วันที่ เดือน - 6 มิ.ย. 2543

# รายงานวิจัย

## เรื่อง การควบคุมโรคทริสเตซาในส้มจุกโดยการปลูกเชื้อสายพันธุ์ไม่รุนแรง

**(Control of Citrus Tristeza Virus in Neck Orange by Inoculation with Mild Strain)**

โดย

รัตนา สดุดี

มงคล แซ่หลิม

สุภาพ เกียรติทับทิว

Order Key 28453
BIB Key 176353
สมอ
เลขหมู่ SB370.N4 T63
เลขทะเบียน ม43 ร.1
6 มิ.ย. 2543

มกราคม 2543

คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

# บทคัดย่อ

ในการค้นหาเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง ได้ทำการแยกเชื้อไวรัสจากส้มชนิดต่าง ๆ 6 ชนิด คือ ส้มจุก ส้มเขียวหวาน ส้มโชกุน ส้มโอ ส้มจี๊ด และมะนาว จากแหล่งปลูกส้มในจังหวัดเชียงราย จันทบุรี ปทุมธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา ได้รวมทั้งสิ้น 64 สายพันธุ์ แยกเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้โดยวิธี graft transmission 63 สายพันธุ์ และโดยวิธี insect transmission 1 สายพันธุ์ จากการตรวจสอบระดับความรุนแรงของสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสบนพืชทดสอบมะนาว พบว่ามีสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัส 28 สายพันธุ์ ทำให้เกิดอาการเส้นใบใสเพียงเล็กน้อย ซึ่งมีแนวโน้มว่าจะเป็นสายพันธุ์ไม่รุนแรง รวมทั้งสิ้น 28 สายพันธุ์

จากการใช้ monoclonal antibodies 2 ชนิด คือ McAb 10E3 และ McAb 4H6 ซึ่งตอบสนองต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์รุนแรงและไม่รุนแรงตามลำดับ พบว่าสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสในส้มจุกจำนวน 1 สายพันธุ์ ตอบสนองต่อ McAb 4H6 เพียงอย่างเดียว แต่ส้มจุกที่ติดเชื้อดังกล่าวมีอาการของโรคที่รุนแรง และพบสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสในส้มจุกและส้มโชกุนอย่างละ 1 สายพันธุ์ตอบสนองต่อ monoclonal antibodies ทั้งสองชนิด ดังนั้น Mc Ab 4H6 ไม่สามารถใช้แยกแยะทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงซึ่งปรากฏในประเทศไทยได้

ในการวิเคราะห์แถบ ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัสซึ่งแยกได้จากส้มจุก ส้มจี๊ด และส้มโอ พบว่าจำนวนแถบของ ds RNA ของทริสเตซาไวรัสที่ทำให้เกิดโรคในส้มจี๊ดและส้มจุกมีจำนวนเท่ากัน แต่จะแตกต่างจากทริสเตซาไวรัสจากส้มโอ นอกจากนี้แถบของ ds RNA ซึ่งสกัดจากเชื้อทริสเตซาไวรัสที่พบในส้มจุก 3/3 ซึ่งให้อาการระดับไม่รุนแรงบนพืชทดสอบ ไม่แตกต่างจากแถบของ ds RNA ของทริสเตซาไวรัสอื่น ๆ ที่เข้าทำลายส้มจุก แต่เมื่อใช้ polyclonal antibodies โดยเทคนิค immunogold labelling ตรวจหาอนุภาคทริสเตซาไวรัสในส้มจุก 3/3 พบว่าเม็ดทองที่จับเกาะบนอนุภาคไวรัสมีจำนวนน้อยกว่าเม็ดทองที่เกาะบนทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อื่นเมื่อใช้ antibodies ในระดับความเข้มข้น 1:10 เท่ากัน

จากสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสที่ผ่านการทดสอบระดับความรุนแรงของโรคบนพืชทดสอบมะนาวและมีแนวโน้มว่าเป็นสายพันธุ์ไม่รุนแรงจำนวน 28 พันธุ์ ได้ทำการคัดเลือกเพียง 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จากส้มจุก 3/3 แล้วทำการ preinoculate ลงบนส้มจุกเพื่อชักนำให้เกิดภูมิต้านทานต่อสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสที่ให้อาการของโรครุนแรง พบว่าไม่สามารถ preinoculate สายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสจากส้มจุก 3/3 โดยวิธี grafting ลงบนต้นกล้าส้มจุกปกติได้ ทำให้ไม่สามารถประเมินผลการป้องกันโรคของทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวได้

# Abstract

Total of 64 tristeza virus isolates obtained from Neck orange, Siam mandarin, Shogun mandarin, Pomelo, Calamondin and Acid lime were collected from Chiang Rai, Janthaburi, Pratumthani, Nakorn Srithamarat, and Songkhla. Sixty-three isolates were isolated by graft transmission and 1 isolates by insect transmission. Among these, 28 isolates induced mild vein clearing symptom on index plant (Acid lime).

Two monoclonal antibodies, McAb 10E3 and McAb 4H6 specific to mild and severe strains of citrus tristeza virus (CTV), respectively were used to discriminate the mild strain. We found that one isolate of CTV from Neck orange No.3/3 reacted to McAb 4H6 but not to McAb 10E3. Two isolates from Neck orange and Shogun marin reacted to both monoclonal antibodies. However, the isolate reacted to McAb 4H6 only caused severe symptom on Neck orange.

Analysis of double stranded RNA of CTV extracted from Neck orange, Calamondin and Pomelo indicated that bands of CTV-ds RNAs from Neck oranges and Calamondins were similar but they were different from CTV-ds RNAs extracted from Pomeloes. When ds RNA of CTV showing mild symptom in the Neck orange No 3/3 was compared to other isolates from Neck orange, it was found that they were identical. Incontrast, immunogold labelling using CTV polyclonal-antibodies showed that number of gold particles deposited on CTV particles trapped from Neck orange No. 3/3 was lower than the number of gold particle associated with CTV particles from other isolates although the same concentration of the antibodies were applied.

Among 28 isolates of CTV showing mild symptom in Acid lime, only 1 isolate (the isolation from Neck orange 3/3) was selected according to evidence from immunogold labelling to be used for preimmunization against the severe strain of CTV. However, in this experiment we failed to preinoculate CTV isolate from Neck orange 3/3 into healthy Neck orange seedling by grafting. Therefore, we could not evaluate protection ability of this isolate to the severe strain.

# สารบัญเรื่อง


กิตติกรรมประกาศ ก

บทคัดย่อ ข

Abstract ค

สารบัญเรื่อง ง

สารบัญตาราง จ

สารบัญภาพ ฉ

คำนำ 1

ตรวจเอกสาร 2

**โครงการย่อยที่ 1 : ศึกษาการแยกสายพันธุ์ทริสเตซา**

- อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 5
- ผลการทดลอง
- การแยกเชื้อทริสเตซาไวรัส 9

1. การตรวจแยกเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง 9

**โครงการย่อยที่ 2 : การป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อทริสเตซาไวรัส สายพันธุ์ไม่รุนแรง (severe strain) โดย preinoculation ต้นส้มจุกด้วย mild strain**

- อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 21
- ผลการทดลอง

1. Preinoculation เชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง ลงต้นส้มจุกโดยวิธี leaf grafting 22
2. การตรวจการติดเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง ในส้มจุกพืชทดสอบโดยเทคนิค ELISA 22

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 24

ภาคผนวก 29

# สารบัญตาราง


| | | |
|---|---|---|
| ตารางที่ 1 | แสดงเชื้อทริสเตซาไวรัส (citrus tristeza virus) ที่แยกได้จากส้มชนิดต่าง ๆ โดยวิธี graft transmission | 12 |
| ตารางที่ 2 | แสดงอาการและระดับความรุนแรงของเชื้อทริสเตซาไวรัสแยกจากส้มชนิดต่าง ๆ เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นบนพืชทดสอบมะนาว | 13 |
| ตารางที่ 3 | การตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) โดยเทคนิค ELISA และใช้ monoclonal antibodies (MAb) | 18 |
| ตารางที่ 4 | แสดงผลการปลูกเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง (preinoculation) ลงบนส้มจุกโดยวิธี leaf grafting | 23 |

# สารบัญภาพ


| | | |
|---|---|---|
| ภาพที่ 1 | แสดงอาการ vein clearing บนพืชทดสอบมะนาว ซึ่งเกิดจากเชื้อทริสเตซาไวรัส | 10 |
| ภาพที่ 2 | แสดงอาการ corky leaves บนพืชทดสอบมะนาว ซึ่งเกิดจากเชื้อทริสเตซาไวรัส | 10 |
| ภาพที่ 3 | แสดงอาการ mild vein clearing บนพืชทดสอบมะนาว | 11 |
| ภาพที่ 4 | ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron micrograph) แสดงอนุภาคทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง แยกจากส้มจุก 3/3 ดักจับด้วยเทคนิค immunogold labeiling | 17 |
| ภาพที่ 5 | แสดง double stranded RNA ของ Fiji disease virus และเชื้อทริสเตซาไวรัส | 19 |
| ภาพที่ 6 | เปรียบเทียบแถบ (bands) ของ double stranded RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัส สกัดจากส้มชนิดต่าง ๆ | 20 |

# คำนำ

ส้มเป็นไม้ผลที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากให้ผลตอบแทนแก่เกษตรกรสูง จึงทำให้มีการเพิ่มพื้นที่ปลูกมากขึ้น ทั้งในภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศไทย สำหรับภาคใต้ของประเทศไทยซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของส้มที่สำคัญชนิดหนึ่งคือ ส้มจุก ในอดีตส้มจุกทำรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ปลูกในเขตจังหวัดสงขลา และใกล้เคียงไม่ต่ำกว่า 10 ล้านบาทต่อปี ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2507 เป็นต้นมา พื้นที่การเพาะปลูกส้มจุกลดลงอย่างมาก สืบเนื่องจากปัญหาโรคโทรม และเชื้อสาเหตุที่สำคัญชนิดหนึ่งของโรคนี้คือ ทริสเตซา-ไวรัส ดังนั้นเพื่อเป็นการฟื้นฟูการปลูกส้มจุกในภาคใต้อีกครั้ง จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาทางควบคุมเชื้อทริสเตซาไวรัสสาเหตุของโรคไม่ให้ทำความเสียหายกับส้มจุก คณะนักวิจัยของคณะทรัพยากรธรรมชาติ ได้เลือกที่จะใช้วิธีการควบคุมเชื้อดังกล่าวโดยไม่ให้มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม โดยการค้นหาเชื้อไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) ซึ่งมีอยู่ในธรรมชาติ เพื่อจะนำมาใช้เป็นภูมิคุ้มกันไม่ให้ไวรัสสายพันธุ์รุนแรงเข้าทำลายซ้ำ ซึ่งจะทำให้การผลิตส้มจุกประสบผลสำเร็จ เพราะไม่ถูกรบกวนจากโรคโทรม และช่วยเพิ่มพูนรายได้ให้กับเกษตรกรในภาคใต้ที่สนใจจะขยายพื้นที่ปลูกไม้ผลเพื่อทดแทนยางพาราซึ่งมีราคาตกต่ำลง การวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจากหมวดเงินอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2535-2537 ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

