การจำแนกเชื้อ CaMV สาเหตุโรคใบด่างแคระแกรนบนคาร์เนชั่นในประเทศไทย

Identification of CaMV the Cause of Mottle and Stunt on Carnation in Thailand

สุรภี กีรติยะอังกูร[1] กิตติศักดิ์ กีรติยะอังกูร[1]
Surapee Kiratiya-angul[1] Kittisak Kiratiya-angul[1]

ABSTRACT

Virus diseases of carnation had never been reported in Thailand. Mottle, stunt, yellow and leaf twisted symptoms were found on susceptible varieties of carnation such as pink color variety. The Spherical virus about 28 nm in diameter were detected from infected plants. The virus was transmitted by mechanical method which caused local yellow and necrotic lesion symptom on *Chenopodium quinoa, C. amaranticolor* and *Gomphrena globosa*, mild mottle symptom on *Dianthus caryophyllus* var. Charming and Paola, yellow at the top, on var. White sin but no symptom on var. Killer and Laguna. The virus gave positive reaction with the antiserum of CaMV by ISEM. Physical property of TIP at 90 °C in 10 min, DEP at 10-5 and LIV about 50 days at (28 °C). Absolutely, this virus is identical with CaMV. Purified viruses were prepared from infected *C. amaranticolor* and immunized a rabbit weekly for 3 times. The antiserum was firstly bled 20 days after the last injection. The purified IgG from the 4th and 5th bleeding of antisera gave positive reaction at dilution of $1:20^4$ in ELISA with its IgG-enzyme conjugate at dilution of $1:10^4$.

Keywords: CaMV, Mottle, Stunt, Carnation.

บทคัดย่อ

โรคไวรัสของคาร์เนชั่นยังไม่เคยมีรายงานการจำแนกชนิดมาก่อนในประเทศไทย ลักษณะอาการที่พบเสมอบนคาร์เนชั่นพันธุ์ที่อ่อนแอ เช่น พันธุ์คาร์เนชั่นสีชมพู คืออาการด่าง ใบบิดเล็กน้อย ข้อปล้องสั้นนั้น ได้ตรวจพบอนุภาคทรงกลมของไวรัสมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 28 nm ถ่ายทอดได้โดยการสัมผัส ทำให้เกิดอาการแผลจุดเหลืองและแผลจุดตาย บนใบของ *Chenopodium quinoa, C. amaranticolor* และ *Gomphrena globosa* แสดงอาการด่างไม่รุนแรง บน *Dianthus caryophyllus* หรือคาร์เนชั่นพันธุ์ Charming และ Paola ส่วนพันธุ์ White sin มีแต่อาการยอดเหลืองเพียงอย่างเดียว แต่พันธุ์ Killer และ Laguna ไม่แสดงอาการของโรคเลยแม้ว่าจะตรวจพบเชื้อไวรัส ไวรัสนี้ให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ แอนติซีรัมของ CaMV โดยวิธี ISEM คุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อคือมี TIP ที่ 90 °C ใน 10 นาที, DEP ที่ 10^{-5} และมี LIV ที่ 50 วัน ในอุณหภูมิ 28 °C ซึ่งเหมือนกับคุณสมบัติของ CaMV ทำการแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์จาก *C. amaranticolor* ที่เป็นโรค และนำเชื้อไวรัสบริสุทธิ์มาฉีดกระต่าย 3 ครั้ง เจาะเลือดกระต่ายหลังจากฉีดครั้งสุดท้ายแล้ว 20 วัน สกัด IgG จากแอนติซีรัมที่เจาะครั้งที่ 4 และ 5 สามารถให้ปฏิกิริยาเป็นบวกในการตรวจโดยวิธี ELISA แม้เจือจางที่ $1:20^4$ กับ IgG-enzyme conjugate ที่เจือจางที่ $1:10^4$

(1) กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร
Plant Virology Section, Division of Plant Pathology and Microbiology, Department of Agriculture

คำนำ

คาร์เนชั่น เป็นไม้ตัดดอกที่ได้รับความนิยมมากในปัจจุบัน ทั้งในยุโรปและอเมริกาตลอดจนประเทศในเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น ไทย การผลิตคาร์เนชั่นในยุโรปและอเมริกานิยมปลูกในเรือนกระจกควบคุมอุณหภูมิมากกว่าการปลูกกลางแจ้ง ประเทศไทยเคยนำเข้าคาร์เนชั่นปีละมากๆ แต่ในปัจจุบันประเทศไทยสามารถปลูกคาร์เนชั่นได้ในพื้นที่ทางภาคเหนือ ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ฯลฯ เป็นการผลิตเพื่อทดแทนการนำเข้าส่วนหนึ่ง แต่ปริมาณที่ใช้มีจำนวนมาก จึงยังคงมีการนำเข้าอยู่ในฤดูที่อากาศไม่เหมาะสมต่อการผลิต โครงการหลวงและบริษัทเอกชนได้นำพันธุ์คาร์เนชั่นจากต่างประเทศเข้ามาหลายพันธุ์ด้วยเช่นกัน เช่น Charming, Killer, Paolar ฯลฯ เป็นต้น

