รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง

เทคนิคการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทาน
โรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว

VIRUS DETECTION TECHNIQUE FOR SCREENING OF YELLOW MOSAIC DISEASE RESISTANT VARIETY IN OKRA

อยู่ภายใต้ชุดโครงการ : การวิจัยและพัฒนากระเจี๊ยบเขียว

โดย

วรวรรณ ชาลีพรหม วิชชา ชาลีพรหม ฉันทนา วิชรัตน์

2549

รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง เทคนิคการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว

VIRUS DETECTION TECHNIQUE FOR SCREENING OF YELLOW MOSAIC DISEASE RESISTANT VARIETY IN OKRA

อยู่ภายใต้ชุดโครงการ การวิจัยและพัฒนากระเจี๊ยบเขียว

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2549

จำนวน 348,120 บาท

หัวหน้าโครงการ นางวรวรรณ ชาลีพรหม

ผู้ร่วมโครงการ นายวิชชา ชาลีพรหม

นางจันทนา วิชรัตน์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

15 กันยายน 2549

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปี 2548 - 2549

ขอขอบคุณผู้ร่วมงานและเจ้าหน้าที่ชุดโครงการวิจัย การวิจัยและพัฒนากระเจี๊ยบเขียว มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คุณสุรภี กีรติยะอังกูร กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ที่ได้ช่วยเหลือในการตรวจสอบด้วยวิธี GLIFT และดร. อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ และเจ้าหน้าที่หน่วยปฏิบัติการพันธุวิศวกรรมด้านพืช ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ได้มีส่วนสนับสนุนให้คำแนะนำและช่วยเหลืออย่างดียิ่งจนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
สารบัญภาพ	(ก)
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	9
ผลการวิจัย	13
วิจารณ์ผลการวิจัย	14
สรุปผลการวิจัย	15
เอกสารอ้างอิง	16

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบ GLIFT	11
2	การตรวจสอบเชื้อ OYVV ด้วยวิธี GLIFT	13

เทคนิคการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว

VIRUS DETECTION TECHNIQUE FOR SCREENING OF YELLOW VEIN MOSAIC DISEASE RESISTANT VARIETY IN OKRA

วรวรรณ ชาลีพรหม[1/] **วิชชา ชาลีพรหม**[1/] **ฉันทนา วิชรัตน์**[2]

WORAWAN CHALEEPROM WITCHA CHALEEPROM CHANTANA WITCHARATANA

[1/]ภาควิชาอารักขาพืช

[2/]ภาควิชาพืชสวน

คณะผลิตกรรมการเกษตร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธี gold labeling IgG flow test (GLIFT) เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ *Okra yellow vein virus* (OYVV) จากน้ำคั้นใบกระเจี๊ยบเขียวที่เป็นโรคเส้นใบเหลือง โดยอาศัยหลักการทางอิมมูโนวิทยาและการไหลของปฏิกิริยาแบบ capillary ด้วยการใช้อนุภาคของ colloidal gold มา conjugate กับ IgG ของเชื้อ OYVV ผลการทดลองพบว่า เกิดแถบสีของ test line และ control line ชัดเจน แต่เมื่อนำมาผลิตชุด GLIFT โดยใช้อุปกรณ์ในเชิงพาณิชย์ ยังพบว่ามีปัญหา ให้ผลไม่แม่นยำ ปัญหานี้จะต้องหาแนวทางแก้ไขต่อไป

ABSTRACT

Development of gold labeling IgG flow test (GLIFT) for detection of *Okra yellow vein virus* (OYVV) from plant sap of yellow vein diseased leaf based on immunological methods and the flowing of the reaction by capillary. Colloidal gold was conjugated with OYVV IgG, it showed that GLIFT produced good results showing the sharp bands on the test line and control line clearly. However in attempts to produce the GLIFT kit in large scale by using the commercial equipments, still had the problems so far, the results were inaccurate and inconsistency. These problems should be solved later.

คำนำ

ประเทศไทยเริ่มส่งออกฝักกระเจี๊ยบเขียวไปขายยังต่างประเทศตั้งแต่ปี 2526 ได้แก่ ประเทศญี่ปุ่น ออสเตรเลีย สหรัฐอเมริกา และหลายประเทศในทวีปยุโรปและเอเชีย ในรูปฝักสดและแช่แข็ง ในปี 2544 มีปริมาณการส่งออกกระเจี๊ยบเขียวสูงถึง 5949 ตัน ซึ่งนับเป็นมูลค่าการส่งออกอันดับ 1 ของพืชผัก แต่หลังจากนั้นปริมาณการส่งออกก็ลดลง ปี 2543 มีปริมาณการส่งออกเพียง 2958 ตัน ซึ่งเป็นปริมาณที่ลดลงถึงร้อยละ 50.27 สาเหตุที่สำคัญที่ทำให้ปริมาณการส่งออกลดลง ทั้งๆ ที่ตลาดมีความต้องการสูง เนื่องจากมีการระบาดของโรคเส้นใบเหลือง (yellow vein disease) ซึ่งพบตั้งแต่ปี 2538 เป็นต้นมา ซึ่งปัญหานี้เกิดผลกระทบอย่างมากต่อการผลิตประเจี๊ยบเขียวเพื่อการส่งออก ทำให้ประเทศไทยสูญเสียศักยภาพทางการผลิต และโอกาสทางการส่งออก (อำนวย, 2547) แต่อย่างไรก็ตามกระเจี๊ยบเขียวยังเป็นที่ต้องการของตลาดต่างประเทศ ซึ่งเห็นได้จากการส่งออก ในปี 2544, 2545 และ 2546 มีปริมาณการส่งออกนับเป็นมูลค่า 314,253,670, 428,059,470 และ 314,072,567 บาท ตามลำดับ ซึ่งจำเป็นต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวให้ต้านทานโรคเส้นใบเหลืองต่อไป

ในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2538 – 2541 มีรายงานการแพร่ระบาดอย่างรุนแรงของโรคเส้นใบเหลืองในกระเจี๊ยบเขียว ทำให้ฝักกระเจี๊ยบเขียวมีสีเหลือง และคุณภาพของฝักด้อยลง ซึ่งทำให้ไม่สามารถส่งไปขายยังตลาดต่างประเทศได้ เป็นเหตุให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก จากการศึกษาเชื้อสาเหตุของโรคดังกล่าวพบว่าเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่ม *Geminivirus* และสามารถถ่ายทอดโรคได้โดยแมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เชื้อ *Geminivirus* ที่เป็นสาเหตุโรคมีพืชอาศัยค่อนข้างกว้างพบพืช จำนวน 21 ชนิด ใน 7 วงศ์ แสดงอาการในลักษณะต่างๆ กันไปเมื่อได้รับการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงหวี่ขาว พบโรคเส้นใบเหลืองแพร่ระบาดอย่างรุนแรงในทุกๆ พื้นที่ปลูกกระเจี๊ยบเขียว โดยเฉพาะจังหวัดในภาคเหนือ และภาคกลางซึ่งเป็นแหล่งปลูกกระเจี๊ยบเขียวเพื่อการค้าที่สำคัญของประเทศไทย (อรวรรณ, 2545)

โรคเส้นใบเหลืองทำให้กระเจี๊ยบเขียวแสดงอาการต่างเส้นใบเหลือง ยอดเหลือง ใบ และยอดม้วนงอ ฝักมีสีเหลือง และต้นเตี้ยแคระแกรนเมื่อเป็นโรครุนแรง โรคนี้พบระบาดเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ.2538/2539 ในแหล่งผลิตกระเจี๊ยบเขียวเพื่อการส่งออกไปยังประเทศญี่ปุ่นในเขตจังหวัดราชบุรี นครปฐม และอ่างทอง ทำให้ผลผลิตส่งออกในปี พ.ศ.2538 สูญเสียร้อยละ 50 (เครือพันธุ์ และคณะ, 2544)

ในช่วงระหว่างปี พ.ศ.2538 – 2541 มีรายงานการแพร่ระบาดอย่างรุนแรงของโรคเส้นใบเหลืองในกระเจี๊ยบเขียว ทำให้ฝักกระเจี๊ยบเขียวมีสีเหลือง ซึ่งทำให้ไม่สามารถส่งไปขายยังตลาดต่างประเทศได้ เป็นเหตุให้เกษตรกรสูญเสียรายได้เป็นจำนวนมาก อาการที่พบบนใบคือลักษณะเส้นใบเหลือง

ในต่างประเทศมีรายงานเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว คือ *Bhendi yellow vein mosaic bigeminivirus* (Brunt *et al.*,1996) หรือ *Bhendi yellow vein mosaic* virus (Brunt *et al.*,1996) หรือ *Okra yellow vein virus* (OYVV) จัดอยู่ใน Family *Geminiviridae*, Genus *Begomovirus* มีอนุภาคเป็นแบบ ssDNA Jose และ Usha (2003) รายงานว่า Bhendi yellow vein mosaic disease (BYVMD) เกิดจาก monopartite *Begomovirus* คือ *Bhendi yellow vein mosaic virus* (BYVMV) ร่วมกับ satellite DNA β component ขนาดเล็ก โดย BYVMV ทำให้เกิดอาการ mild leaf curling ส่วน DNA β component ทำให้เกิดอาการ BYVMD โดยได้ตรวจพบ DNA β component ในกระเจี๊ยบเขียวที่แสดงอาการโรคเส้นใบเหลือง (BYVMD) เช่นเดียวกับที่มีรายงานในโรคเส้นใบเหลืองของ ageratum และโรคใบหงิกของฝ้าย และจากรายงานใน The Universal Virus Database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTVdB Virus Descriptions) (ICTVdB, 2005) ได้สรุปคุณสมบัติของ OYVV มีอนุภาคขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ nucleocapsid geminate ขนาด 15-18 nm และ dimer มีความยาว 30 nm สามารถทำปฏิกิริยากับแอนติซีรัมของเชื้อ *African cassava mosaic virus* ทำให้เกิดอาการ vein clearing และต่อมาทำให้เส้นใบเหลือง (yellowing) และ เส้นใบหนา (thickening) ทำให้ใบเหลือง ใบและฝักมีขนาดเล็กลง และทำให้ลำต้นแคระแกรน พืชอาศัยที่จัดเป็น susceptible host ในวงศ์ Malvaceae คือ กระเจี๊ยบเขียว *(Abelmoschus esculentus)* และ *Althaea rosea* นอกจากนี้ Donald Danforth Plant Sceince Center (2005) ได้รายงาน genome sequence ของส่วนประกอบต่างๆ ของอนุภาคไวรัสที่พบในกระเจี๊ยบเขียว คือ *Okra enation virus* (OkEV), *Okra mosaic Mexico virus* (OkMMV) และ *Okra yellow vein mosaic virus* (OYVMV) และจากNCBI ได้รายงาน genome sequence ของ BYVMV

ในการควบคุมโรคพืชให้ได้ผลดีจะต้องอาศัยการวินิจฉัยโรคที่รวดเร็ว และถูกต้องแม่นยำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อไวรัส เป็นสาเหตุโรคที่ยากต่อการวินิจฉัยด้วยสายตาหรือวิธีการง่ายๆ ต้องใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการตรวจสอบหลายขั้นตอนและใช้เวลาหลายวัน หรือบางครั้งนาน

เป็นเดือน นอกจากนั้นการตรวจวินิจฉัยที่มีประสิทธิภาพยังมีความสำคัญมากในการคัดเลือกพันธุ์พืชต้านทานต่อไวรัส ปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสของพืช ได้แก่ วิธีการทางอิมมูโนวิทยา (immunological detection) วิธี nucleic acid hybridization assay และวิธี PCR (polymerase chain reaction) (Czosnek *et.al.*, 1988; Martin, 1998; Navot *et.al.* 1992) โดยแต่ละวิธีมีข้อเด่นและข้อด้อยแตกต่างกันไป การตรวจสอบและวินิจฉัยโรคไวรัสของพืชให้ถูกต้องแม่นยำ อาจต้องใช้วิธีตรวจสอบหลายวิธีร่วมกัน (Pico *et.al.*,1999)