# ตรวจเอกสาร

ส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) เป็นส้มที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว คือ มีกลิ่นหอม ลักษณะผลจะโตเท่าส้มเขียวหวาน มีเปลือกหนา มีขั้วผลที่ปุ่มยื่นยาวออกมาคล้ายจุก จึงมีชื่อเรียกตามภาษาท้องถิ่นภาคใต้ว่า ส้มแป้นหัวจุก แหล่งปลูกดั้งเดิมอยู่ในเขตอำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา ซึ่งเคยมีพื้นที่ปลูกรวมประมาณ 5,000 ไร่ ต่อมาได้ขยายการปลูกไปยังแหล่งอื่น ๆ เช่น อำเภอหาดใหญ่ และอำเภอนาทวี รวมทั้งจังหวัดอื่น ๆ ในภาคใต้ เช่น ยะลา นครศรีธรรมราช ชุมพร และในภาคกลาง เช่น เพชรบุรี ระยอง และจันทบุรี แต่ปรากฏว่าการเจริญเติบโตไม่ดีเท่าที่ปลูกในภาคใต้ (สำนักงานพาณิชย์ จังหวัดสงขลา, 2536) ปัจจุบันพื้นที่ปลูกส้มจุกลดน้อยลง โดยมีพื้นที่ปลูกรวมทั้งประเทศ 1,416 ไร่ แยกเป็นพื้นที่ปลูกในจังหวัดสงขลา และจังหวัดนครศรีธรรมราช 1,038 และ 300 ไร่ ตามลำดับ (ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร, 2537) และพบว่าโรคโทรมเป็นสาเหตุสำคัญที่ ทำให้การปลูกส้มจุกลดน้อยลง (มงคล และคณะ, 2530)

สำหรับลักษณะอาการของโรคโทรมของส้มจุก ประกอบด้วยอาการหลักคือใบเหลือง ขณะที่เส้นใบเขียว กิ่งแห้งจากปลายยอด ต้นทรุดโทรม และแห้งตายในที่สุด นอกจากนี้ยังพบอาการเส้นใบใส อาการใบด่าง และอาการลำต้นปุ่มเป็นรู อาการใบเหลืองที่เกิดขึ้นในส้มจุกคล้ายคลึงกับโรคส้มที่เกิดจากเชื้อกรีนนิ่งแบคทีเรีย (da Graca, 1991 และ Schwarz et al., 1993) ในส่วนของอาการใบใส ใบด่าง และลำต้นปุ่ม มีรายงานว่าเป็นอาการของโรคส้มที่เกิดจากเชื้อทริสเตซาไวรัส (Knorr et al., 1993 และ Roistacher, 1991) อาการทรุดโทรมและกิ่งแห้งนั้นก็ถูกระบุว่าเกิดขึ้นกับต้นส้มที่เป็นโรคกรีนนิ่ง (da Graca, 1991) ในขณะเดียวกันพบอาการดังกล่าวเกิดขึ้นกับส้มที่ติดเชื้อทริสเตซา (Roistacher, 1991) รัตนา สดุดี (2537) รายงานว่าโรคโทรมของส้มจุกเกิดจากเชื้อจุลินทรีย์สองชนิด คือ กรีนนิ่งแบคทีเรีย และทริสเตซาไวรัส ส้มจุกที่ติดเชื้อชนิดใดชนิดหนึ่งมีความรุนแรงของโรคน้อยกว่าการติดเชื้อร่วมกันทั้งสองชนิด ในการติดเชื้อร่วมกับอาการที่เกิดจากเชื้อกรีนนิ่งจะข่มอาการของทริสเตซา นอกจากนี้พบอาการแห้งตายอย่างรวดเร็ว เกิดขึ้นกับต้นส้มจุกที่ใช้ต้นตอเป็นส้มจี๊ด (*Citrus mitis* Blanco) แล้วติดเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ลำต้นปุ่มคล้ายคลึงกับการตายของส้มสวีทออเรนจ์ (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) ที่เสียบยอดบนต้นตอซาวร์ออเรนจ์ (*Citrus aurantium* L.) และติดเชื้อทริสเตซาสายพันธุ์รุนแรงซึ่งเกิดขึ้นในประเทศบราซิล (Bar-Joseph and Lee, 1989 ; Roistacher, 1991 และ Roistacher and Moreno, 1991)

สำหรับการแพร่กระจายของเชื้อสาเหตุโรคโทรมของส้มจุกทั้งสองชนิดติดไปกับท่อนขยายพันธุ์และมีแมลงพาหะเป็นตัวแพร่กระจาย เพลี้ยอ่อนส้ม *Toxoptera citricidus* Kirk., *T. aurantii* B. de F (Hermoso de Mendoza et al., 1984) และเพลี้ยอ่อนฝ้าย *Aphis gossipii* Glov. เป็นแมลงพาหะที่สำคัญของทริสเตซาไวรัส สำหรับกรีนนิ่งแบคทีเรียแมลงพาหะคือ เพลี้ยไก่แจ้ (*Diaphorina citri* Kuwuyama) และมีรายงานของแมลงพาหะดังกล่าวในประเทศไทย (Knorr et al., 1973 และ Schwartz et. al., 1973 ; Sdoodee and Garnett, 1994)

เมื่อทราบสาเหตุของโรคและวิธีการแพร่กระจายของเชื้อแล้ว ในการควบคุมโรคโทรมให้ได้ผล จะต้องเริ่มต้นที่กิ่งพันธุ์ที่ใช้ปลูกต้องปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด ซึ่งการให้ได้มาซึ่งกิ่งพันธุ์ส้มจุกที่ปลอดเชื้ออาจทำได้โดยการใช้ต้นกล้าที่ได้จากการเพาะเมล็ดและเพาะเลี้ยงไว้ในโรงเรือนปลอดแมลง หรือขยายพันธุ์มาจากต้นแม่ที่ปลอดเชื้อ และดูแลรักษาให้ปลอดจากแม่พาหะ แต่เนื่องจากเมื่อนำกิ่งพันธุ์ปลอดเชื้อเพื่อลงปลูกในแปลง ในแปลงปลูกต้นส้มจุกปลอดเชื้อและที่มีโอกาสที่จะติดเชื้อ โดยแมลงเป็นตัวนำพามา ดังนั้นจำเป็นต้องดูแลรักษาแปลงปลูกให้ปลอดจากแมลงพาหะและแหล่งสะสมของเชื้อสาเหตุ ซึ่งไม่อาจหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี ซึ่งจะมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม และมีพิษตกค้างในผลผลิตตลอดจนทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ทางด้านเชื้อกรีนนิ่งแบคทีเรียนั้นในต้นส้มจุกที่ติดเชื้อสามารถใช้ยาปฏิชีวนะจำพวกเตตราซัยคลินฉีดเข้าลำต้นทำลายเชื้อแบคทีเรียได้แต่ไม่เป็นผลดีต่อผู้บริโภค เพราะอาจมียาปฏิชีวนะตกค้างในผลส้ม ถึงแม้ในประเทศไทยไม่มีกฎหมายห้ามใช้ยาปฏิชีวนะในการผลิตพืช แต่ในหลายประเทศไม่ยินยอมให้ใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรคพืช ดังนั้นการป้องกันการติดเชื้อกรีนนิ่งน่าจะเป็นทางออกในการควบคุมเชื้อที่เกิดขึ้นมากกว่าการรักษา ซึ่งควรจะได้มีการศึกษาวิจัยต่อไป ทางด้านการควบคุมทริสเตซาไวรัสในส้ม ได้มีการค้นคว้าวิจัยอย่างกว้างขวาง และพบว่าการปลูกเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) ซึ่งทำให้เกิดอาการเพียงเล็กน้อยบนต้นส้ม จะสามารถป้องกันการติดเชื้อซ้ำด้วยสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) ซึ่งทำให้เกิดผลเสียหายอย่างมากกับต้นส้ม และพบว่าในหลายประเทศที่ผลิตส้มประสบผลสำเร็จเป็นอย่างยิ่งในการควบคุมโรคส้มที่เกิดจากทริสเตซาไวรัส (Broadbent et al., 1991 และ Stubb, 1964) โดยวิธีนี้

ดังนั้นจึงได้มีการดำเนินการวิจัยเพื่อควบคุมโรคทริสเตซาในส้มจุก โดยการปลูกเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่รุนแรง การวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง เพื่อนำมาปลูกเชื้อลงในกิ่งพันธุ์ส้มจุก เพื่อป้องกันการติดเชื้อซ้ำ นอกจากนี้การวิจัยยังครอบคลุมถึงการ

แยกแยะสายพันธุ์ทริสเตซาโดยการใช้ monoclonal antibody และวิธีอื่น ๆ สำหรับประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับทำให้สามารถป้องกันโรคโทรมในส้มจุกที่เกิดจากเชื้อทริสเตซาอย่างมีประสิทธิภาพ และสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อย ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และผู้บริโภค เป็นการพัฒนาเทคนิคการแยกสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสอย่างแม่นยำและใช้เวลาอันสั้น ตลอดจนช่วยฟื้นฟูการปลูกส้มจุกในภาคใต้

**โครงการย่อยที่ 1 : ศึกษาการแยกสายพันธุ์ทริสเตซาโดยใช้ monoclonal antibodies เพื่อแยกสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) ออกจาก severe strain โดยเปรียบเทียบกับลักษณะอาการที่เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นบนพืชทดสอบ**

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. การแยกเชื้อทริสเตซาไวรัส

1.1 การแยกเชื้อโดยวิธี graft transmission

นำกิ่งตาหรือใบจากต้นส้มชนิดต่าง ๆ ที่เป็นโรคที่เก็บมาจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย มาเสียบยอด (top grafts) ติดตา (budding) หรือการเชื่อมเนื้อเยื่อใบ leaf grafting (Roistacher, 1991) ลงบนต้นกล้ามะนาว (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.) ซึ่งเป็นพืชทดสอบ ใช้ต้นกล้าเพาะจากเมล็ดอายุ 6-12 เดือน ปลูกโดยใช้วัสดุเพาะและดินผสมที่ฆ่าเชื้อ (sterilize) ด้วยไอร้อน ซึ่งปลูกไว้ในเรือนกระจกปลอดแมลง พืชทดสอบภายหลังเสียบยอด ติดตา หรือทำ leaf grafting แล้ว นำมาดูแลรักษาต่อในเรือนกระจกปลอดแมลงควบคุมให้มีอุณหภูมิ 25-30°ซ. เพื่อตรวจดูอาการติดเชื้อทริสเตซาไวรัส 2-6 เดือน