ในต่างประเทศได้มีการศึกษาโรคไวรัสของคาร์เนชั่นชนิดต่างๆ ไว้หลายชนิดด้วยกัน ได้แก่

- Carnation etched ring virus (Lawson 1979) ซึ่งเป็นไวรัสชนิดกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของอนุภาค ประมาณ 45 nm เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดได้โดยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้น (Mechanical หรือ Sap inoculation)

- Carnation latent virus (Watter 1971) เป็นไวรัสชนิดท่อนยาวคดขนาดประมาณ 620 x 12 nm ถ่ายทอดได้โดยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นเช่นกัน และให้อาการแผลจุดบนใบต่อด้วยอาการด่างเป็นโรคทั้งต้น (systemic) บนพืชทดสอบ *C. amaranticolor* และ *C. quinoa*

- Carnation necrotic fleck virus (Inovye 1974) เป็นไวรัสที่มีอนุภาคยาวมาก (1100-1200 nm) อยู่ในกลุ่มของ Closterovirus ทำให้คาร์เนชั่นหลายพันธุ์มีอาการใบเป็นจุดแผลดายสีดำตกกระทำให้ต้นทรุดโทรม Holling (1971) ได้รวบรวมข้อมูลของ Carnation vein mottle virus ไว้ว่าเป็นเชื้อไวรัสชนิดท่อนยาวคด ยาวประมาณ 750 nm อยู่ในกลุ่ม Potyvirus และถ่ายทอดได้ด้วยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้น

นอกจากนี้ยังมีไวรัสรูปทรงกลมอีก 2 ชนิดที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางใกล้เคียงกันมากที่ทำให้คาร์เนชั่นเป็นโรค คือ Carnation ringspot virus (CaRSV) (Holling 1970) และ Carnation mottle virus (CaMV) (Holling 1970) มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 และ 28 nm ตามลำดับ แต่ลักษณะอาการแตกต่างกัน CaRSV ทำให้เกิดอาการด่างจุดวงแหวน (ringspot) บนใบและต้นมีอาการบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง (distortion) และแคระแกรน ส่วน CaMV อาการด่างไม่ชัดเจน บางครั้งอาจมีอาการยอดเหลืองบนบางพันธุ์ ต้นแคระแกรน ไวรัสทั้งสองชนิดถ่ายทอดได้โดยการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้น

ส่วน Carnation cryptic virus (Lisa 1986) นั้นเป็นไวรัสที่ถ่ายทอดโดยทางเมล็ดเพียงอย่างเดียว อนุภาคไวรัสเป็นรูปทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 29 nm เชื้อไวรัสชนิดนี้ไม่ทำความเสียหายให้กับคาร์เนชั่น เพราะไม่มีอาการใดๆ บนคาร์เนชั่น

จะเห็นได้ว่ามีไวรัสหลายชนิดที่ทำให้เกิดโรคกับคาร์เนชั่น โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์ 2 ประการคือ

1) ศึกษาจำแนกชนิดของไวรัสที่พบบนคาร์เนชั่นในแหล่งปลูกต่างๆ ของประเทศไทย

2) แยกเชื้อไวรัสชนิดที่จำแนกได้ให้ได้ไวรัสบริสุทธิ์จำนวนมากพอที่จะทำการผลิตแอนติซีรัมเพื่อเก็บไว้ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคไวรัสที่พบบนคาร์เนชั่นให้รวดเร็วยิ่งขึ้น โดยวิธี ELISA

วัตถุประสงค์ทั้งสองประการจะนำไปสู่การป้องกันกำจัด โดยใช้แอนติซีรัมที่ได้นี้ตรวจสอบต้นพันธุ์ก่อนทำการขยายพันธุ์ออกไปเป็นจำนวนมาก เพื่อป้องกันและควบคุมการแพร่ระบาดของโรค

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ศึกษาการถ่ายทอด ใช้วิธีกลหรือวิธีสัมผัส (mechanical Inoculation)

โดยนำตัวอย่างพืชเป็นโรคมาบดละเอียดใน 0.01 M potassium phosphate buffer pH 7.6 (KPB) แล้วปลูกเชื้อโดยการทาลงบนใบของ *C. quinoa* และต้นกล้าของคาร์เนชั่นที่เพาะจากเมล็ดหลังจากย้ายปลูก 1 เดือน ซึ่งโรยผงถ่านอย่างละเอียดขนาด 600 mesh (carborundum) ไว้ก่อนแล้วเพื่อให้เกิดแผลบนใบ เก็บ

