ตรวจเอกสาร

โรคทริสเตซา

โรคส้มที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส Citrus Tristeza *Closterovirus* (CTV) (Bar-Joseph and Lee, 1981) มีการรายงานครั้งแรกในทวีปอเมริกาใต้ ในปี ค.ศ. 1946 โรคได้ทำลายต้นส้มนับล้านต้นในอาร์เจนตินา บราซิล แคลิฟอร์เนีย ฟลอริดา และสเปน ต่อมาโรคได้กระจายออกไปยังพื้นที่ปลูกส้มในแถบเอเชีย และแอฟริกาใต้ (Roistacher, 1991) สำหรับประเทศไทยมีรายงานโรคทริสเตซาเกิดขึ้นกับส้มเขียวหวาน ส้มโอ ส้มตรา ส้มจุก ส้มโชกุน และมะนาว โรคทริสเตซาทำให้เกิดอาการใบใส เส้นใบแตก ลำต้นปุ่ม ต้นส้มทรุดโทรมและแห้งตายจากปลายยอด จากการรายงานโรคทริสเตซาในพื้นที่ปลูกส้มทั่วประเทศไทยระหว่างปี 2547-2552 พบการระบาดของเชื้อไวรัสสายพันธุ์ลำต้นปุ่ม(Citrus Tristeza virus-stem pitting strain, SP) ซึ่งเป็นสายพันธุ์รุนแรงในส้มหลายชนิดรวมทั้งส้มโอซึ่งปลูกในจ.ราชบุรี และ จ.สงขลา ซึ่งสายพันธุ์ไวรัสชนิดนี้ทำให้ต้นส้มโอแคระแกรน เนื่องจากเกิดโพรงขนาดเล็กในลำต้นบริเวณ vascular cambium ทำให้ท่อน้ำ (xylem vessel) ขาดหายไป ซึ่งโพรงดังกล่าวนี้ คือ ร่องปุ่มที่ปรากฏในเนื้อไม้ของลำต้นและกิ่งของต้นส้ม (รัตนา และคณะ, 2552) จากการสำรวจโรคส้มในพื้นที่ปลูกส้มทั้ง 4 ภาคของประเทศไทย (ภาคเหนือ จ.เชียงใหม่ และ จ.เชียงราย, ภาคกลาง จ.ปทุมธานี และ จ.สมุทรสงคราม, ภาคตะวันออก จ.ตราด และ จ.ระยอง และภาคใต้ จ.นครศรีธรรมราช, จ.กระบี่, จ.ตรัง, จ.พัทลุง, จ.สงขลา และ จ.ยะลา) รวม 143 ตัวอย่าง พบว่าร้อยละ 64 ติดเชื้อสายพันธุ์รุนแรง ซึ่งก่อให้เกิดอาการลำต้นปุ่มในระดับรุนแรง และทำให้ต้นส้มเตี้ยแคระทำให้ผลผลิตลดลงประมาณ 50% (รัตนา และคณะ, 2551)

การตรวจวินิจฉัยเชื้อสาเหตุโรคทริสเตซา

การแพร่ระบาดของโรคทริสเตซาพบในแหล่งปลูกทั่วประเทศ (รัตนา และคณะ, 2551) ทั้งนี้เนื่องจากการขาดประสบการณ์การวินิจฉัยโรคในเบื้องต้นของเกษตรกรผู้ปลูก ในหลายประเทศใช้เทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Clark and Adam, 1977; Roistacher, 1991; Sdoodee *et al.*, 2008) เพื่อใช้ตรวจหาเชื้อทริสเตซา ต่อมาได้มีการพัฒนาชุดตรวจเชื้อไวรัสสาเหตุโรคพืชที่สามารถปฏิบัติได้ด้วยตัวเองโดยไม่ต้องการความชำนาญเป็นพิเศษ และใช้เวลาสั้น (15 นาที) โดยใช้หลักการของ Immonochromatographic lateral flow (IGLF) ซึ่งมีทั้งที่ใช้ latex bead (Tsuda *et al.*, 1992) และใช้ colloidal gold เป็นตัวบ่งชี้ (Byzova *et al.*, 2009) หลักการของ Immonochromatographic assay ที่ใช้ latex bead เป็นตัวบ่งชี้ เตรียมแผ่นตรวจ (immunostrip) โดยใช้เม็ดลาเท็กซ์ (latex bead) เป็นตัวกลาง (solid phase) ที่ยึดติดของแอนติบอดี ทั้งนี้ใช้เม็ดลาเท็กซ์สองชนิด (white and pink latex) เม็ดลาเท็กซ์สีขาวจะถูกเคลือบไว้ด้วย