1.2 การแยกเชื้อโดยวิธี insect transmission

นำเพลี้ยอ่อนส้ม (*Toxoptera aurantii* B. de. F.) ซึ่งเก็บจากต้นส้มจุก และส้มชนิดอื่นจากแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และสวนส้มจุกหมู่บ้านทรายขาว อำเภอจะนะ จังหวัดสงขลา มาเลี้ยงบนต้นกล้าส้มเขียวหวานปกติให้เป็น conoly ที่ปลอดจากเชื้อทริสเตซาไวรัส (Mendoza *et al.*, 1984) จากนั้นนำแมลงดังกล่าวไปดูดกินบนต้นส้มจุกที่ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัสเทคนิค ELISA โดยใช้กรงแมลงครอบลงบนกิ่งส้มแล้วปล่อยให้แมลงดูดกินใบส้ม 30-60 นาที แล้วย้ายแมลงมาดูดกินต้นกล้ามะนาวปกติเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นใช้ยาฆ่าแมลงฉีดพ่นเพลี้ยอ่อน นำต้นกล้ามะนาวที่ถูกเพลี้ยอ่อนดูดกินน้ำเลี้ยงไปเก็บไว้ในเรือนกระจกป้องกันแมลง เพื่อติดตามดูลักษณะอาการการติดเชื้อทริสเตซาไวรัส 2-6 เดือน

**2. วิธีการตรวจแยกทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง**

2.1 การตรวจแยกทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงโดยอาศัยลักษณะอาการบนพืชทดสอบ

ทำการตรวจอาการซึ่งทริสเตซาไวรัสเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นบนพืชทดสอบ (มะนาว) จากสายพันธุ์ไวรัสซึ่งแยกได้จากข้อ 1.1 และ 1.2 ลักษณะอาการที่ใช้เป็นตัววัดความรุนแรงของสายพันธุ์ทริสเตซาคืออาการเส้นใบใส (vein clearing) และอาการเส้นใบแตก (corky leaves) โดยให้ระดับเป็นไม่แสดงอาการ (-) แสดงอาการเพียงเล็กน้อย (+) แสดงอาการปานกลาง (++) และแสดงอาการรุนแรง (+++)

2.2 การตรวจแยกทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงโดยใช้ monoclonal antibodies (McAb)

ทำการตรวจแยกสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงจากต้นส้มจุกที่ปลูกในแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ โดยใช้ monoclonal antibodies (McAbs) 2 ชนิดคือ 10E3 ซึ่งเป็น McAb ที่ทำปฏิกริยากับสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และ 4H6 ทำปฏิกริยากับสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) ซึ่งผลิตโดย Prof. Hong-Ji Su, National Taiwan, University ในการตรวจแยกใช้เทคนิค ELISA ประเภท indirect double antibodies sandwich (I-DAS) ซึ่งพัฒนาให้ เหมาะสมกับการแยกสายพันธุ์เชื้อทริสเตซาไวรัสโดย Tsai (1989) การเตรียมน้ำคั้นจากเส้นกลางใบส้มจุกทำโดยบดเส้นกลางใบหนัก 0.5 กรัม ในบัพเฟอร์ (extraction buffer) 4.5 มิลลิลิตรด้วยครกบด และกรองด้วยผ้าขาวบาง ในการดักจับเชื้อทริสเตซาไวรัสในน้ำคั้นในขั้นตอนแรกใช้ polyclonal antibodies ที่เจือจาง 1:3000 แล้วจึงใช้ monoclonal antibodies ที่เจือจาง 1:1000 ทำปฏิกริยากับอนุภาคไวรัสที่จับได้ แล้วตรวจปฏิกริยาระหว่างไวรัสและ monoclonal antibodies โดยใช้ enzyme labelled secondary antibodies (alkaline phosphatase conjugated goat antimouse antibodies) เจือจาง 1:2000 ย่อยสลาย p-nitrophynylphosphate) ให้สีเหลืองออกมา แล้วตรวจวัดสีด้วยเครื่องดูดกลืนแสง Titertex Uniskan I ที่ A 405 nm

2.3 การตรวจแยกเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงโดยเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์

อุปกรณ์และวิธีการการตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์อยู่ในรายงานวิจัยการตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสในส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) โดยเทคนิค-อิมมูโนโกลเลเบลลิงค์ในภาคผนวก

2.4 การตรวจแยกทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงโดยการวิเคราะห์ double stranded RNA (ds RNA)

2.4.1 แหล่งของเชื้อไวรัสที่ใช้สกัด ds RNA

ใช้เชื้อทริสเตซาไวรัส (CTV) จากต้นส้มจุก ส้มจี๊ด ส้มโอ ส้มโชกุน และมะกรูดหวาน จากแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และใช้เชื้อฟิจิไวรัส (Fiji disease virus) จากต้นอ้อยที่เป็นโรคจากกลุ่มงานไวรัส กองวิจัยโรคพืช กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นตัวเปรียบเทียบ

2.4.2 วิธีการสกัด ds RNA

ในการสกัด ds RNA จากเชื้อไวรัสในการทดลองครั้งนี้ใช้วิธีการของ Dodd et al (1987) และวิธีการของ Queensland University of Technology (QUT, 1991)

2.4.2.1 วิธีการของ Dodd et al (1987)

บดเปลือกซึ่งลอกจากกิ่งส้มที่ยังคงสีเขียวจำนวน 2 กรัมในไนโตรเจนเหลว บดจนเป็นผงละเอียดแล้วเติม STE buffer (1 เท่า STE buffer = 0.1M sodium chloride, 0.05 M Tris, 1 mMEDTA, pH6.8) ความเข้มข้น 2 เท่าจำนวน 4 มล. STE saturated phenol 6 มล. 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) 0.6 มล. และ bentonite ที่มีความเข้มข้น 25 มก.ต่อมล. 0.2 มล. แล้วนำส่วนผสมไปกวนที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifugation) ที่ 8000 g นาน 15 นาที นำของเหลว (supernatant) ที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงมาปรับปริมาณให้เป็น 10 มล. ด้วย STE buffer แล้วเติม 95% ethanol 2.1 มล. ลงไปทำให้ได้ของเหลวที่มีความเข้มข้นของ ethanol 16% จากนั้นเติม CF-11 cellulose powder ในอัตรา 1 กรัม ต่อ 5 มล.ของเหลว คนให้เข้ากันประมาณ 15 นาที นำไปบรรจุลงในคอลัมภ์ (ใช้หลอดฉีดยาชนิดพลาสติคขนาด 25 มล.) ล้างคอลัมภ์ด้วย STE buffer ที่มี ethanol ผสมอยู่ 16% ปริมาตร 30 มล. แล้วชะ (elute) เอา ds RNA ออกจาก CF-11 โดยใช้ STE buffer 6 มล. ซึ่งปราศจากแอลกอฮอล์ล้างคอลัมภ์ ให้ทิ้งของเหลวปริมาตร 2 มล.แรกที่ไหลออกจากคอลัมภ์แล้วเก็บของเหลวที่ไหลตามมาซึ่งจะมี ds RNA ถูกชะออกมา จากนั้นนำไปตกตะกอน (precipitation) ด้วย 95% ethanol ปริมาตร 3 เท่า และ 3M sodium acetate pH 5.5 ปริมาตร 0.1 เท่าของของเหลวที่ชะออกมา จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. หนึ่งคืน ครบเวลานำมาหมุนเหวี่ยงที่ 8000 g นาน 30 นาที นำตะกอน (pellet) ds RNA ที่ได้ละลายใน electrophoresis buffer (0.004 M Tris, 0.02 M sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 7.8) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วเก็บไว้ที่ -20°ซ. ก่อนนำไปวิเคราะห์

2.4.2.2 วิธีการของ Queensland University of Technology (1991)

นำเปลือกซึ่งลอกจากกิ่งส้ม (เช่นเดียวกับวิธี 2.1) และปมที่ตัดจากใบอ้อยที่เป็นโรคฟิจิจำนวน 5 กรัม มาบดให้เป็นผงละเอียด เติม STE buffer 20 มล. phenol:chloroform (1:1) 20 มล. และ 10%SDS 5 มล. ลงในผงที่บดแล้วนำไปปั่นในเครื่องปั่นอาหารนาน 1 นาที จากนั้นนำไปคนที่ 4°ซ. นาน 30 นาที ขั้นตอนที่เหลือดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีของ Dodd et al (1987) ยกเว้นแต่การเติม CF-11 cellulose power ใช้อัตรา 0.15 กรัม CF-11 ต่อ 1 กรัมของเนื้อเยื่อพืชที่ใช้ และเมื่อได้ตะกอน ds RNA แล้วให้ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 1 มล. โดยการนำไปหมุนเหวี่ยงใน Microfuge นาน 15 นาที แล้วเทแอลกอฮอล์ทิ้งไปทำให้ตะกอนแห้งโดยใช้ vacuum เมื่อตะกอนแห้งดีแล้วให้ละลายด้วย TE buffer (10 mM Tris, pH 8 และ 1mM EDTA) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เก็บไว้ที่ -20°ซ. ก่อนนำไปวิเคราะห์

2.4.2.3 การวิเคราะห์ ds RNA

นำตัวอย่าง ds RNA ที่สกัดได้จากเชื้อ CTV ไปตรวจดูแถบ (band) โดยวิธี electrophoresis ใน 6% continuous polyacrylamide gel (acrylamide : bisacrylamide = 40:1, v/v) ใช้กำลังไฟฟ้า 100 โวลต์นาน 3 ชม. หรือใน 5% stacking/10% resolving polyacrylamide gel ใช้กำลังไฟฟ้า 200 โวลต์ นาน 45 นาที แล้วย้อมแผ่นเจลด้วย silver stain (Silver Stain Plus Kit, Bio-Rad) แล้วตรวจแถบ ds RNA ที่ปรากฏบนแผ่นเจลด้วยแสงธรรมดา (visible light) หรือย้อมแผ่นเจลด้วย ethidium bromide แล้วตรวจแถบ ds RNA โดยใช้แสง UV จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างของแถบ ds RNA ของเชื้อทริสเตซาในแต่ละสายพันธุ์ โดยมี ds RNA ของเชื้อ Fiji disease virus เป็นตัวเปรียบเทียบ

# ผลการทดลอง

## 1. การแยกเชื้อทริสเตซาไวรัส

1.1 การแยกเชื้อโดยวิธี graft transmission

ทำการแยกเชื้อทริสเตซาไวรัสได้รวมทั้งสิ้น 63 สายพันธุ์ (isolate) จากส้ม 6 ชนิดคือ ส้มจุก ส้มเขียวหวาน ส้มโอ ส้มโชกุน ส้มจี๊ด และมะนาว ซึ่งเก็บจากแหล่งปลูกส้มในจังหวัดเชียงราย จันทบุรี ปทุมธานี นครศรีธรรมราช และสงขลา แบ่งเป็นสายพันธุ์จากส้มจุก จำนวน 27 สายพันธุ์ ส้มเขียวหวาน 6 สายพันธุ์ ส้มโอ 4 สายพันธุ์ ส้มโชกุน 14 สายพันธุ์ ส้มจี๊ด 3 สายพันธุ์ และมะนาว 9 สายพันธุ์ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