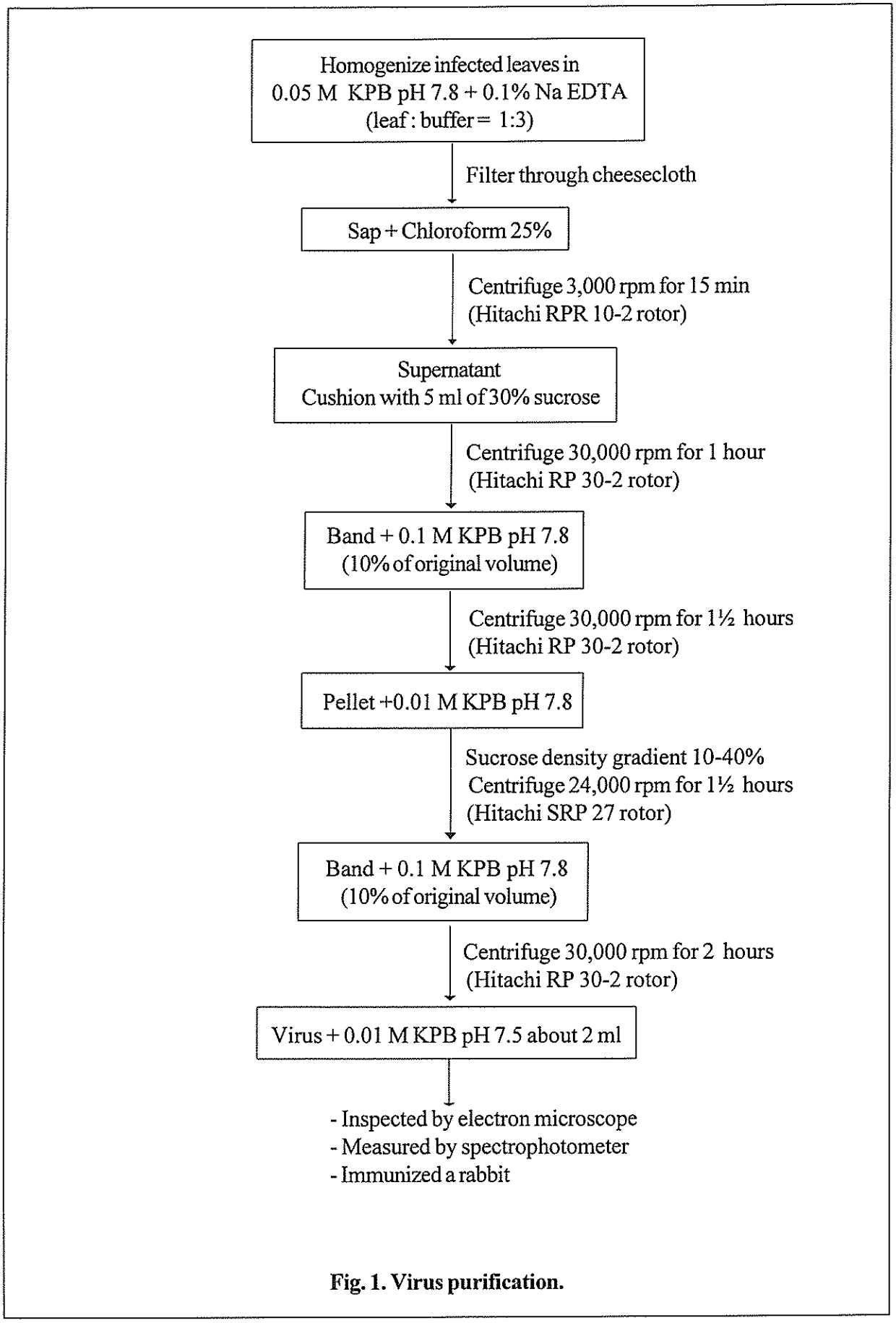

Fig. 1. Virus purification.

