ยุพา โพธิ์แก้ว 2556: การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟีสำหรับตรวจสอบเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) ในพืชตระกูลส้ม ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาโรคพืช ภาควิชาโรคพืช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์คนึงนิตย์ เหรียญวรากร, Ph.D. 127 หน้า

โรคทริสเตซ่าไวรัสเกิดจากเชื้อ *Citrus tristeza virus* (CTV) เป็นเชื้อที่เข้าทำลายพืชตระกูลส้มทั่วโลก และทำให้ผลผลิตส้มลดลง งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการสำรวจเชื้อ CTV จากแปลงปลูกส้มของเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดต่างๆ จำนวน 10 จังหวัด นำมาเพิ่มปริมาณยีนโปรตีนห่อหุ้มอนุภาค (coat protein) ด้วยวิธี RT-PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 700 นิวคลีโอไทด์ และยีน *p*23 ด้วยวิธี multiplex RT-PCR ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 400 และ 239 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งออกแบบสำหรับใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CTV สายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรง ตามลำดับ เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนส่วนของโปรตีนห่อหุ้มอนุภาคของเชื้อ CTV ที่เป็นตัวแทน 19 ไอโซเลท กับเชื้อ CTV ที่มีรายงานในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกันของลำดับนิวคลีโอไทด์และกรดอะมิโนที่ระดับ 89-100 % และ 94-100 % ตามลำดับ จากการทดลองในครั้งนี้จากการวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล พบว่าเชื้อ CTV ที่พบในพืชตระกูลส้มส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มของเชื้อสายพันธุ์รุนแรง

การผลิตโพลีโคนอลแอนติบอดีจากรีคอมบิแนนท์โปรตีนของเชื้อ CTV นำมาพัฒนาวิธีการตรวจสอบเชื้อด้วยเทคนิค Triple Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (TAS-ELISA) พบว่าให้ค่า OD 405 เท่ากับ 1.320 ถึง 3.299 ในพืชเป็นโรคและในพืชปกติให้ค่า OD 405 น้อยกว่า 0.2 เมื่อทดสอบความจำเพาะของโพลีโคนอลแอนติบอดีด้วยวิธี TAS-ELISA พบว่ามีความจำเพาะต่อเชื้อ CTV โดยไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับพืชปกติ และไวรัสชนิดอื่นที่นำมาตรวจสอบ และเมื่อเปรียบเทียบกับแอนติซีรัมที่ผลิตทางการค้า พบว่าให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

การพัฒนาเทคนิคอิมมูโนโครมาโตกราฟี เพื่อใช้ในการตรวจสอบเชื้อ CTV อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็วในพืชตระกูลส้ม โดยตกตะกอนโพลีโคนอลแอนติบอดีจาก anti-CTV RIgG และ anti-CTV ChIgY ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต นำ anti-CTV RIgG ไปพ่วงกับอนุภาคทองและเคลือบบน conjugate release pad (CRP) เส้น test line และ control line เคลือบด้วย anti-CTV ChIgY และ goat anti-rabbit IgG ตามลำดับ ทดสอบชนิดแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนและชนิดของบัฟเฟอร์ พบว่าแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนชนิด Prima40 ปรากฏเส้นคมชัดสม่ำเสมอภายในระยะเวลา 90 วินาที และพบว่าการใช้บัฟเฟอร์ Na_2BO_3 ในการทำปฏิกิริยาให้เส้น control line ที่คมชัดสม่ำเสมอและไม่ทำปฏิกิริยากับเส้น test line การทดสอบความไวในน้ำคั้นพืชที่มีเชื้อ CTV โดยเจือจาง 1:2 ถึง 1: 64 พบว่าสามารถตรวจสอบน้ำคั้นพืชเป็นโรคได้จนถึงที่ระดับความเจือจาง 1:32 และไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับน้ำคั้นพืชปกติ ส่วนการตรวจสอบความจำเพาะของอิมมูโนโครมาโตกราฟิคสตริปกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น พบว่าไม่ทำปฏิกิริยาข้ามกับเชื้อไวรัสชนิดอื่นที่นำมาตรวจสอบ

_____ / ____ / ____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์