1.2 การแยกเชื้อโดยวิธี insect transmission

สามารถแยกเชื้อทริสเตซาไวรัสโดยวิธีนี้ได้เพียง 1 isolate โดยสายพันธุ์ที่แยกได้เป็นสายพันธุ์ที่เข้าทำลายต้นส้มจุกในแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

## 2. การตรวจแยกเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง

2.1 การตรวจแยกทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง โดยอาศัยลักษณะอาการบนพืชทดสอบ

จากการตรวจสอบอาการซึ่งทริสเตซาไวรัสที่แยกได้จากส้มชนิดต่าง ๆ จากข้อ 1.1 และ 1.2 เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นบนมะนาว (พืชทดสอบ) พบว่าทริสเตซาไวรัสแต่ละสายพันธุ์ทำให้เกิดอาการเส้นใบใส (vein clearing) (ภาพที่ 1) อาการเส้นใบแตก (corky leave) (ภาพที่ 2) และอาการ cup leave (อาการใบโค้งงอเป็นรูปถ้วย) ในระดับความรุนแรงที่แตกต่างกันไปดังแสดงไว้ในตารางที่ 2 ซึ่งจัดเป็นสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นสายพันธุ์ไม่รุนแรง เนื่องจากทำให้เกิดอาการเส้นใบใสเพียงเล็กน้อย (mild vein clearing) (ภาพที่ 3) และไม่เกิดอาการอื่น ๆ รวมทั้งสิ้น 28 สายพันธุ์ โดยแยกเป็นสายพันธุ์ที่มาจากส้มจุก 13 สายพันธุ์ ส้มเขียวหวาน 3 สายพันธุ์ ส้มโอ 2 สายพันธุ์ ส้มโชกุน 6 สายพันธุ์ ส้มจี๊ด 2 สายพันธุ์ และจากมะนาว 2 สายพันธุ์

ภาพที่ 1 แสดงอาการ vein clearing บนพืชทดสอบมะนาว ซึ่งเกิดจากเชื้อทริสเตซาไวรัส (ซ้ายใบติดเชื้อและขวาใบปกติ)

ภาพที่ 2 แสดงอาการ corky leaves บนพืชทดสอบมะนาว ซึ่งเกิดจากเชื้อทริสเตซาไวรัส

**ตารางที่ 1** แสดงเชื้อทริสเตซาไวรัส (Citrus tristeza virus) ที่แยกได้จากส้มชนิดต่าง ๆ โดยวิธี graft transmission

| ชนิดของส้ม | สถานที่ | จำนวนสายพันธุ์ CTV ที่แยกได้ |
|---|---|---|
| ส้มจุก | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา | 2 |
| | ต.บ้านทรายขาว อ.จะนะ จ.สงขลา | 21 |
| | ต.ท่างิ้ว อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช | 4 |
| ส้มเขียวหวาน | จ.ปทุมธานี | 3 |
| | จ.เชียงราย | 3 |
| ส้มโอ | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา | 4 |
| ส้มโชกุน | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา | 2 |
| | ต.บ้านชะม่วง อ.รัตภูมิ จ.สงขลา | 12 |
| ส้มจี๊ด | มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา | 1 |
| | จ.จันทบุรี | 2 |
| มะนาว | อ.ร่อนพิบูลย์ จ.นครศรีธรรมราช | 2 |
| | อ.พรหมคีรี จ.นครศรีธรรมราช | 1 |
| | จ.จันทบุรี | 6 |
| | **รวม** | **63** |

**ตารางที่ 2** แสดงอาการและระดับความรุนแรงของเชื้อทริสเตซาไวรัสแยกจากส้มชนิดต่าง ๆ เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นบนพืชทดสอบมะนาว

| แหล่งของ | อาการ[1/] | | | |
|---|---|---|---|---|
| ทริสเตซาไวรัส | vein clearing | corky leave | cup leave | จำนวนสายพันธุ์[2/] |
| ส้มจุก | +++ | + | | 1 |
| | +++ | - | + | 1 |
| | +++ | - | - | 2 |
| | ++ | - | + | 1 |
| | ++ | - | - | 8 |
| | + | - | + | 1 |
| | + | - | - | 13 (1) |
| ส้มเขียวหวาน | +++ | - | - | 1 |
| | ++ | - | ++ | 1 |
| | ++ | - | - | 1 |
| | + | - | - | 3 |
| ส้มโอ | ++ | + | - | 1 |
| | ++ | - | - | 1 |
| | + | - | - | 2 |
| ส้มโชกุน | +++ | +++ | - | 1 |
| | ++ | + | - | 2 |
| | ++ | - | - | 2 |
| | + | - | + | 3 |
| | + | - | - | 6 |
| ส้มจี๊ด | ++ | - | - | 1 |
| | + | - | - | 2 |

ตารางที่ 2 (ต่อ)

| แหล่งของทริสเตซาไวรัส | อาการ[1/] | | | จำนวนสายพันธุ์[2/] |
|---|---|---|---|---|
| | vein clearing | corky leave | cup leave | |
| มะนาว | +++ | +++ | - | 1 |
| | +++ | - | - | 1 |
| | ++ | + | - | 1 |
| | ++ | - | - | 4 |
| | + | - | - | 2 |

1/ - ไม่แสดงอาการ

\+ แสดงอาการเพียงเล็กน้อย

++ แสดงอาการปานกลาง

+++ แสดงอาการรุนแรง

2/ ตัวเลขนอกวงเล็บเป็นจำนวนสายพันธุ์เชื้อทริสเตซาไวรัสที่แยกโดยวิธี graft transmission

ตัวเลขในวงเล็บเป็นจำนวนสายพันธุ์ที่แยกโดยวิธี insect transmission

2.2 การตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงโดยใช้ monoclonal antibodies (McAb)

ทำการตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงในต้นส้มรวมทั้งสิ้น 17 ต้น แยกเป็น ส้มจุก 9 ต้น ส้มโอ 3 ต้น ส้มโชกุน 3 ต้น และส้มจี๊ด 2 ต้น พบเชื้อทริสเตซาไวรัส ซึ่งทำปฏิกริยากับ McAb 4H6 และไม่ทำปฏิกริยา McAb 10E3 จำนวน 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในส้มจุก X2 ปลูกในแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ จากปฏิกริยาตอบสนองต่อ monoclonal antibodies ทั้งสองชนิด มีแนวโน้มว่าสายพันธุ์ดังกล่าวนี้ เป็นสายพันธุ์ไวรัสที่ไม่รุนแรง แต่จากการตรวจอาการของส้มจุก X2 ที่ติดเชื้อสายพันธุ์นี้กลับแสดงอาการของโรคที่รุนแรง นอกจากนี้พบว่าเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถทำปฏิกริยากับ polyclonal antibodies ได้เช่นกัน (ตารางที่ 3) ในการทดลองครั้งนี้ได้ตรวจพบเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์รุนแรงในส้มโอ 1 สายพันธุ์ และพบสายพันธุ์ของเชื้อที่ตอบสนองต่อ McAb ทั้งสองชนิดจำนวน 2 สายพันธุ์ในส้มจุกและอีกหนึ่งสายพันธุ์ในส้มโชกุน (ตารางที่ 3)

2.3 การตรวจแยกเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงโดยเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์

จากการทดลองใช้เทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์ในการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจหาอนุภาคทริสเตซาไวรัสในน้ำคั้นจากใบส้มจุกที่เป็นโรค เมื่อเปรียบเทียบกับการเตรียมตัวอย่างโดยวิธีเนกาทีฟสเตน (Negative Stain) พบว่าเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์ช่วยให้ตรวจพบอนุภาคไวรัสเพิ่มมากขึ้น เมื่อใช้แอนติเซรัมที่จำเพาะต่อเชื้อทริสเตซาที่ระดับความเข้มข้น 1:10 ในการดักจับอนุภาคไวรัสจะตรวจพบอนุภาคสูงสุดเฉลี่ย 17.6 อนุภาคต่อหนึ่งช่องกริด และมีเม็ดทองจับเกาะบนอนุภาคไวรัสเป็นจำนวนสูงสุดด้วยคือ เฉลี่ย 145.9 เม็ดต่ออนุภาคไวรัส นอกจากนี้ยังพบว่าเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์ช่วยให้ตรวจหาอนุภาคทริสเตซาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนได้ง่ายยิ่งขึ้น เพราะสังเกตุจากเม็ดทองที่จับเกาะบนอนุภาคไวรัสและมีพื้นหลัง (back ground) ที่สะอาด (ภาพที่ 1-5 ในรายงานวิจัยการตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสภาคผนวก)

เมื่อนำเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์มาใช้ตรวจแยกสายพันธุ์ไม่รุนแรงของเชื้อทริสเตซาไวรัส พบว่าจำนวนเม็ดทองที่จับเกาะบนอนุภาคไวรัสในส้มจุก 3/3 ซึ่งมีศักยภาพเป็นสายพันธุ์ไม่รุนแรง เนื่องจากแสดงอาการเพียงเล็กน้อย (vein clearing ระดับ +) บนพืชทดสอบ (ตารางที่ 2) มีจำนวนน้อยกว่าจำนวนเม็ดทองซึ่งจับเกาะบนอนุภาคไวรัสสายพันธุ์รุนแรง (ภาพที่ 4) เมื่อใช้แอนติเซรุ่มที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน (1:10)