สำหรับวิธีการตรวจวินิจฉัยไวรัสของพืชโดยวิธีทางอิมมูโนวิทยา ใช้หลักการจับกันอย่างจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากสำหรับการตรวจวินิจฉัยไวรัสของพืช โดยเฉพาะวิธี ELISA และ dot blot analysis ที่สามารถตรวจสอบตัวอย่างได้คราวละมากๆ เป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก ทำได้รวดเร็ว (Halk *et.al.*, 1985) ในกรณีที่มีแอนติบอดีที่ดีจะสามารถพัฒนาเป็นวิธีที่มีความไวและความจำเพาะสูง

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยวิธี lateral flow test อย่างกว้างขวาง ซึ่งสามารถตรวจสอบได้อย่างรวดเร็ว แม่นยำ และค่าใช้จ่ายไม่สูง (Al-Yousif *et al*, 2002; Salomone and Roggero, 2002; Weiss, 1999) เช่น Pocket Diagnostic ซึ่งกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา (USDA) แนะนำให้ใช้ตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย *Ralstonia solanaceareum* สาเหตุโรคเหี่ยวของพืช pelargonium ในประเทศอังกฤษได้นำมาใช้ สำหรับตรวจสอบเชื้อ *Beet necrotic yellow vein virus* สาเหตุโรค rhizomania หรือ root madness และในประเทศสเปนได้นำมาใช้ตรวจสอบพันธุ์พริกเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานต่อเชื้อ *Tomato spotted wilt virus*

ในประเทศไทย สุรภีและคณะ (2547) ได้พัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อ *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) และ *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) ในกล้วยไม้ ด้วยวิธี gold labeling IgG flow test (GLIFT) ซึ่งสะดวกในการตรวจสอบ ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ใช้เวลาเพียง 3-5 นาที ค่าใช้จ่ายน้อยในการตรวจสอบ และเกษตรกรสามารถตรวจสอบได้เอง

ดังนั้นในโครงการวิจัยเทคนิคการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT สำหรับเชื้อ OYVV ให้มีความถูกต้อง แม่นยำ สะดวก รวดเร็วและง่ายต่อการนำไปใช้ โดยผู้ใช้สามารถนำไปตรวจสอบได้เอง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวสำหรับการคัดเลือกพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่ต้านทานต่อโรคเส้นใบเหลือง และการตรวจสอบคุณภาพกระเจี๊ยบเขียวเพื่อการส่งออก ซึ่งจะเป็นการสร้างความเชื่อมั่นให้แก่ผู้ส่งออกกระเจี๊ยบเขียว และผู้ซื้อในต่างประเทศด้วย

สำหรับงานวิจัยในโครงการวิจัยเทคนิคการตรวจสอบเชื้อไวรัสเพื่อคัดเลือกพันธุ์ต้านทานโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว แบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ ปีงบประมาณ 2544-2547 และ 2548-2549 และสรุปงานวิจัยที่ผ่านมาได้ดังนี้

ปี 2544

1. การสำรวจโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว

การสำรวจโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว ในแปลงทดสอบพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่แปลงทดลองสาขาพืชผัก ภาควิชาพืชสวน คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2544 ทั้ง 2 ฤดูปลูก พบว่ามีพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวแสดงอาการเป็นโรคตั้งแต่ 0 -100%

2. การตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว ด้วยวิธี PCR

โดยการเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัส (coat protein gene) โดยใช้ไพรเมอร์ CPA2 และ CPA5 เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี agarose gel electrophoresis พบขนาดของแถบดีเอ็นเอประมาณ 700 คู่เบส

ปี 2545

1.การทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว (*Okra yellow vein virus*, OYVV) โดยแมลงหวี่ขาว

พบว่าเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว (OYVV) สามารถถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาว (whitefly, *Bemisia tabaci*)

2.การตรวจวินิจฉัยโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียวด้วย DNA probe

ตรวจสอบโรคเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียว โดยใช้ DNA probe ที่สังเคราะห์จากส่วน component A ของเชื้อไวรัสใบหงิกเหลืองของมะเขือเทศ (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) ซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่มเจมินีไวรัส (*Geminivirus* group) ซึ่งมี homology ต่อ *Geminivirus* สูงถึง 90% หรือมากกว่า ด้วยวิธีที่ใช้ตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสใบยอดย่นของถั่วเหลือง (พิสสวรรณและคณะ, 2537) และติดฉลากดีเอ็นเอแบบสุ่ม (random-primed oligonucleotide labeling)

โดยใช้สารไร้กัมมันตรังสีไดกอกซิเจนิน (digoxigenin, Boehringer Mannheim) และใช้ดีเอ็นเอของเชื้อ TYLCV เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ probe (Chiemsombat และคณะ, 1996) จากนั้นตรวจสอบเชื้อไวรัสบนแผ่น nitrocellulose membrane โดยใช้เทคนิคการจับคู่ของกรดนิวคลิอิก (nucleic acid hybridization)

พบว่าไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ OYVV ได้อย่างสม่ำเสมอ (consistency) ในทุกครั้ง ทำให้เกิดความไม่แม่นยำ (inaccuracy) ในการตรวจสอบ แม้ว่า DNA probe ของเชื้อ TYLCV จากส่วน component A มี homology ต่อ *Geminivirus* สูงถึง 90% หรือมากกว่า ซึ่งจากรายงานของพิสสวรรณและคณะ (2537) สามารถใช้ตรวจสอบหาเชื้อ *Geminivirus* ได้แทบทุกชนิด แต่มีปัญหาใหญ่ที่พบในการตรวจสอบนี้คือ ปัญหาในการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ จากใบกระเจี๊ยบเขียว ซึ่งไม่สามารถกำจัดสารเมือกจากใบกระเจี๊ยบเขียวได้หมด ซึ่งทำให้รบกวนหรือยับยั้ง (inhibit) ปฏิกิริยา จึงต้องมีการพัฒนาวิธีการเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอ เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบให้เหมาะสม โดยการพยายามกำจัดสารเมือก ซึ่งจะทำให้สามารถอ่านผลของปฏิกิริยาได้ถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น

