chiemsombat, P., R. Hongprayoon and A. Lar prom. 2010. Development of a simple strip test for rapid diagnosis of sugarcane mosaic virus infecting sweet corn in Thai land. Proc. the 1st International Conference on Corn and Sorghum Research and the 34th National Corn and Sorghum Research Conference, April 8-10, 2009. Chonburi, Thailand. p. 216-222.

Chatenet, M., C. Mazarin, J. C. Girard, E. Fermandez, D. Gargani, G. P. Rao, M. Royer, B. Lockhart and P. Rott. 2005. Detection of Sugarcane streak mosaic virus in sugarcane from several Asian countries. Sugarcane Intl. 23:12-15.

Damayanti, T. A. and K. L. Putra. 2011. First occurrence of Sugarcane streak mosaic virus infecting sugarcane in Indonesia. J. Gen. Plant Pathol. 77:72-74.

Gemechu, A. L., P. Chiemsombat, S. Attathom, K. Reanwarakorn and R. Letsruthaiyothin. 2006. Cloning and sequence anal ysis of coat protein gene of Sugarcane mosaic virus isolates from sugarcane and maize in Thailand. Arch. Virol. 151:167-172.

Hema, M., N. Kirthi, P. Sreenivasulu and H. S. Savithri. 2003. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR for detection and discrimina tion of Sugarcane streak mosaic virus isolates from Southern India. Arch. Virol.148:1185-1193.

Jaisil, P. 2014. Performing output costing of cane production and knowledge transfer for cost reduction in production years 2014/15. Handbook: Training Course for Farmers supported by Office of the cane

and sugar board (OCSB Thailand). Khon Kaen University. 211 p. (In Thai).

Kasemsin, P., P. Chiemsombat and R. Hongprayoon. 2011. New virus disease of sugarcane in Thailand caused by Sugar cane streak mosaic virus. The NRCT-Proceedings of Thailand Research Expo 2011. August 26-30, 2011. Bangkok Convention Center at Central World, Bangkok, Thailand. (In Thai).

Putra, L. K., A. Kristini, E. M. Achadian and T. A. Damayanti. 2014. Sugarcane streak mosaic virus in Indonesia: distribution, characterization, yield losses and management approaches. Sugar Tech. 16:392-399.

Xu, D. L., G. H. Zhou, Y. J. Xie and R. Mock. 2010. Complete nucleotide sequence and taxonomy of Sugarcane streak mosaic virus, member of a novel genus in the family Potyviridae. Virus Genes. 40:432-439.