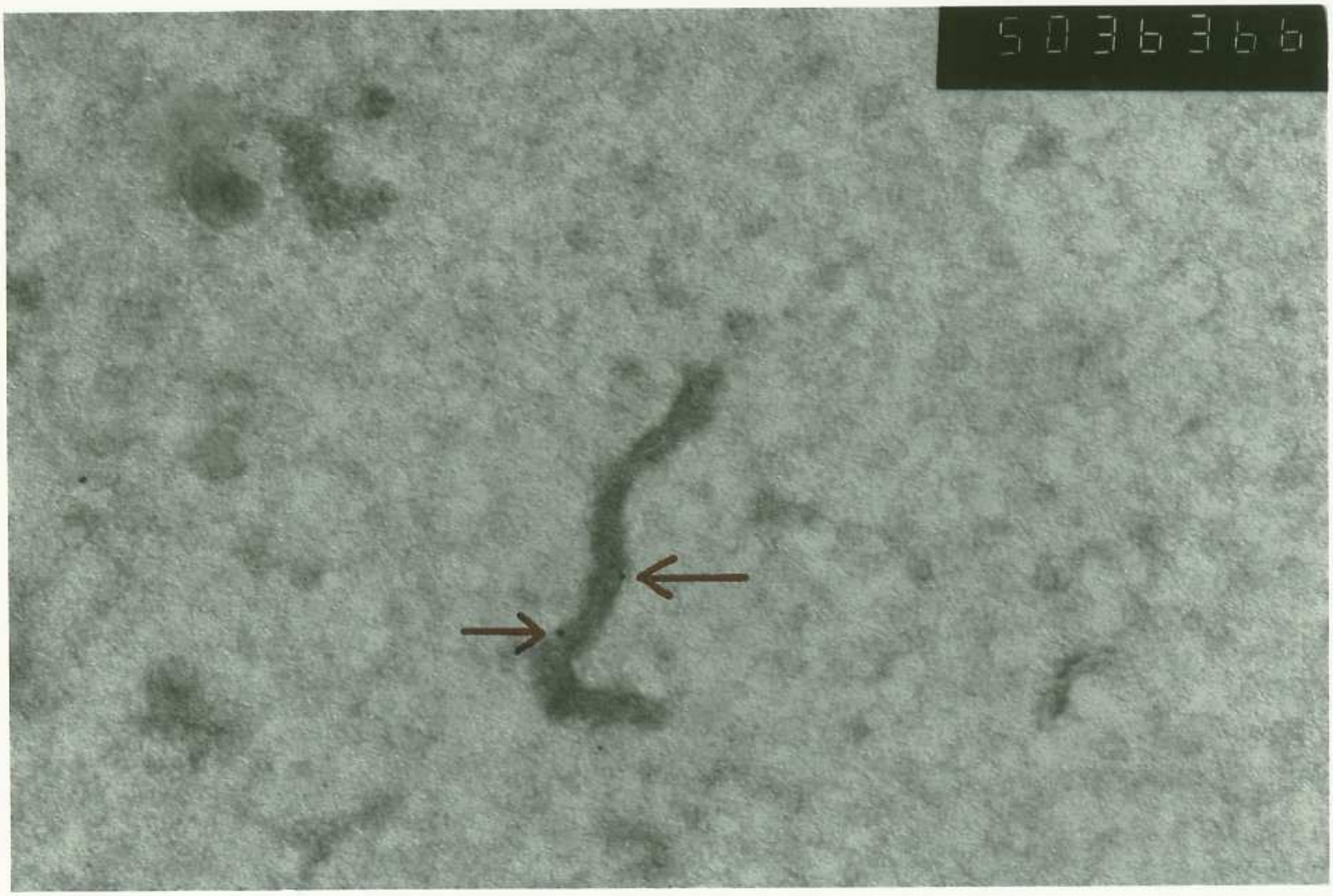
2.4 การแยกทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงโดยการวิเคราะห์ ds RNA

2.4.1 การสกัด ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัส

ในการสกัด ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัสจากเปลือกหุ้มกิ่งส้ม โดยใช้วิธีการของ Dodd *et al* (1987) และวิธีการของ QUT (1991) ทำการแยก ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัสจากส้มต่างชนิด รวมจำนวนตัวอย่างส้มที่เป็นโรคที่นำมาแยกทั้งสิ้น 32 ต้น แยกเป็นการสกัดโดยวิธีของ Dodd 6 ตัวอย่างซึ่งประกอบด้วยส้มโอ 3 ตัวอย่าง ส้มจุก ส้มจี๊ด มะกรูดหวานและมะนาวชนิดละ 1 ตัวอย่าง และทำการสกัดโดยวิธี QUT 25 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นส้มโอ 13 ตัวอย่าง ส้มจุก 6 ตัวอย่าง ส้มจี๊ด 1 ตัวอย่าง และส้มโชกุน 5 ตัวอย่าง และในแต่ละวิธีได้ทำการสกัด ds RNA จากตัวอย่างที่เป็นพืชปกติ คือ ส้มจุก ส้มโอ และส้มจี๊ด เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ นอกจากนี้ได้ใช้วิธี QUT สกัด ds RNA จากเชื้อฟิจิไวรัสเพื่อใช้เปรียบเทียบขนาดของ ds RNA (molecular weight marker) จากผลการสกัดพบว่าวิธีการ Dodd *et al* (1987) สามารถแยก ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัสได้ในปริมาณสูงกว่าวิธีของ QUT (1991) เพราะมีความเข้มของแถบ ds RNA ที่ปรากฏใน polyacrylamide gel มากกว่า (ดังภาพที่ 5) แต่พบว่า ds RNA ที่ได้จากการสกัดโดยวิธี Dodd *et al* (1987) มีการปนเปื้อนของกรดนิวคลีอิคจากพืชสูงกว่าที่สกัดจากวิธี QUT (1991) โดยเปรียบเทียบจากแถบ ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัสกับเชื้อฟิจิไวรัส ซึ่งแถบ ds RNA จากวิธี Dodd มีพื้นหลังที่มืดทึบกว่าแถบ ds RNA จากวิธี QUT (ภาพที่ 5)

2.4.2 การวิเคราะห์ ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัส

ผลการวิเคราะห์ ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัสที่แยกจากส้มชนิดต่าง ๆ บน polyacrylamide gel พบว่าจำนวนแถบของ ds RNA ของเชื้อทริสเตซาซึ่งสกัดจากส้มจี๊ดและส้มจุกเท่ากัน แต่จะแตกต่างจาก ds RNA ของเชื้อที่แยกจากส้มโอ (ภาพที่ 6) ในขณะเดียวกันจำนวนแถบของ ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัสที่พบในส้มโอที่ต่างพันธุ์มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 5) สำหรับสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสที่พบในส้มจุก 3/3 ที่ปลูกในแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์และมีศักยภาพเป็นสายพันธุ์ไม่รุนแรง ซึ่งทำให้เกิดอาการเส้นใบใสเพียงเล็กน้อยบนพืชทดสอบ (ตารางที่ 3) จากการวิเคราะห์จำนวนแถบ ds RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ดังกล่าว พบว่าไม่แตกต่างจากเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์อื่นที่เข้าทำลายส้มจุกด้วยกัน (ภาพที่ 6)




ภาพที่ 4 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron micrograph) แสดงอนุภาคทริสเตซา ไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง แยกได้จากส้มจุก 3/3 ดักจับด้วยเทคนิค immunogold labelling (สังเกตุเม็ดทองบนอนุภาคไวรัสที่ลูกศรชี้)

**ตารางที่ 3** การตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) โดยเทคนิค ELISA และใช้ monoclonal antibodies (MAb)

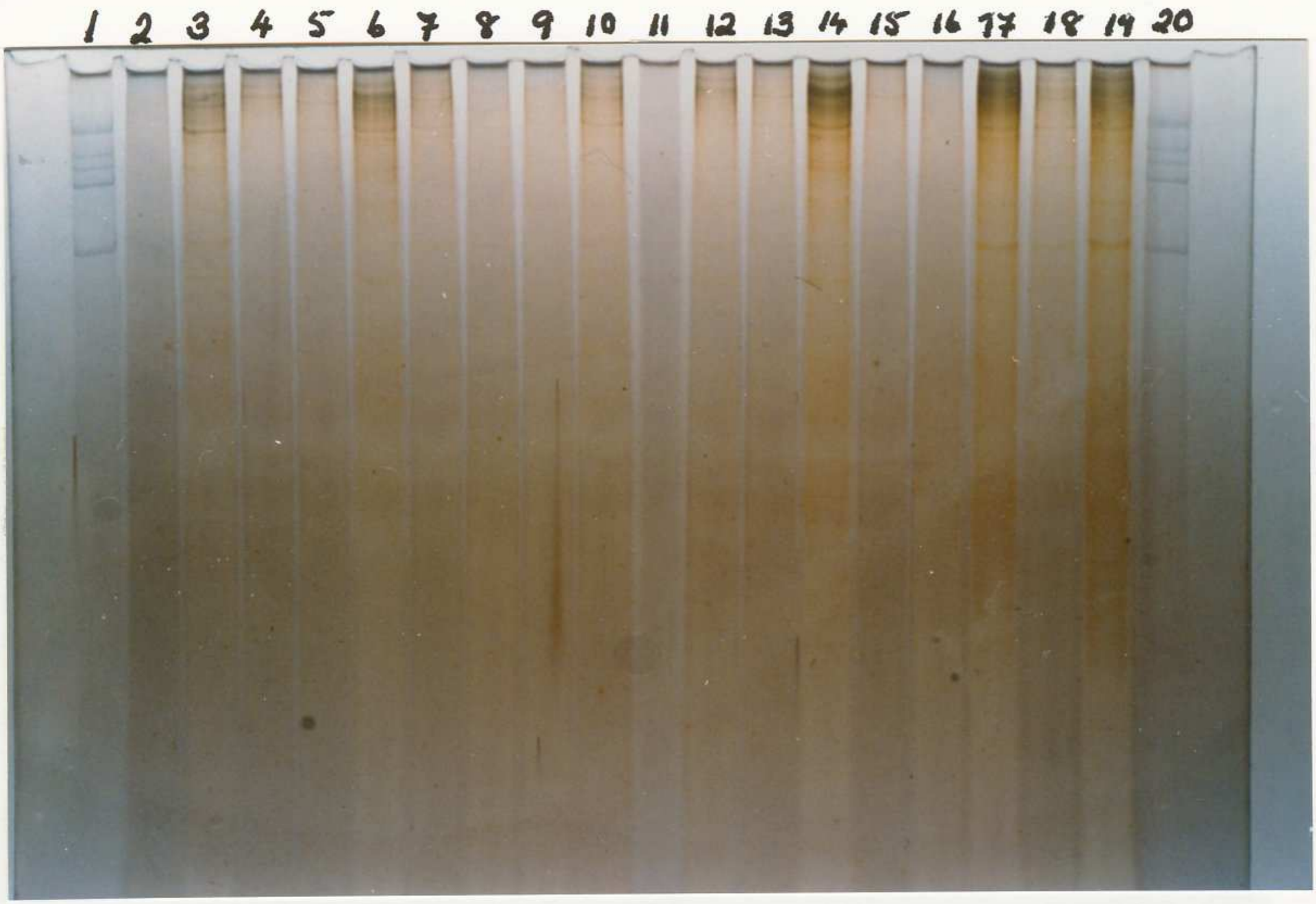
| การทดลองครั้งที่ | ชนิดของส้ม/หมายเลขต้น | A405 nm[1/] | | Polyclonal antibodies[2/] |
|---|---|---|---|---|
| | | 10E3[3/] | H46[4/] | |
| 1 | ส้มจุก/X2 | 0.060 | 0.192 | 0.328 |
| | ส้มจุก/Z4 | 0.030 | 0.062 | 0.120 |
| | ส้มจุก/W10 | 0.060 | 0.125 | 0.167 |
| | ส้มโอ/C1 | 0.045 | 0.076 | 0.018 |
| | ส้มโอ/A9 | 0.086 | 0.099 | 0.072 |
| | ส้มจี๊ด/W2 | 0.045 | 0.128 | 0.055 |
| | ส้มจุกติดเชื้อ CTV | 0.260 | 0.364 | 0.743 |
| | ส้มจุกปกติ | 0.039 | 0.037 | 0.090 |
| 2 | ส้มจุก/2-4 | 0.234 | 0.576 | N |
| | ส้มจุก/3-2 | 0.568 | 0.665 | N |
| | ส้มจุก/4-3 | 0.208 | 0.410 | N |
| | ส้มจุก/6-2 | 0.234 | 0.455 | N |
| | ส้มจุก/6-4 | 0.155 | 0.345 | N |
| | ส้มจุก/9-2 | 0.329 | 0.590 | N |
| | ส้มจุก/10-3 | 0.300 | 0.539 | N |
| | ส้มโอ/ส3-7 | 0.233 | 0.515 | N |
| | ส้มโชกุน/G3 | 0.507 | 0.721 | N |
| | ส้มโชกุน/G6 | 0.207 | 0.359 | N |
| | ส้มโชกุน/G7 | 0.455 | 0.687 | N |
| | ส้มจุกติดเชื้อ CTV | 0.379 | 0.718 | N |
| | ส้มจุกปกติ | 0.184 | 0.304 | N |