3.การศึกษาวิธีการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว (OYVV) และนำมาตรวจสอบด้วยวิธี PCR

3.1.การเตรียมตัวอย่างใบกระเจี๊ยบเขียวเพื่อการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส OYVV

วิธีการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อไวรัส OYVV ดัดแปลงจากวิธีการของ Jose และ Usha (2003) และวรวรรณ และคณะ (2544)

พบว่าปัญหาสารเมือกและสารประกอบ polyphenol น้อยลง และเมื่อนำดีเอ็นเอ มาเพิ่มปริมาณด้วยวิธี PCR โดยใช้ไพรเมอร์ CPA2 และ CPA5 สามารถเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ OYVV มีขนาดของดีเอ็นเอ ประมาณ 700 คู่เบส

4.การตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองด้วยวิธี Dot Blot Immuno Assay (DIBA)

การนำโมโนโคลนอลแอนติบอดี D_2 ของเชื้อ *Geminivirus* มาทำ cross absorption กับน้ำคั้นจากกระเจี๊ยบเขียวปกติ เพื่อลดการทำปฏิกิริยาข้าม (cross reaction) ของแอนติบอดีกับกระเจี๊ยบเขียวปกติก่อนที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อ OYVV ใช้อัตราส่วนแอนติบอดี 1:1,000 ใน TBST ที่มี skimmed milk และใช้น้ำคั้นของกระเจี๊ยบเขียวในอัตราส่วน 1:1 ใน extraction buffer ได้ผล positive แต่มี background ขึ้นมารบกวนปฏิกิริยา ทำให้การอ่านค่าด้วยตาเปล่าไม่ชัดเจนนัก

ปี 2546

การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ OYVV

ผลิตโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein, CP) ของเชื้อ OYVV ในระบบ เซลล์แบคทีเรีย โดยการเชื่อมต่อยีนห่อหุ้มอนุภาค (*CP* gene) เข้ากับ protein expression vector (pQE30) แล้วศึกษาการแสดงออกของยีนในเซลล์ *E. coli* สายพันธุ์ M15 ซึ่งพบว่าเซลล์แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิต CP ของเชื้อ OYVV ขนาด 32 กิโลดาลตัน เมื่อชักนำเซลล์ด้วย IPTG และนำไปฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองเพื่อผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ OYVV โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ ต้องทำการ cross absorption กับน้ำคั้นจากกระเจี๊ยบเขียวปกติ เพื่อลดการทำปฏิกิริยาข้ามของแอนติบอดีกับกระเจี๊ยบเขียวปกติ ก่อนที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว ด้วยวิธี ELISA และ DIBA ต่อไป

ปี 2547

การตรวจสอบเชื้อ OYVV ด้วยวิธี ELISA และ DIBA

นำโพลีโคลนอลแอนติบอดีของโปรตีนหุ่อหุ้มอนุภาคของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียว (OYVV-CP) มาตรวจสอบเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียวด้วยวิธี ELISA ทั้งแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองด้วยวิธีการฉีดเข้าระหว่างชั้นของผิวหนังและแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลัง ใช้ในอัตราส่วน 1:500 ในส่วนของการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียวด้วยวิธี dot blot immunoassay โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองด้วยวิธีการฉีดเข้าระหว่างชั้นของผิวหนัง ใช้อัตราส่วน 1: 4,000 ส่วน โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ได้จากการฉีดกระตุ้นกระต่ายทดลองด้วยวิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณต้นขาหลัง ใช้อัตราส่วน 1: 6,000 ให้ผลการทดลองที่ชัดเจน ซึ่งผลการวิจัยนี้พบว่าโพลีโคนอลแอนติบอดีที่ผลิตได้ สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ OYVV ในกระเจี๊ยบเขียวด้วยวิธี Indirect-ELISA และ DIBA ได้ดี

ปี 2548

การตรวจสอบเชื้อ OYVV โดยใช้ DNA probe

ตรวจวินิจฉัยโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียวโดยใช้ DNA probe ที่สังเคราะห์จากส่วนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ของเชื้อ OYVV สามารถตรวจสอบโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียวได้อย่างน่าพอใจ เทคนิคการตรวจสอบนี้สามารถนำไปใช้ตรวจสอบเพื่อคัดเลือกพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่ต้านทานต่อโรคเส้นใบเหลืองได้

นอกจากงานที่ได้กล่าวมาแล้ว ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมจากที่ได้เสนอโครงการวิจัย คือ การตรวจสอบพืชอาศัยของเชื้อ OYVV ในบริเวณใกล้เคียงกับแปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียว โดยวิธี ELISA ด้วยโพลีโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ OYVV พบพืช 19 ชนิดใน 14 Family เป็นพืชอาศัยของเชื้อ OYVV คือ บานชื่น เทียนนา สัก โหระพา รางจืด หญ้าขน เยอบีรา ดอกกระดาษ กระเม็ง ผักบุ้ง ไม้กวาด เจตมูลเพลิงแดง น้อยหน่า หมากเหลืองหมากแดง ฟอร์เกทมีนอท (forget -me-not) ผักเผ็ดแม้ว สตอเบอรี่ สาบแร้งสาบกา และคราดหัวแหวน ผลจากการตรวจสอบพืชอาศัยของเชื้อ OYVV จะทำให้ผู้ปลูกกระเจี๊ยบเขียวได้เฝ้าระวัง ตรวจดูแปลง และทำลายพืชอาศัย เพื่อเป็นการลดแหล่งของเชื้อ OYVV และลดการแพร่ระบาดของโรคเส้นใบเหลืองในแปลงปลูกกระเจี๊ยบเขียว ซึ่งจะทำให้การควบคุมโรคเส้นใบเหลืองของกระเจี๊ยบเขียวได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังสามารถลดความสูญเสียจากโรคเส้นใบเหลืองได้ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