ไว้ในเรือนต้นไม้ควบคุมอุณหภูมิโดยเฉลี่ย 24 °C เพื่อตรวจดูอาการและการเกิดโรค

2. การศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ

นำตัวอย่างใบพืชเป็นโรคมาบดละเอียดใน 2% phosphotungstic acid (PTA) ใช้กริดขนาด 300 mesh ที่เตรียมเรียบร้อย แล้วแตะซับไวรัสและ PTA วางผึ่งจนแห้งแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน Hitachi H-300

3. การศึกษาพืชอาศัย

เตรียมน้ำคั้นจากใบเป็นโรคโดยบดใบพืชละเอียดใน 0.05 M KPB pH 7.6 แล้วปลูกเชื้อลงบนต้นกล้าพืชชนิดต่างๆ ดังแสดงใน Table 1

4. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของเชื้อ

เตรียมน้ำคั้นของพืชเป็นโรคเช่นเดียวกับ ข้อ 4 โดยใช้ใบพืชต่อ buffer = 1:10 กรองเอาเศษพืชทิ้งไป แบ่งน้ำคั้นพืชไปทดสอบคุณสมบัติ 3 ประการคือ

4.1 Thermal inactivation point (TIP) นำน้ำคั้นพืชใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 1 ml แช่ลงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 60,70,80,90 และ 100 °C นานอุณหภูมิละ 10 นาที แล้วแช่ลงในน้ำแข็งให้น้ำคั้นเย็นลงทันที นำน้ำคั้นแต่ละอุณหภูมิ ไปปลูกเชื้อโดยการทาลงบนใบของ *C. quinoa* เก็บไว้ในเรือนปลูกต้นไม้ควบคุมอุณหภูมิ เพื่อตรวจดูอาการ

4.2 Dilution end point (DEP) เจือจางน้ำคั้นด้วย buffer เช่นเดียวกับข้อ 4.1 เป็น $1:10^{-3}$, $1:10^{-4}$, $1:10^{-5}$, $1:10^{-6}$, $1:10^{-7}$ ปลูกเชื้อประมาณ 1 ml แต่ละความเจือจางลงบนใบของ *C. quinoa* เก็บไว้ในเรือนปลูกต้นไม้ควบคุมอุณหภูมิ เพื่อตรวจดูอาการ

4.3 Longivity in vitro (LIV) แบ่งน้ำคั้นใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 ml จำนวน 4 หลอด นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28 °C นำแต่ละหลอดมาปลูกเชื้อลงบนใบของ *C. quinoa* เมื่อครบกำหนดเวลา 30, 40, 50 และ 60 วัน ตามลำดับ เก็บต้นไม้ไว้ในเรือนปลูกต้นไม้ควบคุมอุณหภูมิเฉลี่ย 24 °C เพื่อตรวจดูอาการของโรค

5. การแยกเชื้อไวรัสบริสุทธิ์

เพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสที่ศึกษาจำแนกไว้แล้วนั้นบน *C. amaranticolor* (Fig. 5) ให้มีปริมาณมากเพียงพอ ไม่ต่ำกว่า 30 ต้น ไว้ในเรือนปลูกต้นไม้ควบคุมอุณหภูมิ 24 °C ทำให้พืชเจริญเติบโตสมบูรณ์ ต้นอวบ จนพืชมีใบประมาณ 16 ใบขึ้นไป จึงปลูกเชื้อไวรัสลงไปบนใบทุกใบที่โรยผงถ่านไว้เรียบร้อยแล้ว เตรียมต้นไม้และปฏิบัติเช่นนี้ 3 ครั้ง แต่ละชุดห่างกันประมาณ 1 อาทิตย์ เพื่อใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ 3 ครั้ง แต่ละครั้งเก็บใบพืชที่แสดงอาการใบจุด (local lesion) หลักจากปลูกเชื้อแล้ว 10-12 วัน เชื้อไวรัสมีความเข้มข้นสูงทั้งบน *C. amaranticolor* ที่แสดงอาการแผลจุดตายและบนคาร์เนชั่นที่มีอาการ mottle แต่เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของ host protein ในสารละลายไวรัสในขั้นตอนการแยกเชื้อบริสุทธิ์ จึงเลือกใช้ใบของ *C. amaranticolor* แทนใบของคาร์เนชั่นในการแยกเชื้อบริสุทธิ์

วิธีการทำเชื้อบริสุทธิ์มีขั้นตอนดังแสดงใน Fig. 1

6. การผลิตแอนติซีรัม

นำไวรัสบริสุทธิ์ที่แยกได้ในแต่ละครั้งไปฉีดกระต่าย สัปดาห์ละครั้ง โดยผสมสารละลายไวรัสให้เข้ากันดีกับ freund incomplete adjuvant อัตราส่วน 1:1 ฉีดเข้ากล้ามเนื้อสะโพกสลับกันสัปดาห์ละข้างรวม 3 ครั้ง หลังจากฉีดครั้งสุดท้ายแล้ว 20 วัน เจาะเลือดกระต่าย ปริมาณ 15 ml แยกเอาซีรัมโดยทำเช่นนี้ติดต่อกัน 6 ครั้ง ทุกสัปดาห์ แล้วแบ่งเก็บเป็นหลอดเล็กๆ หลอดละ 1 ml เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

7. การสกัด gamma-globulin (IgG) และ IgG-enzyme conjugate ตรวจสอบคุณภาพโดย ELISA เทคนิค (Reddy, 1989)