แกมมากลอบบูลิน (IgG) จากแอนติเซรัมของเชื้อไวรัส และป้ายไว้บนแผ่นตรวจซึ่งเป็นกระดาษกรองเมื่อปล่อยให้แห้งเม็ดลาเท็กซ์จะถูกตรึงไว้บนแนวที่ป้ายไว้ ส่วนเม็ดสีชมพูทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ (dye marker) โดยเม็ดลาเท็กซ์สีชมพูจะดักจับไวรัสที่ปรากฏในน้ำคั้นแล้วเคลื่อนที่โดยการดูดซึมของเหลว (capillary action) ของแผ่นกระดาษกรองไปจนถึงแนวของเม็ดลาเท็กซ์สีขาว แกมมากลอบบูลินบนเม็ดลาเท็กซ์สีขาวจะยึดจับอนุภาคไวรัสทำให้เม็ดลาเท็กซ์สีชมพูไม่สามารถเคลื่อนที่ต่อไปได้ จึงเกิดเป็นแถบสีชมพูปรากฏให้เห็นบนแผ่นตรวจ ซึ่งหมายถึงการตรวจพบไวรัส การตรวจเชื้อไวรัสโดยวิธีนี้ได้มีการพัฒนาและประสบผลสำเร็จในการตรวจเชื้อไวรัสหลายชนิดทั้งไวรัสที่มีอนุภาคกลม (Cucumber Mosaic Virus และ Tomato Spotted Wilt Virus) และอนุภาคเป็นท่อนยาว (Tobacco Mosaic Virus , Cymbidium Mosaic Virus และ Zucchini yellow mosaic virus) (Tsuda *et al.*, 1993) ต่อมา รัตนา และคณะ (2551) รายงานการตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยใช้แผ่นตรวจ Immonostrip ซึ่งใช้หลักการของ IGFL โดยใช้สีของเม็ดลาเท็กซ์เป็นตัวบ่งชี้ และพบว่าแกมมากลอบบูลินซึ่งสกัดจากแอนติเซรัมของเชื้อ CTV ที่มีความเข้มข้น 100, 150 และ 200 µg/ml ซึ่งใช้เคลือบบนเม็ดลาเท็กซ์สีขาวและเม็ดลาเท็กซ์สีชมพู (marker) พบว่าเม็ดลาเท็กซ์สีขาวที่ความเข้มข้น 0.5% ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ซึ่งป้ายไว้บนแผ่นตรวจอิมมูโนสตริปและเม็ดลาเท็กซ์สีชมพูเข้มข้น 0.05% สามารถใช้ตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสที่ปรากฏในน้ำคั้นเจือจาง 1:5, 1:10, 1:50 และ 1:100 โดยปรากฏแถบสีชมพูบนแผ่นตรวจที่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ทั้งนี้การตรวจในน้ำคั้นเจือจาง 1:5 ให้แถบสีชมพูที่มองเห็นชัดเจนที่สุดโดยมีความเข้มข้นของสีสูงสุด 1.391 เมื่อวัดด้วยเครื่องตรวจวัดสี (color meter) และในการทดลองความคงทนของแผ่นตรวจซึ่งป้ายเม็ดลาเท็กซ์สีขาวเป็นระยะเวลา 1 วัน 1 สัปดาห์ 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน ที่ระดับอุณหภูมิ 7°ซ และ 28°ซ พบว่าแผ่นตรวจที่เก็บรักษาไว้ทุกระยะเวลายังคงทำปฏิกิริยากับเชื้อไวรัสให้แถบสีชมพูที่มองเห็นด้วยตาเปล่า ทั้งนี้การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 7°ซ ให้ความเข้มข้นของแถบสีลดลงเมื่อเปรียบเทียบแผ่นตรวจที่เก็บไว้ที่ 28°ซ จากผลการทดลองได้พัฒนาชุดตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยอิมมูโนสตริปซึ่งตรวจประกอบด้วยแผ่นตรวจ 5 แผ่น น้ำยาสกัดน้ำคั้น 5 หลอด น้ำยาตรวจเชื้อ 5 หลอด แท่งบดเนื้อเยื่อ 5 แท่ง พร้อมคู่มือแสดงวิธีการตรวจ