[1/] ค่าดูดกลืนแสง (Absorbance Reading) ที่คลื่นแสง 405 nm เฉลี่ยจาก 2 ซ้ำ ตัวอย่างที่มีค่าดูดกลืนแสงมากกว่า 2 เท่าของค่าดูดกลืนแสงของส้มจุกปกติในการทดลองครั้งเดียวกันให้ถือเป็นผลบวก

[2/] antibodies ใช้ตรวจเชื้อทริสเตซาไวรัสทั่วไป, N = not applicable (ไม่ได้ใช้ polyclonal antibodies ตรวจหาเชื้อ)

[3/] MAb 10E3 จำเพาะต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์รุนแรง

[4/] MAb H46 จำเพาะต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง




ภาพที่ 5 แสดง double stranded RNA ของ Fiji disease virus และเชื้อทริสเตซาไวรัส (citrus tristeza virus, CTV)

Lane 1 และ 20 ds RNA ของ Fiji disease virus สกัดโดยวิธีของ QUT (1991)

Lane 2-19 ds RNA ของ CTV สกัดโดยวิธีของ Dodd *et al.* (1987)

ภาพที่ 6 เปรียบเทียบแถบ (bands) double stranded RNA ของเชื้อทริสเตซาไวรัส (citrus tristeza virus, CTV) สกัดจากส้มชนิดต่าง ๆ

Lane 1, 7, 13 ส้มโอติดเชื้อ CTV

Lane 2, 8, 14 ส้มโอปกติ

Lane 3, 9, 15 ส้มจี๊ดติดเชื้อ CTV

Lane 4, 10, 16 ส้มจี๊ดปกติ

Lane 5, 11, 17 ส้มจุกติดเชื้อ CTV

Lane 6, 12 ส้มจุกปกติ

**โครงการย่อยที่ 2** : การป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) โดย preinoculation ต้นส้มจุกด้วย mild strain

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**1. แหล่งของเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain)**

ใช้ทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงซึ่งตรวจพบในส้มจุก 3/3 ซึ่งปลูกในแปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งเป็นผลจากการทดลองในโครงการที่ 1

**2. การตรวจสอบ cross-protection ของเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง**

ทำการปลูกเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงจากส้มจุก 3/3 ลงในต้นกล้าส้มจุกอายุ 1 ปี ซึ่งใช้เป็นพืชทดสอบ และปลูกไว้ในเรือนกระจกปลอดแมลง วางแผนการทดลองแบบ randommized complete block โดยมี treament ดังนี้

Treaiment 1 ต้นกล้าส้มจุกอายุ 1 ปี (control)

Treatment 2 ต้นส้มจุกเสียบยอดบนต้นตอส้มจี๊ดอายุ 1 ปี แล้วปลูกเชื้อด้วยทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์จากส้มจุก 3/3 โดยวิธี leaf grafting (ดูอุปกรณ์และวิธีการข้อ 1.1 ในโครงการย่อยที่ 1) ทำการ graft 5 ใบต่อต้น

Treatment 3 ต้นส้มจุกเสียบยอดบนต้นตอส้มจุกอายุ 1 ปี ปลูกเชื้อด้วยทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงจากส้มจุก 3/3 เช่นเดียวกับ treatment 2

ในแต่ละ treatment ใช้ต้นส้มจุก 5 ต้นและทำ 3 ซ้ำ เมื่อปลูกเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ส้มจุก 3/3 ลงบนต้นส้มจุกแล้ว นำต้นส้มจุกดังกล่าวมาดูแลรักษาในเรือนกระจกปลอดแมลงเป็นเวลา 6 เดือน จากนั้นตรวจการติดเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ส้มจุก 3/3 ของต้นกล้าส้มจุกแต่ละ treatment ด้วยเทคนิค ELISA (ดูอุปกรณ์และวิธีการข้อ 2.2 ในโครงการย่อยที่ 1) จากนั้นนำต้นกล้าซึ่งติดเชื้อแล้วลงปลูกในแปลงทดลอง ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช เพื่อให้ต้นกล้าส้มจุกติดเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์รุนแรงซ้ำโดยวิธีธรรมชาติ (natural infection) แล้วตรวจวัดความรุนแรงของโรคโดยเปรียบเทียบกับต้นกล้าส้มจุกที่ไม่ได้ pre-inoculation ด้วยทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง

# ผลการทดลอง

**1. Pre-inoculation เชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงลงในต้นส้มจุกโดยวิธี leaf grafting**

ในการทำ leaf grafting โดยการตัดเอาใบจากต้นส้มจุก 3/3 ซึ่งมีเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงมาเชื่อมต่อกับใบของต้นส้มจุกซึ่งใช้เป็นพืชทดสอบ โดยให้เส้นกลางใบของส้มทั้งสองชนิดเชื่อมติดกัน เพื่อให้เชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงจากส้มจุก 3/3 ถ่ายทอดไปยังต้นส้มจุกซึ่งเป็นพืชทดสอบ ในการทดลองพบว่ามีการเชื่อมติดกันของใบน้อย โดย treatment 2 มีการเชื่อมติดของใบ 17% และ treatment 3 มีการเชื่อมติด 10% (ดังตารางที่ 4)

**2. การตรวจการติดเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงในส้มจุกพืชทดสอบโดยเทคนิค ELISA**

จากต้นส้มจุกที่ pre-inoculation ด้วยเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงจำนวนทั้งสิ้น 30 ต้น แยกเป็น treatment 2 (ต้นส้มจุกเสียบยอดบนต้นตอส้มจี๊ด) 15 ต้น และ treatment 3 (ต้นส้มจุกเสียบยอดบนต้นตอส้มจุก) 15 ต้น โดยการตรวจเชื้อด้วยเทคนิค ELISA ไม่พบการติดเชื้อในต้นส้มทั้ง 30 ต้น ทั้งนี้เนื่องจากค่า absorbtion reading ซึ่งได้จากดูดกลืนแสงที่ 405 nm ของตัวอย่างซึ่งเป็นน้ำคั้นที่สกัดจากต้นส้มจุกซึ่ง pre-inoculation ด้วยเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง มีค่าใกล้เคียงกับค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างซึ่งเป็นส้มจุกปกติเฉลี่ย $X \pm SD = 0.05 \pm 0.04$

**ตารางที่ 4** แสดงผลการปลูกเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรง (preinoculation) ลงบนส้มจุกโดยวิธี leaf grafting[1/]

| ส้มจุก | จำนวนใบที่ graft ติด/จำนวนใบที่ใช้ graft ทั้งหมด[2/] | | | % การติดของ leaf grafting |
|---|---|---|---|---|
| | ซ้ำที่ 1 | ซ้ำที่ 2 | ซ้ำที่ 3 | |
| ส้มจุกเสียบยอดบนต้นตอส้มจี๊ด | 0/25 | 9/25 | 4/25 | 17.3 |
| ส้มจุกเสียบยอดบนต้นตอส้มจุก | 0/25 | 7/25 | 1/25 | 10.6 |

[1/] ใช้เชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงซึ่งแยกได้จากส้มจุก 3/3 แปลงทดลองภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ

[2/] graft 5 ใบต่อต้น และใช้ 5 ต้น/ซ้ำ

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการค้นหาเชื้อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงในโครงการย่อยที่ 1 การใช้ monoclonal antibody (McAb) พบว่า McAb 4H6 ซึ่งใช้ในการทดลองครั้งนี้และมีรายงานว่า McAb ชนิดนี้ตอบสนองต่อทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงในได้หวัน (Mei-Chen *et al*, 1990) นั้นทำปฏิกริยากับทริสเตซาไวรัสทั้งสายพันธุ์รุนแรง (severe strain) และสายพันธุ์ไม่รุนแรง (mild strain) ซึ่งพบในส้มจุก ส้มโอ และส้มโชกุน (ตารางที่ 3) จึงทำให้ไม่สามารถใช้ McAb 4H6 ในการแยกทริสเตซาไวรัสสายพันธุ์ไม่รุนแรงที่ปรากฏในภาคใต้ของประเทศไทยได้ ซึ่งผลการทดลองนี้ตรงกับรายงานของ Mei-Chen *et al* (1990) ซึ่งใช้ McAb 4H6 ตรวจสายพันธุ์ทริสเตซาในส้มเขียวหวานในประเทศไทย

ในการทดลองแยกแยะสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสที่แยกได้จากส้มชนิดต่าง ๆ ในภาคใต้ โดยอาศัยความแตกต่างของแถบ (band) ของ double strand RNA (Dodd *et al.*, 1987) ไม่พบแบบแผนที่แน่ชัดของ ds RNA ซึ่งจะใช้แยกแยะสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัสได้ (ภาพที่ 6) ทั้งนี้เนื่องจากอาจเกิดจากทริสเตซาไวรัสนั้นมีระบบพันธุกรรมที่ซับซ้อนและในการทำให้เกิดการติดเชื้อในพืชนั้นต้องใช้ subgenomic RNA อย่างน้อย 9 ชิ้น อีกทั้งการติดเชื้อทริสเตซาไวรัสหลายสายพันธุ์ในพืชต้นเดียวกันก็เป็นปรากฏการณ์ที่มีความถี่ของการเกิดสูง (Karasev′ *et al.*, 1998) อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การใช้แถบของ ds RNA ซึ่งเป็น replicative form ของพันธุกรรมของทริสเตซาไวรัสในการแยกแยะสายพันธุ์ไม่ได้