นำแอนติซีรัม CaMV จำนวน 1ml ผสมกับน้ำกลั่น 1 ml และ phosphate buffer saline (PBS) 3 ml รวมเป็น 5 ml นำมาผสมกับ 36% sodium sulfate จำนวน 5 ml ให้เข้ากันดีแล้วนำไปปั่นเพื่อตกตะกอนที่ 8,000 rpm ด้วย rotor RPR 18,000 Hitachi นาน 15 นาที ที่ อุณหภูมิ 25-30 °C ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 18% sodium sulfate 1 ครั้ง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 8,000 rpm ด้วย rotor RPR 18,000 Hitachi นาน 10 นาที

ละลายตะกอนที่ได้ด้วย 1 เท่าของ PBS 4 ml แล้วdialyse ใน PBS 1 ลิตร นาน 4 ชั่วโมง 2 ครั้ง วัดความเข้มข้นของ IgG ด้วย spectrophotometer ปรับความเข้มข้นของ IgG ให้มีค่า OD_{280} = 1.4 เพื่อให้มีปริมาณ IgG เท่ากับ 1 mg/ml แล้วนำมาเติม NaN_2 0.05% เก็บไว้ในตู้เย็นแช่แข็ง -20 °C

การเตรียม IgG-enzyme conjugate ตามวิธีการของ Dr. Reddy (1989) เช่นเดียวกับการสกัด IgG โดยนำ enzyme alkaline phosphatase type VII จำนวน 2 mg ที่อยู่ในสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตมาตกตะกอนด้วยการหมุนเหวี่ยงที่ 9,000 rpm 15 นาที เพื่อเอาตะกอนของ enzyme alkaline phosphatase ออกมาโดยใช้ microcentrifuge แล้วนำ IgG ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml มา 1 ml เทลงในหลอดที่มีตะกอนของ enzyme อยู่ที่ก้นหลอด ผสมให้เข้ากันดี แล้วจึงนำไป dialyse ใน PBS 3 ครั้ง ใช้ PBS ครั้งละ 500 ml ที่ 4 °C แล้ว dialyse ใน 500 ml PBS ที่มี 0.06%glutaraldehyde นาน 3-4 ชั่วโมง ในอุณหภูมิห้อง IgG จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองจาง ๆ dialyse อีก 3 ครั้ง ใน PBS 500 ml ที่ 4 °C นำ IgG-enzyme conjugate ที่ได้มาเติม bovine serum albumin ในปริมาณ 5 mg/ml เก็บไว้ในตู้เย็นธรรมดา

8. การศึกษาคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อ

ใช้วิธี immuno sorbent electron microscope (ISEM) (Derrick 1972, 1973, Milne 1977) ศึกษาคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยาของเชื้อไวรัส โดยเจือจางแอนติซีรัมของ Carnation mottle virus (CaMV) และ Carnation ringspot virus (CaRSV) (จากศูนย์แอนติซีรัมของเชื้อไวรัสและมายโคพลาสมาพืชประเทศไทย ซึ่งได้รับมาจากประเทศอังกฤษ) ให้เป็น 1:200 นำกริดด้านที่เคลือบด้วย formvar ไว้แล้วคว่ำลงบนหยดของแอนติซีรัมนี้นาน 15 นาที ซับกริดให้แห้ง แล้วนำไปคว่ำลงบนหยดของเชื้อไวรัสบริสุทธิ์ที่เจือจางแล้วเป็น 1:10 นาน 10 นาที แล้วซับด้วยกระดาษซับ ล้างด้วยน้ำกลั่น 8-10 หยด แล้วจึงเคลือบทับด้วยแอนติซีรัมอีกครั้ง โดยคว่ำกริดลงบนยอดของแอนติซีรัมนาน 15 นาที ล้างอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นและซับจนแห้งจึงนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิ- เล คตรอน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาลักษณะอาการ

ตัวอย่างคาร์เนชั่นที่ชำไว้สังเกตุอาการนั้น พบว่า พันธุ์สีชมพูยังคงแสดงอาการด่างไม่ค่อยชัดเจน (motlle) ข้อปล้องสั้นทำให้แคระแกรน มีอาการยอดเหลือง (Fig. 2) ส่วนอีกพันธุ์ คือ Killer และ Paolar ไม่แสดงอาการใดๆ นอกจากเจริญเติบโตช้ากว่าต้นปกติ