การตรวจสอบเชื้อ OYVV โดยวิธี GLIFT ซึ่งดัดแปลงจาก สุรภี และคณะ (2547) ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การสกัด IgG ของเชื้อ OYVV

นำแอนติซีรัมของเชื้อ OYVV มาผสมให้เจือจางด้วยด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:9 (ปริมาตร/ปริมาตร) แล้วเติมสารละลาย ammonium sulphate ที่อิ่มตัวลงไปในปริมาตรที่เท่ากับสารละลาย นำแอนติซีรัมที่เจือจางนี้ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อตกตะกอน ละลายตะกอนด้วย phosphate buffer saline ความเข้มข้นครึ่งเท่า (1/2 PBS) แล้ว dialyse ใน PBS ครั้งละ 1 ลิตร นาน 4 ชั่วโมง

จำนวน 3 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วยเครื่อง spectrophotometer แล้วนำ IgG ความเข้มข้น 1mg/ml ไปใช้ตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

2. การ conjugate IgG กับ colloidal gold

2.1 เตรียม colloidal gold จาก chloroauric acid (gold chloride, $HAuCl_4$) ผสมกับ sodium citrate เพื่อให้ได้อนุภาคของทองที่บริสุทธิ์ และมีขนาดตามต้องการ ตามวิธีการของสุรภี และคณะ (2547) แล้วนำสารละลายของ colloidal gold ไปใช้ในการต่อเชื่อม (conjugate, label) กับ IgG ของ OYVV

2.2 การเตรียม gold labeling IgG

การต่อเชื่อม IgG ของเชื้อ OYVV เข้ากับ colloidal gold เป็น colloidal gold conjugated IgG หรือ gold labeling IgG โดยผสม IgG ของเชื้อ OYVV ที่มีความเข้มข้นของ IgG 1 mg/ml กับ colloidal gold แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที เพื่อตกตะกอน colloidal gold conjugated IgG และละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ passive gold diluent (สุรภี และคณะ, 2547) ซึ่งควรเตรียมแล้วใช้ทันที

2.3 การเตรียม conjugate release pad (CRP) หยด gold labeling IgG ของเชื้อ OYVV ลงบนแผ่น CRP ซึ่งเป็นวัสดุใยแก้ว (fiber glass) ปริมาณ 1.0 µl/cm และเตรียม CRP ของเส้น control line ด้วยการใช้ gold labeling IgG ของ rabbit IgG ในปริมาตร 0.5 µl แล้วนำไปอบแห้งในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (สุรภี และคณะ, 2547) แล้วนำ CRP ของ gold labeling IgG ของเชื้อ OYVV มาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.5 x 0.5 cm ก่อนนำไปประกอบเป็น strip และประกอบเป็นชุดตลับตรวจสอบต่อไป

3. การเตรียม test line

หยด IgG อัตรา 1µl/cm ลงบนแผ่น nitrocellulose membrane (NCM) โดยใช้ปลายของปากกาหมึกซึมขีดให้เป็นเส้นตรงซึ่งจะใช้เป็น test line วาง test line ให้อยู่ตรงกลางของแผ่น NCM และนำไปประกอบให้อยู่ตรงกลางของ strip

4. การทำ control line

ทำเส้นแสดงปฏิกิริยาควบคุม (control line) ของการตรวจสอบด้วยการหยด goat anti-rabbit (GAR) อัตรา 1µl/cm โดยใช้ปลายปากกาของหมึกซึมขีดลงบนแผ่น NCM ใน

ตำแหน่งห่างจาก test line ขึ้นไปด้านบนของ strip 0.5 cm ควรทำในเวลาเดียวกับการทำ test line แล้วนำไปอบให้แห้ง (สุรภี และคณะ, 2547) เช่นเดียวกับ conjugate release pad (CRP) control line ทำไว้เพื่อให้ใช้ gold labeling IgG ของ rabbit IgG ละลายออกมาแล้วไหลไปจับกับ control line เพื่อใช้เป็นการตรวจปฏิกิริยาการไหลของสารละลายที่ดี

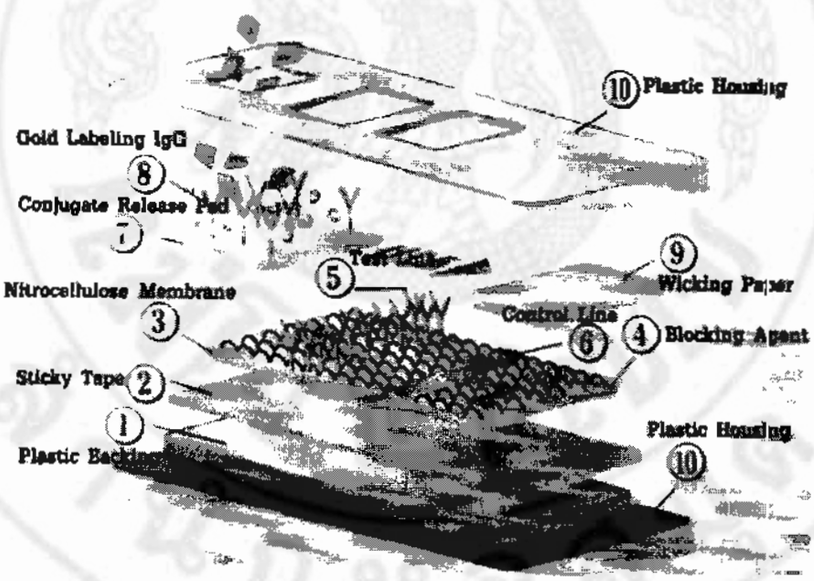
5. การประกอบ GLIFT เป็น strip และตลับตรวจสอบมีขั้นตอน (ภาพที่ 1) ดังนี้