แต่ในการทดลองใช้ immunogold labelling ในการตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสในส้มจุก โดยใช้ polyclonal antibodies ซึ่งผลิตโดยทริสเตซาไวรัสที่แยกได้ในท้องถิ่นภาคใต้ พบว่าจำนวนเม็ดทองที่จับเกาะบนอนุภาคไวรัสสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มว่ามีความรุนแรงต่ำ (ส้มจุก 3/3) น้อยกว่าสายพันธุ์อื่นที่พบในส้มจุก (ภาพที่ 4) เพื่อใช้ antiserum ความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งเป็นตัวบ่งบอกถึงการตอบสนองที่แตกต่างกันของไวรัสแต่สายพันธุ์ต่อ antiserum ซึ่งน่าจะได้มีการทดลองต่อไปในการใช้เทคนิค immunogold labelling ในการแยกแยะสายพันธุ์ทริสเตซาไวรัส

เนื่องจากไม่ประสบผลสำเร็จในการค้นหาทริสเตซาไวรัสโดย monoclonal antibody และการใช้แถบของ ds RNA ดังนั้นจึงใช้วิธีการคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อที่ไม่รุนแรงโดยอาศัยลักษณะอาการที่เชื้อเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นบนพืชทดสอบ (Lee *et al.*, 1987) และจากการคัดเลือกโดยวิธีนี้ได้

เชื้อทริสเตซาไวรัสที่มีศักยภาพเป็นสายพันธุ์ไม่รุนแรงจากส้มจุก 3/3 ซึ่งปลูกในแปลงทดลอง ภาควิชาพืชศาสตร์ แต่เมื่อนำสายเชื้อดังกล่าวมาปลูกถ่ายลงบนพืชทดสอบ (ในโครงการย่อยที่ 2) คือ ส้มจุก โดยแบ่งเป็นส้มจุกที่เสียบยอดบนต้นตอส้มจี๊ด และส้มจุกที่เสียบยอดบนต้นตอส้มจุก ซึ่งเป็นการ preinoculate สายเชื้อดังกล่าวลงบนพืชทดสอบเพื่อป้องกันการเข้าทำลายซ้ำของเชื้อสายพันธุ์รุนแรง เมื่อนำพืชทดสอบลงปลูกในแปลง แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถปลูกถ่ายสายเชื้อพันธุ์ไม่รุนแรงโดยวิธี leaf grafting ลงในพืชทดสอบ และได้ทดลองปลูกถ่ายโดยวิธี side graft และ top graft ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันคือ ไม่สามารถปลูกถ่ายสายเชื้อพันธุ์ไม่รุนแรงโดยวิธี grafting ซึ่งอาจเนื่องจากสายเชื้อดังกล่าวมีคุณสมบัติการถ่ายทอดที่จำเพาะเจาะจงเพราะมีรายงานว่าทริสเตซาไวรัสบางสายพันธุ์ถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะ (Dodd *et al.*, 1987) สืบเนื่องจากไม่สามารถ preinoculate สายเชื้อไม่รุนแรงลงในพืชทดสอบได้ จึงไม่สามารถประเมินระดับการป้องกันของสายเชื้อดังกล่าวที่มีต่อสายเชื้อที่รุนแรงได้ ดังนั้นจึงน่าจะได้มีการศึกษาต่อไปถึงวิธีการถ่ายทอดสายเชื้อดังกล่าวเพื่อที่จะได้นำสายเชื้อชนิดนี้มาป้องกันและควบคุมการเข้าทำลายของเชื้อทริสเตซาไวรัสต่อไป

# เอกสารอ้างอิง

ฝ่ายข้อมูลส่งเสริมการเกษตร 2537 สถิติการปลูกไม้ผลยืนต้นปี 2537 กองแผนงาน กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

มงคล แซ่หลิม, วิชัย พันธนะหิรัญ, สุทธิรักษ์ หลิม และจรัสศรี นวลศรี 2530. การศึกษาปัญหาและแนวทางการปรับปรุงการปลูกส้มจุก รายงานการวิจัยคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ 20 หน้า.

รัตนา สดุดี 2537. โรคโทรมของส้มจุก (*Citrus reticulata* Blanco) : เชื้อสาเหตุและปัจจัยส่งเสริมความรุนแรงของโรค วารสารสงขลานครินทร์ ปีที่ 16 ฉบับที่ 4 หน้า 353-367.

สำนักงานพาณิชย์จังหวัดสงขลา 2536. ส้มจุก โครงการพัฒนาตลาดเพื่อสนับสนุนการกระจายการผลิตในระดับจังหวัด กระทรวงพาณิชย์

Anonymous 1991. Extraction of ds RNA. Master Class of Plant Virology Laboratory Manual, Queensland University of Technology, Australia. 5 pp.

Bar-Joseph, M. and Lee, R.F. 1989. Citrus Tristeza Virus CMI/AAB Descriptions of Plant Virus No. 353.

Broadbent, P., Bevington, K.B. and Coote, B.G. 1991. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. Proceeding of the 11th Conference of International Organization of Citrust Virologist, p 64-70.

da Graca, J.V. 1991. Citrus greening disease. Annual Review Phytopathology 29: 109-136.

Dodd, J.A., Jarupat, T., Lee, J.G., and Roistacher, C.N. 1987. Effects of strain, host, time of harvest and virus concentration on bouble-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. Phytopathology Vol 77(3): 442-447.

Hermoso di Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., and Pina Lorca, J.A. 1984. Transmission of Citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. Proceeding of the 9th Conference of International Organization of Citrus Virologist, p 23-27.

Karasev, A.V., Dawson, W.O., Hilf, M.E., Garnsey, S.M. and Hadidi, A. 1998. Molecular biology of citrus tristeza virus : implication for disease diagnosis and control. Acta-Horticuiturae 472: 333-337.

Knorr, L.C., Schwarz, R.E., and Prommintara, M. 1973. Tristeza a citrus virus disease widely disseminated in Thailand. FAO Plant Protection Technical Buiietin, No. 21, 12 pp.

Lee, R.F., Garnsey, S.M., Brlansky, R.M., and Goheen, A.C. 1987. A purification procedure for enhancement of citrus tristeza virus yields and its application to other phloem-limited viruses. Phytopathology Vol 77(4): 543-549.

Mei-chen, T., Hong-Ji, S., and Garnsey, S.M. 1990. Citrus tristeza virus (CTV) strains and identification by monoclonal antibodies, with emphasis on south east asia isolate. Proceeding of Asia Pacific International Conference on Citriculture, Chiang Mai, Thailand 4-10 February, 1990, p.175-179.

Roistacher, C.N. 1991. Graft-Transmissible Diseases of Citrus, Handbook for Detection and Diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome, 286 pp.

Roistacher, C.N. and Moreno, P. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus a review. Proceeding of 11th Conference of International Organization of Citrus virologist, p 7-9.

Schwarz, R.E., Knorr, L.C. and Prommintra, M. 1973. Presence of citrus greening and its psylla vector in Thailand. FAO Plant Protection Bulletin No 21(6): 132-138.

Sdoodee, R. and Garnett, H. 1994. Detection of citrus greening bacterium by immunoblotting. Songklanakarin Journal of Science and Technology 16(3): 292-300.

Stubb, L.L. 1994. Transmission and protective inoculation with viruses of the citrus tristeza complex. Australian Journal of Agricultural Research 15: 752-770.

# ภาคผนวก

## การตรวจหาเชื้อทริสเตซาไวรัสในส้มจุก (Citrus reticulata Blanco) โดยเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์

**รัตนา สดุดี[1], ศิริพร มุ่งวิริยะ[2], เบญจมาศ บรรเจิดประดิษฐ์[3] และสุภาพ เกียรติทับทิว[4]**

### บทคัดย่อ

การตรวจหาทริสเตซาไวรัสในน้ำคั้นจากเส้นกลางใบส้มจุก โดยวิธีอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์ ซึ่งใช้โปรตีนเอปิดฉลากด้วยอนุภาคทองแล้วให้ทำปฏิกริยากับแอนติเซรัมของไวรัส สามารถตรวจพบอนุภาคของไวรัส เมื่อใช้แอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาที่ระดับความเข้มข้น 1:10 1:50 1:100 และ 1:500 ที่ระดับความเข้มข้น 1:10 ตรวจพบอนุภาคไวรัสสูงสุดเฉลี่ย 17.65 อนุภาคต่อหนึ่งช่องกริด และพบจำนวนเม็ดทองที่จับเกาะบนอนุภาคไวรัสสูงสุดเช่นกันเฉลี่ย 145.97 เม็ดต่ออนุภาคไวรัส จำนวนอนุภาคของไวรัสที่ตรวจพบและจำนวนของเม็ดทองที่จับเกาะบนอนุภาคไวรัสลดลง เมื่อความเข้มข้นของแอนติเซรัมลดลง ในการเปรียบเทียบความจำเพาะเจาะจงของแอนติเซรัมต่อไวรัส โดยใช้แอนติเซรัมของกระต่ายปกติแทนแอนติเซรัมของทริสเตซาไวรัส พบว่าอนุภาคทองของทริสเตซาไวรัสมีเม็ดทองจับเกาะอยู่น้อยมากเฉลี่ย 3.77 เม็ดต่ออนุภาคไวรัส

---

[1] Ph.D. (Plant Virology) รองศาสตราจารย์, [2]วท.บ. เกษตรศาสตร์, [3]วท.ม. โรคพืชวิทยา สาขาการจัดการศัตรูพืช ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา 90112

[4] วท.ม. (พยาธิชีววิทยา) อาจารย์, ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สงขลา 90112

# Detection of Citrus Tristeza Virus in Neck Orange (Citrus reticulata Blanco) by Immunogoldlabelling

**Ratana Sdoodee[1], Siriporn Mungviriya[2], Benjamas Bunjerdpradit[3] and Suparp Kiettubthew[4]**

## Abstract

Citrus tristeza virus (CTV) were detected by electron microscope in sap extracts of infected neck orange midribs when the extracts were immunolabelled with CTV antiserum diluted 1:10 or 1:50 or 1:100 or 1:500, and protein A-gold. On the average, the highest number of detected virus particles was 17.65 particles per square mesh when 1:10 antiserum was used. At the same concentration of the antiserum, the highest number of gold particles deposited on CTV particles was also obtained. However, number of detected virus particles and gold were decreased when concentration of CTV antiserum was reduced. The present of golds on the virus was low averaged 3.77 gold per virus particle when CTV antiserum was substituted with normal rabbit serum.