2. ผลการศึกษาการถ่ายทอด

ต้น *C. quinoa* แสดงอาการแผลจุดตาย (local lesion) เริ่มจากเกิดจุดสีเหลืองบนใบ หลังจากปลูกเชื้อไปแล้วประมาณ 7-8 วัน (Fig. 4) แล้วเปลี่ยนเป็นจุดสีน้ำตาลแห้งตายในที่สุด ต้นกล้าคาร์เนชั่นจะมีอาการใบยอดเหลือง หลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 15-20 วัน ต้นมีการเจริญเติบโตช้าข้อปล้องสั้นกว่าปกติ ดังนั้นเชื้อนี้ถ่ายทอดได้ดีด้วยวิธีกล หรือการสัมผัส

3. ผลการศึกษาลักษณะรูปร่างของเชื้อ

เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอน พบอนุภาคของเชื้อไวรัสทรงกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 28 nm (Fig. 6)

4. ผลการศึกษาพืชอาศัย

Table 1 แสดงผลการศึกษาพืชอาศัยของเชื้อไวรัส

5. ผลการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ

เชื้อไวรัสนี้มีคุณสมบัติทางกายภาพดังนี้คือ

5.1 มี thermal inactivation point ที่ 90 °C

5.2 มี dilution end point ที่ 10^{-5}

5.3 มี longivity in vitro เท่ากับ 50 วัน

6. ผลการแยกเชื้อ CaMV

เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบอนุภาคทรงกลมของไวรัสที่บริสุทธิ์ (Fig. 6) เมื่อ

Table 1. The result of hostrange studying of the virus.

Plant	Age (day)	After innoculation (day)	Symptom	EM
1. *Chenopodium amaranticolor*	30	7-8	L	+
2. *C. quinoa*	30	7-9	L	+
3. *Gomphrena globosa*	30	10	L	+
4. *Nicotiana tabagum*	35	-	-	-
5. *N. glutinosa*	40	-	-	-
6. *Dianthus caryophyllus* (pink color var.)	25	17-20	Y, Mot	+
7. Charming var.	25	20	Mot	+
8. Killer var.	25	>20	mask symptom	+
9. Paola var.	25	20	Mot	+
10. Laguna var.	25	>20	mask symptom	+
11. White sin var.	25	17	Y	+
12. *Cassia occidentallis*	30	-	-	-
13. *Datura stramonium*	30	-	-	-
14. *Petunia* sp.	30	-	-	-

L = locak lesion, Y = yellow tip, Mot = mottle,
+ = virus particles were detected by EM

นำไวรัสที่แยกได้แต่ละครั้งมาวัดค่าความเข้มข้นด้วย spectophotometer โดยใช้สูตร

$C = OD_{260}/E$

OD_{260} = optical density ที่ 260 nm อ่านได้จาก spectrophotometer

C = ค่าความเข้มข้นของอนุภาคไวรัส หน่วยเป็น mg/ml

E = ค่า extinction coefficient ของไวรัส OD_{260} ใช้ค่า E โดยประมาณเท่ากับ 5

จะได้ค่าความเข้มข้นของไวรัส

= 0.436 x 100 / 5 = 8.7 mg/ml

สำหรับ E=5 เป็นค่าโดยประมาณจากค่า E ของไวรัสที่มีอนุภาคทรงกลม ขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 28-29 nm ซึ่งมีค่าอยู่ในระหว่าง 5-6.9 เป็นส่วนใหญ่ อันได้แก่ Cucumber mosaic virus มี E=5 (Francki 1979), Black gramm mottle virus มี E=5.16 (Scott 1981), Brome mosaic virus มี E=5.15 (Lane 1977), Cucumber leafspot virus มี E=5.63 (Weber 1986),Solanum nodiflorum mottle virus มี E=5 (Greber 1986) ดังนั้น E=5 ที่ใช้จึงเป็นค่าโดยประมาณ เพื่อประมาณค่าความเข้มข้นของสารละลายไวรัส ก่อนนำไปฉีดเข้ากระต่ายเท่านั้นและมีค่า $OD_{260/280}$ = 1.46

7. และ 8. ผลการผลิตแอนติซีรัมและการตรวจสอบคุณภาพ IgG และ IgG-enzyme conjugate โดย ELISA

จากการตรวจความเข้มข้นของ IgG และ IgG-enzyme conjugate ที่เตรียมได้จากแอนติซีรัมที่เจาะในครั้งที่ 4 และ 5 นั้น วัดค่า OD_{280} ได้เท่ากับ 6.8 และ 7.1 ตามลำดับ เมื่อนำมาเจือจางให้มีค่า OD_{280}= 1.4 ผลของการตรวจคุณภาพด้วยวิธี Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) โดยเจือจาง IgG และ IgG-conjugate ที่ความเข้มข้นของทั้งสอง ที่ 1:250, 1:500, 1:1,000 1:10,000 1:20,000 1:50,000 และ 1:100,000 ตามลำดับพบว่า แม้จะเจือจาง IgG ที่ $1:20^4$ ยังคงให้ปฏิกิริยาเป็นบวกกับ IgG-conjugate ที่เจือจางที่ $1:10^4$

9. ผลการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา

จากการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าอนุภาคของไวรัสทรงกลมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 28 nm ถูกห่อหุ้มด้วยแอนติซีรัมที่ติดสีดำของ 2% uranyl acetate อย่างชัดเจนทั้งหมด จะเห็นได้ว่าเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคมีปฏิกิริยาทาง

เซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของ CaMV (Fig.7) แต่ไม่มีลักษณะเช่นนี้กับแอนติซีรัมของ CaRSV

สรุปผลการทดลอง

เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบไวรัสชนิดนี้กับไวรัสสาเหตุที่ทำให้คาร์เนชั่น เป็นโรคที่มีรายงานไว้นั้นไวรัสชนิดนี้มีคุณสมบัติหลายข้อใกล้เคียงกับ CaRSV มาก เช่นการถ่ายทอด ลักษณะรูปร่างของเชื้อชนิดของพืชทดสอบ และลักษณะอาการ เพียงแต่ไม่มีความสัมพันธ์กันทางเซรุ่มวิทยา

ส่วน Carnational cryptic virus (CaCV) ถึงแม้ว่าจะมีขนาดและรูปร่างของอนุภาคของเชื้อใกล้เคียงกันมากกับไวรัสชนิดนี้ แต่ CaCV ถ่ายทอดโดยทางเมล็ดอย่างเดียว ไม่ถ่ายทอดโดย mechanical inoculation ซึ่งต่างกันมาก ส่วนไวรัสของคาร์เนชั่นอีกสามชนิดนั้นมีอนุภาคเป็นท่อนยาวคด

จากผลการศึกษาทั้ง 8 หัวข้อนั้นพอจะสรุปได้ว่า เชื้อไวรัสสาเหตุโรคของคาร์เนชั่นนี้เป็นไวรัสชนิดเดียวกับ CaMV ที่มีอนุภาครูปทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลางโดยเฉลี่ย 28 nm ถ่ายทอดได้ง่ายโดย mechanical inoculation มีพืชทดสอบและคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมือนกัน ที่สำคัญมีปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยากับแอนติซีรัมของ CaMV ที่ผลิตได้นี้ พบว่ามีเชื้อ CaMV ติดเข้ามาในเปอร์เซ็นต์สูง แต่เมื่อดอกหมดอายุการปักแจกันก็ถูกทิ้งไป ไม่มีผลต่อการแพร่ระบาดของโรค แต่ถ้าเป็นกิ่งพันธุ์ที่สั่งเข้ามาเพื่อปลูกหรือขยายพันธุ์นับว่ามีความสำคัญจึงควรมีการตรวจสอบต้นพันธุ์เหล่านั้น ดังนั้นแอนติซีรัมที่ผลิตได้จึงเป็นประโยชน์ที่จะนำไปจัดทำเป็น ELISA KIT เพื่อสะดวกในการใช้ตรวจวินิจฉัยไวรัสบนคาร์เนชั่นในที่ต่างๆ ได้ (Fig. 3)

เอกสารอ้างอิง

สุรภี กีรติยะอังกูร ปิยะนันท์ ไวมาลา และ นวลจันทร์ ดีมา. พ.ศ. 2534. การจำแนกชนิดของโรคใบด่างและแคระแกรนที่เกิดจากไวรัสของคาร์เนชั่น. รายงานประจำปี กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร ปี พ.ศ. 2535. 130 หน้า.

Clark, M. F.. 1981 . Immunosorbent Assay in Plant Pathology. Ann. Rev. Phytopathol. 19:83- 106.

Derrick, K. S. 1972. Immuno-specific gride for electron microscopy of plant viruses. Phytopathology 62:753 (abstr).

Derrick ,K S. 1973. Quantitative assay for plant viruses serologically specific electron microscopy. Virology 56:652-653.

Francki, R.I.B., R.G. Milne and T. Hatta. 1985. Atlas of Plant Viruses. Volume II. pp. 284.

Francki. R. I. B. , D.W. Mossop and T Hatta. 1979. Cucumber Mosaic Virus. C.M.I./ A.A.B. Description of viruses No 213.

Greber, R.S. and J. W. Randles. 1986. Solanum Nodiflorum Mottle virus. AAB Description of Plant Viruses No. 138.

Hollings, H. and O.M.Stone. 1970. Carnation Mottle Virus. C.M. I./ A.A.B. Description of Plant Viruses. No. 7.

Hollings, M. and O. M. Stone.1970. Carnation Ringspot Virus. C.M.I./ A.A.B. Description of Plant virus. No. 21.

Hollings, M. and O. M. Stone. 1971. Carnation Vein Mottle Virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Virus No. 78.