5.1 วาง plastic backing polyester ที่ตัดให้มีขนาด 6x0.5 cm (หมายเลข 1)

5.2 วางกระดาษกาว 2 หน้า มีขนาดเท่ากันลงบน plastic backing polyester หรือเลือกใช้ backing ที่มีกาวในตัวเพื่อทำหน้าที่เป็น adhesive (หมายเลข 2)

5.3 วางแผ่น NCM (หมายเลข 3) ที่ไม่เคลือบสาร blocking (หมายเลข 4) โดยวางให้ test line (หมายเลข 5) และ control line (หมายเลข 6) ลงบนกระดาษกาวอยู่ระหว่างกลางกระดาษ (backing)

5.4 วางแผ่น conjugate release pad ของทั้ง IgG ของ OYVV และ rabbit IgG ลงเรียงซ้อนกันทาบเกยบนปลายของแผ่น NCM เล็กน้อย (หมายเลข 7,8)



ภาพที่ 1 ส่วนประกอบของชุดตรวจสอบ GLIFT

5.5 ปิดทับ conjugate release pad ด้วยแผ่น sample pad ลงไปจนถึงปลายของแผ่น backing

5.6 วางแผ่น wicking paper พาดจากปลายด้านบนของแผ่น NCM ทาบไปจนสุดปลายของ backing (หมายเลข 9)

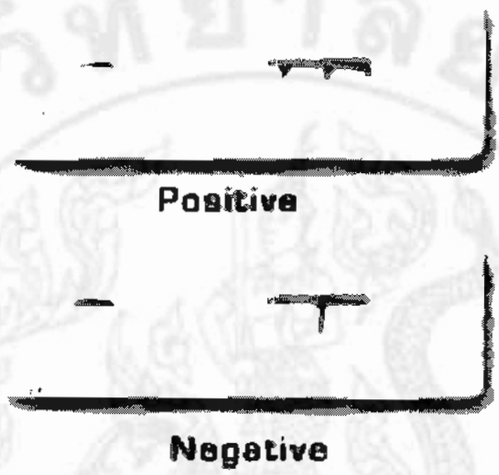
5.7 บรรจุ strip นี้ลงในตลับพลาสติก (หมายเลข 10)

6. การเตรียมตัวอย่างน้ำคั้นพืช

นำตัวอย่างกระเจี๊ยบเขียวที่เป็นโรคเส้นใบเหลือง จากตัวอย่างสด และตัวอย่างแห้ง (freeze dry) มาบดให้ละเอียดใน extraction buffer ที่ดัดแปลงจาก extraction buffer ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเชื้อ OYVV จากกระเจี๊ยบเขียวด้วยวิธี ELISA (วรวรรณ และคณะ, 25 47) โดยเติม sodium sulfite ลงไป 0.02 % จากนั้นเจือจางตัวอย่างน้ำคั้นพืช อัตรา 1:10 (ปริมาตร/ปริมาตร) เพื่อใช้เป็นตัวอย่างน้ำคั้นพืชในการตรวจสอบ หยดตัวอย่างน้ำคั้นพืช จำนวน 3 หยด ลงในตลับ GLIFT แล้วตรวจผลของปฏิกิริยาภายในเวลา 5 นาที

ผลการทดลอง

จากการทดสอบตรวจสอบเชื้อ OYVV โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ OYVV ที่ผลิตจากส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ OYVV ที่ผลิตได้ มาทดสอบด้วยวิธี GLIFT พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ OYVV จากตัวอย่างใบกระเจี๊ยบเขียวที่เป็นโรคเส้นใบเหลืองทั้งจากตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้ง พบว่าสามารถตรวจสอบเชื้อ OYVV ได้ผลดี โดยเกิดแถบสีของ test line และ control line อย่างชัดเจน ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 การตรวจสอบเชื้อ OYVV ด้วยวิธี GLIFT

จากนั้นได้นำไปทดสอบหาแนวทางในการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT ของเชื้อ OYVV ในปริมาณมาก (large scale) เพื่อนำไปตรวจสอบตัวอย่างกระเจี๊ยบเขียว ที่มีตัวอย่างจำนวนมากขึ้น ใช้ในการตรวจสอบเพื่อคัดพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวที่ต้านทานต่อโรคเส้นใบเหลือง และตรวจสอบฝักกระเจี๊ยบเขียวในการส่งออก ซึ่งในขั้นตอนการตรวจสอบนี้ ใช้สารเคมี และวัสดุต่างๆ เช่นเดียวกันกับที่ได้ทดลองในเบื้องต้น แต่ต่างกันที่ใช้เครื่องจักรสำหรับฉีดพ่น (spray) conjugate release pad IgG ของเชื้อ OYVV, control line และ test line และใช้เครื่องตัดแผ่น strip แบบอัตโนมัติที่สามารถควบคุมขนาดที่ตัดได้สม่ำเสมอ และบรรจุในตลับพลาสติก ปรากฏว่ามีปัญหาในการตรวจสอบ ซึ่งผลการตรวจสอบตัวอย่างที่ใช้เป็น positive control ได้ผลไม่แน่นอน ทำให้เกิดความไม่แม่นยำในการตรวจสอบ ซึ่งในขั้นนี้ยังไม่สามารถแก้ปัญหาได้

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการตรวจสอบเชื้อ OYVV ด้วยวิธี GLIFT ซึ่งใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ OYVV ที่ผลิตได้พบว่าในการตรวจสอบที่มีตัวอย่างจำนวนน้อย โดยประกอบชุด GLIFT ด้วยมือได้ผลดี แต่เมื่อนำไปผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT ในปริมาณมาก โดยใช้เครื่องจักรในเชิงพาณิชย์ และนำมาทดสอบกับตัวอย่างเชื้อ OYVV พบปัญหาหลายอย่าง ไม่สามารถตรวจสอบเชื้อ OYVV จากตัวอย่างได้อย่างแม่นยำ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก

1. ปริมาณ conjugated IgG บน release pad เมื่อนำ conjugated IgG ไป spray ด้วยเครื่องปริมาณของ conjugated IgG อาจจะจับกับ nitrocellulose membrane ในปริมาณที่น้อย จึงทำให้ไม่พอเพียงที่จะจับกับอนุภาคของเชื้อ OYVV ในตัวอย่างน้ำคั้นพืช จึงไม่สามารถแสดงแถบปฏิกิริยาให้เห็นด้วยตาได้ หรือผลออกมาไม่คงที่ และบางครั้งพบเกิด false positive ขึ้นด้วย ทำให้ผลการตรวจสอบไม่มีความแม่นยำ

2. สารเมือกในน้ำคั้นตัวอย่างกระเจี๊ยบเขียวที่ได้จากการบดตัวอย่างใบกระเจี๊ยบเขียวที่เป็นโรค ทำให้น้ำคั้นไม่สามารถซึมผ่านแผ่น nitrocellulose membrane ได้ หรือการซึมผ่านได้ช้ามาก ทำให้การจับของ conjugated IgG กับอนุภาคของเชื้อ OYVV เกิดขึ้นได้น้อย ไม่พอเพียงที่จะแสดงปฏิกิริยาให้เห็นด้วยตา แม้ว่าได้พยายามทำให้น้ำคั้นตัวอย่างกระเจี๊ยบเขียวเจือจางลง เพื่อทำให้น้ำคั้นสามารถซึมผ่าน nitrocellulose membrane ได้ แต่การทำให้น้ำคั้นใบกระเจี๊ยบเขียวเจือจางลงมากๆ ก็ยิ่งทำให้จำนวนอนุภาคของเชื้อ OYVV ในน้ำคั้นลดลง ซึ่งในธรรมชาติจะพบเชื้อ OYVV ในพืชในปริมาณที่น้อยอยู่แล้ว จึงทำให้ปริมาณอนุภาคของเชื้อ OYVV ไม่พอที่จะทำปฏิกิริยากับ conjugated IgG

3. จากเหตุผลในด้านปริมาณของ conjugated IgG (ข้อ. 1) และอนุภาคของเชื้อ OYVV ในน้ำคั้นใบกระเจี๊ยบเขียว (ข้อ. 2) ซึ่งทำหน้าที่เป็น antigen ซึ่งมีปริมาณที่ต่ำมากจนไม่อยู่ในสัดส่วนที่พอเหมาะสำหรับทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ ทำให้ผลการตรวจสอบไม่สามารถแสดงปฏิกิริยาให้เห็นด้วยตาได้

4. ปัจจัยอื่นๆ ที่ควรระมัดระวังในการทำ GLIFT ได้แก่ ความชื้น และระยะเวลาในการเก็บชุดตรวจสอบ GLIFT เช่น ควรเก็บตลับ GLIFT ในที่ที่ไม่มีความชื้น เช่น ในซองอลูมิเนียมฟอยล์ที่ปิดสนิท และไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 6 เดือน ซึ่งถ้าหากตลับ GLIFT มีความชื้นจะทำให้เกิดผล false positive ใน test line หรือไม่เกิดปฏิกิริยาในช่องของ test line และ control line

สรุปผลการวิจัย

การตรวจสอบเชื้อ OYVV โดยใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีของเชื้อ OYVV ที่ผลิตจากส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ OYVV ที่ผลิตได้ ด้วยวิธี GLIFT พบว่า สามารถตรวจสอบเชื้อ OYVV จากตัวอย่างใบกระเจี๊ยบเขียวที่เป็นโรคเส้นใบเหลืองทั้งจากตัวอย่างสดและตัวอย่างแห้งได้ผลดี แต่เมื่อได้นำไปทดสอบหาแนวทางในการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT ของเชื้อ OYVV ในปริมาณมาก (large scale) เพื่อนำไปตรวจสอบตัวอย่างกระเจี๊ยบเขียว ที่มีตัวอย่างจำนวนมากขึ้น ซึ่งในขั้นตอนการตรวจสอบนี้ ใช้สารเคมี และวัสดุต่างๆ เช่นเดียวกันกับที่ได้ทดลองในเบื้องต้น แต่ต่างกันที่ใช้เครื่องจักรสำหรับฉีดพ่น conjugate release pad IgG ของเชื้อ OYVV, control line และ test line และใช้เครื่องตัดแผ่น strip แบบอัตโนมัติที่สามารถควบคุมขนาดที่ตัดได้สม่ำเสมอ และบรรจุในตลับพลาสติก ปรากฏว่าพบปัญหา และอุปสรรคในการตรวจสอบ โดยผลการตรวจสอบตัวอย่างที่ใช้เป็น positive control ได้ผลไม่แน่นอน ซึ่งจะต้องหาแนวทาง เพื่อแก้ไขปัญหาในการพัฒนาชุดตรวจสอบ GLIFT ซึ่งถ้าหากสามารถแก้ไขปัญหาได้ก็จะสามารถผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT ได้เป็นจำนวนมากก็จะเป็นประโยชน์ในการตรวจสอบเชื้อ OYVV ในตัวอย่างจำนวนมาก ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์กระเจี๊ยบเขียวให้ต้านทานต่อโรคเส้นใบเหลือง นอกจากนี้เกษตรกร และผู้ส่งออกกระเจี๊ยบเขียวจะสามารถตรวจสอบได้ด้วยตนเอง โดยจะทราบผลภายในเวลา 3-5 นาที ซึ่งจะทำให้สะดวกรวดเร็ว และช่วยลดค่าใช้จ่ายในการตรวจสอบเชื้อ OYVV ซึ่งจะทำให้ผู้ปลูกกระเจี๊ยบเขียวสามารถผลิตฝักกระเจี๊ยบเขียวที่มีคุณภาพ ซึ่งจะทำให้เพิ่มมูลค่าของฝักกระเจี๊ยบเขียวอีกด้วย

ทั้งนี้ปัญหาต่างๆ ในการพัฒนาการผลิตชุดตรวจสอบ GLIFT ในระดับการผลิตในปริมาณที่มากขึ้น จะต้องใช้ระยะเวลา และเงินสนับสนุนในการทำวิจัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์, อรประไพ คชนันท์, สุวรรณา กลัดพันธ์, อำนวย อรรถลังรอง, วไลลักษณ์ แพทย์วิบูลย์ และจิราภา จอมไทสง. 2544. **สถานการณ์โรคเส้นใบเหลืองกระเจี๊ยบเขียว.** *ใน* รายงานเสนอในสัมมนาวิชาการเรื่อง "กระเจี๊ยบเขียวเพื่อการส่งออก" ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้ 26 ตุลาคม 2544. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.