Byzova และคณะ (2009) ได้พัฒนาชุดตรวจโรคไวรัสในพืชด้วยเทคนิค Immunostrip โดยใช้หลักการของ Immunochromatographic assay มาใช้ในการตรวจไวรัสในพืชที่มีรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ carnetion mottle virus (CarMV), bean mild mosaic virus (BMMV), tobacco mosaic virus (TMV), potato viruses X (PVX) และ potato iruses Y (PVY) โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของ IgG ของไวรัสในพืชทั้ง 5 ชนิด จากการทดสอบได้คัดเลือก IgG ของไวรัสในพืชที่ความเข้มข้น 10, 10, 14, 20 และ 16 µg/ml ใน TMV, PVX, PVY, CarMV และ BMMV ตามลำดับ มาเชื่อมต่อกับอนุภาคของทอง (Colloidal gold) ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจหาเชื้อไวรัสในน้ำคั้นของพืช โดยจะทำการทดสอบคัดเลือกขนาดของอนุภาคทอง

ที่เหมาะสมที่จะนำเชื่อมต่อกับ IgG ของไวรัส โดยได้ทำการเตรียมอนุภาคทองที่ 2 ขนาด คือ 15 และ 30 นาโนเมตร จากการทดสอบได้เลือกอนุภาคของทองที่มีขนาด 30 นาโนเมตร มาใช้ในการเชื่อมต่อกับ IgG ของไวรัสจากพืชแต่ละชนิด และใช้ goat antibodies againt rabbit IgG (Arista Biologicals, United States) มาเป็น control line ที่ความเข้มข้น 0.75 mg/ml ทำให้เห็นการปรากฏของแถบสีที่ชัดเจนภายใน 10 นาที สำหรับในการทดลองครั้งนี้จะใช้ Immunostrip ที่ผลิตโดยบริษัท Agdia ประเทศสหรัฐอเมริกา ทำการทดสอบโดยหยดน้ำคั้นของพืชลงบนแผ่นตรวจ ถ้าพืชติดเชื้อไวรัสก็จะปรากฏแถบสีบริเวณ test line และ control line

Hong-Ji Su (2008) ได้พัฒนาชุดตรวจวินิจฉัยเชื้อ *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) ด้วย strip ซึ่งให้ผลที่รวดเร็วและแน่นอน สำหรับการพัฒนาในครั้งนี้ใช้ Monoclonal antibodies ต่อเชื้อ CTV ซึ่งผลิตที่มหาวิทยาลัยในประเทศไต้หวัน ใช้ strip ที่มีการพัฒนาขึ้นจากบริษัท Meikang Biological โดยจะใช้อนุภาคทอง (Colloidal gold) มาเป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจ ใช้แอนติบอดีของไวรัสมาเป็น test line และใช้ anti-mouse antibody มาเป็น control line ทดสอบโดยตัดเนื้อเยื่อจากเส้นกลางใบแล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก จากนั้นบรรจุลงในหลอด แล้วเติม extraction buffer ลงไป 0.8 มล. บดให้ละเอียดด้วยแท่งที่ใช้สำหรับบด แล้วนำ strip จุ่มลงไปในหลอด จากการทดลองจะปรากฏแถบสีชมพูภายใน 2-3 นาที โดยความชัดเจนของแถบสีที่ปรากฏจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเชื้อ CTV ในน้ำคั้น