Inovye, T. 1974. Carnation Necrotic Fleck virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant viruses. No. 136.

Lane, L.C. 1977. Brome Mosaic Virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses No. 180.

Lawson, R.H., S.S. Hearon and E.L. Civerolo. 1977. Carnation etched ring virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses. No. 182.

Lisa, V., E. Luisoni and R.G.Milne. 1986. Carnation Cryptic virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant viruses. No. 315.

Milne, R.G. and E. Luisoni. 1977. Rapid Immuno-electron microscopy of Preparations. Methods in Virology 6:265-281.

Reddy, D.V.R. 1989. Principal Vorologist, Laboratory Exercises. pp. 15.

Scott, H.A. and J.W.Hoy. 1981. Blackgrame Mottle Virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses No. 237.

Weber, I, 1986. Cucumber leaf spot Virus. AAB Description of Plant Viruses No. 319.

Wetter, C. 1971. Carnation Latent Virus. C.M.I./A.A.B. Description of Plant Viruses No. 7.

Identification of CaMV the Cause of Mottle and Stunt on Carnation in Thailand

Fig. 2. Yellow mosaic and mottle on carnation caused by CaMV.

Fig. 3. ELISA Kit for detecting CaMV

Fig. 4. Local lesion symptom on *C. quinao* after inoculation with CaMV 12 days.

Fig. 5. Local lesion symptom on *C. amaranticolor* after inoculation with CaMV 12 days.

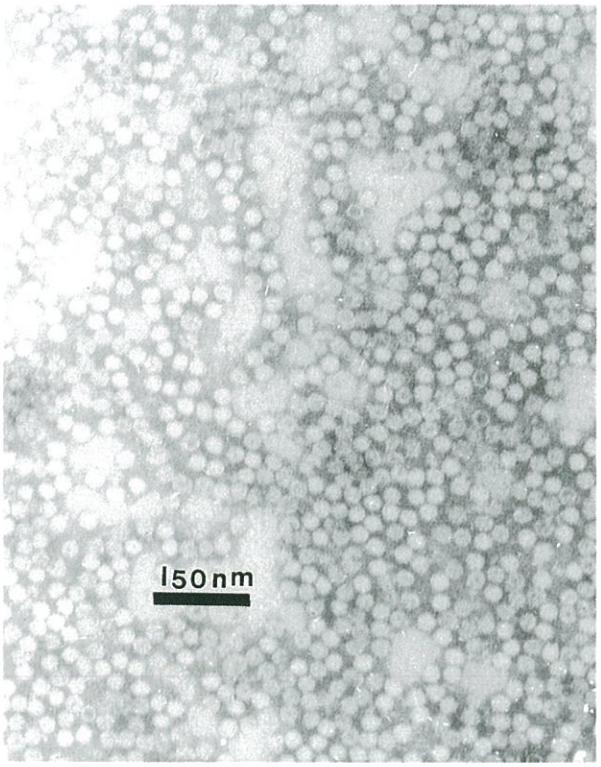

Fig. 6. Purified preparation of CaMV stained with 2% phosphotungstic acid.

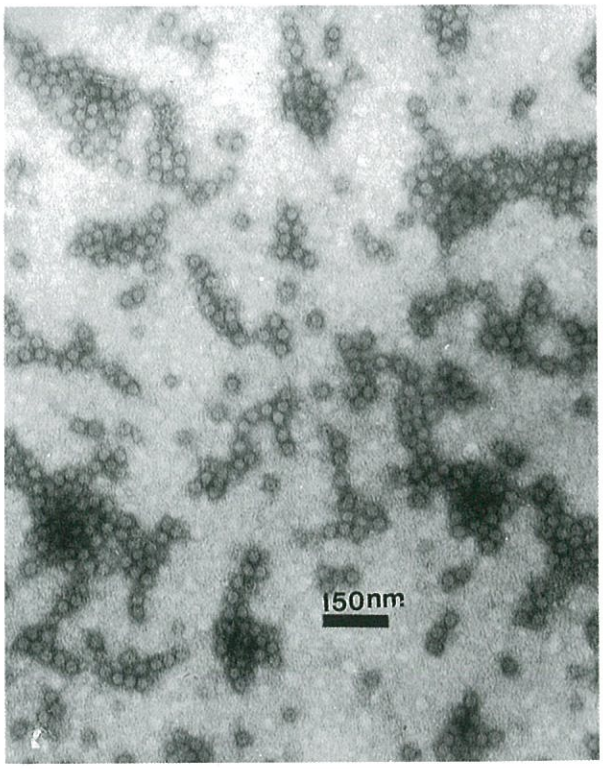

Fig. 7. ISEM of CaMV particles stainning with 2% Uranyl acetate.