พิสสวรรณ เจียมสมบัติ เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ นุชนาถ แซ่อึ้ง และพัชรินทร์ คงเปลี่ยน. 2537. **การตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสใบยอดถั่วเหลืองด้วยตีเอ็นเอตัวตรวจและเทคนิคโพลิเมอเรส เชน รีแอคชั่น.** *ใน* รายงานการประชุมวิชาการถั่วเหลืองแห่งชาติครั้งที่ 5. โรงแรมแม่น้ำโขงแกรนด์วิว นครพนม. 18-22 กันยายน 2537. หน้า 47-52.

วรวรรณ ชาลีพรหม วิชชา ชาลีพรหม และฉันทนา สีผึ้ง. 2544. **การสำรวจโรคของกระเจี๊ยบเขียวที่เกิดจากเชื้อไวรัส.** รายงานผลการวิจัยมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2544.

วรวรรณ ชาลีพรหม วิชชา ชาลีพรหม และฉันทนา สีผึ้ง. 2545. **การตรวจโรคของกระเจี๊ยบเขียวที่เกิดจากเชื้อไวรัส.** รายงานผลการวิจัยมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2545

สุรภี กีรติยะอังกูร ขนิษฐา วงศ์วัฒนารัตน์ และกิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร. 2547. **ชุดตรวจสอบโรคไวรัสในกล้วยไม้.** วารสารโรคพืช 18 (1-2) : 1-14

อำนวย อรรถลังรอง. 2547. **ไม่มีพรุ่งนี้...? สำหรับการวิจัยและพัฒนาพันธุ์กระเจี๊ยบเขียว.** กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพฯ.

อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์. 2545. **เจมินีไวรัสที่เข้าทำลายพืช** *ใน* เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ ตรวจวินิจฉัยไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและไวรัสในกลุ่มเจมินีไวรัสในพืชที่เป็นโรคโดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา วันที่ 28-31 พฤษภาคม 2545. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

อรวรรณ ชัชวาลการพาณิชย์ และวรวรรณ ชาลีพรหม. 2547. **การพัฒนาวิธีการตรวจหาเชื้อเจมินีไวรัสในกระเจี๊ยบเขียว.** รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยมูลนิธิโทเรประเทศไทย.

อรประไพ คชนันทน์ นุชนาถ วารินทร์ ชาญณรงค์ ศรีภิบาล รัชนี ฮงประยูร และสุพัฒน์ อรรถธรรม. 2545. **การผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและการพัฒนาวิธีการตรวจวิเคราะห์ไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและไวรัสในกลุ่ม** whitefly-transmitted geminivirus **โดยเทคนิคทางอิมมูโนวิทยา.** *ใน* เอกสารประกอบการประชุมเชิงปฏิบัติการ การตรวจวินิจฉัยไวรัสใบหงิกเหลืองมะเขือเทศและไวรัสในกลุ่มเจมินีไวรัสในพืชที่เป็นโรคโดยเทคนิคทาง

อิมมูโนวิทยา วันที่ 28-31 พฤษภาคม 2545. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม.

Al-Yousif, Y., Anderson, J., Chard-Bergstrom, C. and S. Kapil. 2002. Development, evaluation, and application of lateral-flow immunoassay (immunochromatography) for detection of ratavirus in bovine fecal samples. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 9:723-724.

Czosnek, H., Ber R., Navot, N. and D. Zamir. 1988. Detection of tomato yellow leaf curl virus in lysates of plants and insects by hybridization with a viral DNA probe. Plant Disease 72 : 949-951.

Donald Danforth Plant Sceince Center. 2005. Geminiviridae. Available Source : http:// www.danforthcenter.org/iltab/Geminiviridae/geminiaccess/begomovirus/O.html. May 23, 2005.

Hulk, E.L. and S.H. De Boer. 1985. Monoclonal antibodies in plant disease research. Annual of Review Phytopathology. 23: 321-350.

ICTVdB. 2005. *Bhendi yellow vein mosaic virus* . Available Source : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/29030010.htm. August 20, 2005.

Jose, J. and K. Usha. 2003. Bhendi yellow vein virus disease in India is caused by association of a DNA β satellite with a Begomovirus. Virology. 305 (2):310-317.

Macintosh, S., D. J. Robinson and B. D. Harrison. 1992. Detection of three whitefly-transmitted geminiviruses occuring in Europe by tests with heterologous monoclonal antibodies. Annals of Applied Biology 121: 297-303.

Martin, R.R. 1998. Advance diagnostic tools as an aid to controlling plant virus diseases. *In* Plant Virus Disease Control. Hadidi, A. Khetarpal, R.K. and Koganezawa, H. (eds). The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, p. 381-398.

Navot, N. Zeidan, M. Pichersky, E. Zamir D. and H. Czosnek. 1992 Use of the polymerase chain reaction to amplify tomato yellow leaf curl virus DNA from infected plants and viruliferous whiteflies. Phytopathology 82 : 1199-1212.

Pico, B. Diez, M.J. and F. Nuez. 1999. Improved diagnostic techniques for tomato yellow leaf curl virus in tomato breeding programs. Plant Disease 83 : 1006-1012.

Salamone, A. and P. Roggero. 2002. Host range, seed transmission and detection by ELISA and leteral flow of an Italian isolate of Pepino mosaic virus. Journal of Plant Pathology 84:65-68.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 545 p.

Weiss, A. 1999. Concurrent engineering for lateral-flow diagnostics. IVD Technology 5(7):48-57.