---

Key words : detection, citrus tristeza virus, neck orange (Citrus reticulata Blanco), immunogoldlabelling

---

[1] Ph.D. (Plant Virology), [2] B.S. (Pest Management), [3] M.S. (Plant Pathology) Department of Pest Management, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, Thailand 90112

[4] M.S.(Pathological Biology), Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla, Thailand 90112

# บทนำ

ส้มเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และเป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย นอกจากนี้ส้มยังเป็นพืชที่ให้ผลตอบแทนต่อไร่สูงกว่าพืชชนิดอื่นมาก[1] ส้มที่นิยมปลูกในประเทศไทยได้แก่ ส้มเขียวหวาน ส้มจีน ส้มโอ ส้มจุก ส้มเกลี้ยง และมะนาว เป็นต้น[3] ในการผลิตส้มปัญหาและอุปสรรคที่นับว่าสำคัญที่สุดในปัจจุบันคือ การระบาดของโรคส้มซึ่งเกิดจากเชื้อทริสเตซาไวรัส (citrus tristeza closterovirus, CTV)[1,2,4] ไวรัสชนิดนี้มีรูปร่างยาวคล้ายเส้นด้าย ขนาด 10-11x2000 นาโนเมตร[7] ต้นส้มเมื่อเกิดโรคมีอาการเหลือง ไม่เจริญเติบโต แคระแกรน ต้นทรุดโทรมและแห้งตายอย่างรวดเร็ว[4]

การวินิจฉัยโรคทริสเตซานั้น สามารถทำได้โดยการถ่ายทอดเชื้อไวรัสจากต้นที่เป็นโรคไปยังมะนาว ซึ่งเป็นพืชทดสอบโดยการติดตาหรือเสียบยอด แล้วตรวจดูอาการบนพืชทดสอบ แต่วิธีดังกล่าวต้องใช้เวลานาน[4] ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางเซรุ่มวิทยาซึ่งอาศัยความจำเพาะเจาะจงระหว่างแอนติเซรัมและแอนติเจน มาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคพืชมากขึ้น เพราะเทคนิคดังกล่าวจะให้ความแม่นยำสูง เทคนิคทางเซรุ่มวิทยาที่ใช้กันอย่างแพร่หลายเช่น ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) IEM (immunoelectron microscopy) เป็นต้น ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคนิค IEM ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น โดยนำเอาโปรตีนเอปิดฉลากด้วยอนุภาคทอง (Protein A-gold) มาใช้เป็นเครื่องหมายบ่งบอก (marker) ทดแทนการใช้แอนติเซรัมเพียงอย่างเดียว โดยให้ชื่อเทคนิคนี้ว่า immunogoldlabelling[8] และได้มีการใช้เทคนิคดังกล่าวนี้ในการตรวจหาอนุภาคไวรัสในน้ำคั้นหรือเนื้อเยื่อของพืช[10]

หลักการของเทคนิค immunogoldlabelling เป็นการนำเอาโปรตีนเอซึ่งเป็นโปรตีนที่แยกได้จากผนังเซลล์ของแบคทีเรีย Staphylococcus aureus มาเชื่อมกับอนุภาคทองโดยใช้การดึงดูดกันระหว่างประจุลบบนผิวของอนุภาคทองและกลุ่มประจุบวกของโปรตีน ซึ่งเป็นแรงดึงดูดแบบ non-covalent electrostatic[9] เนื่องจากโปรตีนเอมีคุณสมบัติเชื่อมกับแอนติเซรัมได้ด้วย จึงนำมาใช้ตรวจหาปฏิกริยาระหว่างแอนติเซรัมกับไวรัสแอนติเจนได้ โดยใช้ปลายด้านหนึ่งของโปรตีนเอจับกับแอนติเซรัมที่เกาะกับอนุภาคไวรัส ส่วนปลายอีกด้านหนึ่งจับกับอนุภาคทอง ส่วนของอนุภาคทองจะทำหน้าที่เป็นเครื่องหมาย (marker) ทำให้มองเห็นอนุภาคไวรัสได้ง่ายขึ้นเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน อีกทั้งยังบ่งบอกถึงความจำเพาะเจาะจงของแอนติเซรัมที่ใช้กับไวรัสแอนติเจนที่ตรวจหา[8]

ดังนั้นจุดประสงค์ของงานทดลองครั้งนี้เป็นการนำเอาเทคนิค immunogoldlabelling มาใช้ตรวจหาอนุภาคของทริสเตซาไวรัสในน้ำคั้นจากใบส้มจุก เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการตรวจพบอนุภาคทริสเตซาไวรัสกับการย้อมสี (negative stain) และเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอนติเซรัมที่ใช้ร่วมกับ protein A-gold

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

**แหล่งของไวรัส**

ส้มจุกที่เป็นโรคจากแปลงทดลอง ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัย-สงขลานครินทร์

**การผลิตและเตรียมแอนติเซรัมต่อเชื้อทริสเตซาไวรัส**

ในการผลิตแอนติเซรัมใช้กระต่ายเพศเมียสีขาว ตาแดงพันธุ์ New Zealand White น้ำหนักประมาณ 2 กก. ก่อนฉีดไวรัสแอนติเจน เก็บ normal rabbit serum จากเลือดกระต่าย เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ ผสมทริสเตซาไวรัสค่อนข้างบริสุทธิ์ซึ่งได้จากการทำบริสุทธิ์โดยวิธีของ Bar-Joseph และคณะ[6] ที่ความเข้มข้น 1 มก/มล. กับ Freund's complete adjuvant ในอัตราส่วน 1:1 จำนวน 2 มล. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณสะโพกของกระต่าย 4 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 1 สัปดาห์ เริ่มเก็บแอนติเซรัมหลังการฉีดครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และเก็บแอนติเซรัมติดต่อกันนาน 4 สัปดาห์

นำแอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาที่ผลิตได้และ normal rabbit serum มาเจือจางด้วย phosphate buffer saline ผสม bovine serum albumin 1% (PBS-BSA) ให้มีระดับความเข้มข้น 1:10 1:50 1:100 และ 1:500

**การเตรียมน้ำคั้นจากใบส้มจุก**

บดเส้นกลางใบของส้มจุกที่เป็นโรคใน 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0 โดยใช้อัตราส่วน 1 กรัมของเส้นกลางใบส้มจุกต่อ 1 มล.บัพเฟอร์

**การเตรียมกริดโดยเทคนิค immunogoldlabelling**

นำกริดซึ่งทำจากโลหะนิเกล (nickel) เคลือบด้วย nitrocellulose และฉาบทับด้วยคาร์บอน มาลอยบนหยดของน้ำคั้นจากใบส้มจุกเป็นเวลา 10 นาที ล้างด้วย PBS-BSA 3 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที จาก นั้นวางกริดบนหยดของแอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาไวรัสหรือบนหยดของ normal rabbit serum ที่ ระดับความเข้มข้น 1:10 1:50 1:100 และ 1:500 บ่มไว้นาน 15 นาที ล้างกริดด้วย PBS-BSA 4 ครั้ง ๆ ละ 4 นาที บ่มกริดบนหยดของ protein A-gold ซึ่งเตรียมโดยวิธีของ Slot และ Cieuze( ) เป็น เวลา 45 นาที หลังจากนั้นล้างด้วย PBS buffer 4 ครั้ง ๆ ละ 3 นาที และตามด้วยการล้างน้ำกลั่น 4 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ซับส่วนเกินของของเหลวออกด้วยกระดาษกรอง แล้วย้อมสีด้วย 2% uranyl acetate นาน 20 วินาที ซับส่วนเกินของของเหลวออกและทิ้งให้กริดแห้ง ส่วนกริดที่นำไปลอยบน น้ำคั้นของใบส้มจุก จนครบเวลานำมาย้อมด้วย uranyl acetate ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ (negative stain) ทุกขั้นตอนของการเตรียมกริดทำที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำกริดที่เตรียมมาตรวจดูด้วยกล้อง จุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิดส่องผ่าน (JEOL 100CXII)

**การวางแผนการทดลอง**

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) โดยสุ่มนับอนุภาค ทริสเตซาไวรัสและจำนวนเม็ดทองที่จับเกาะบนอนุภาคไวรัสจำนวน 10 ช่องต่อหนึ่งกริด และตรวจ นับ 2 กริดในแต่ละความเข้มข้นของแอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาไวรัส และ normal rabbit serum โดยมีวิธีตรวจหาอนุภาคไวรัสด้วยการย้อมสีแบบปกติ (negative stain) เป็นตัวเปรียบเทียบ

# ผลการทดลอง

การตรวจหาอนุภาคไวรัสในน้ำคั้นของใบส้มจุก โดยเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์ โดยใช้แอนติเซรัมของเชื้อทริสเตซาไวรัสที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน พบจำนวนอนุภาคไวรัสสูงสุดเฉลี่ย 17.65 อนุภาคต่อหนึ่งช่องกริด เมื่อใช้แอนติเซรัมที่ความเข้มข้น 1:10 (ตารางที่ 1) เมื่อความเข้มข้นของแอนติเซรัมลดลงที่ 1:50 1:100 และ 1:500 ตรวจพบอนุภาคไวรัสลดน้อยลงคือ 11.70 5.20 และ 3.55 อนุภาคต่อหนึ่งช่องกริด ตามลำดับ จำนวนอนุภาคไวรัสที่ตรวจพบทั้งสี่ระดับความเข้มข้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1) ในการทดลองได้ตรวจหา CTV โดยวิธีย้อมสี (negative stain) เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบตรวจพบอนุภาค CTV โดยวิธีนี้เฉลี่ย 4.70 อนุภาคต่อหนึ่งช่องของกริด (ตารางที่ 1) อนุภาคไวรัสที่ตรวจพบโดยเทคนิคอิมมูโนเกลเลเบลลิงค์ และเทคนิคการย้อมสี negative stain แสดงไว้ในรูปที่ 1-5

จากการนับจำนวนเม็ดทองที่จับเกาะอยู่บนอนุภาคของ CTV ที่ตรวจพบเมื่อใช้แอนติเซรัมของทริสเตซาที่ความเข้มข้น 1:10 1:50 1:100 และ 1:500 พบเม็ดทอง 145.97 95.70 49.90 และ 27.62 ตามลำดับ จำนวนเม็ดทองที่พบบนอนุภาคไวรัสมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 2) แต่เมื่อใช้เซรัมของกระต่ายปกติ (normal rabbit serum) พบจำนวนเม็ดทองบนอนุภาค CTV จำนวนน้อย (ตารางที่ 3) ในการเปรียบเทียบจำนวนเม็ดทองบนอนุภาคไวรัสพบว่าการใช้แอนติเซรัมของทริสเตซาไวรัสทำให้มีเม็ดทองมาจับเกาะบนอนุภาคไวรัสมากกว่าการใช้เซรัมของกระต่ายปกติทุกระดับความเข้มข้น และเป็นความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้จะพบว่าการใช้แอนติเซรัมมีความเข้มข้นสูง (1:10) อนุภาคไวรัสถูกตกแต่งด้วยแอนติเซรัม (decoration) หนาทึบกว่าเมื่อใช้แอนติเซรัม 1:50 1:100 และ 1:500 (รูปที่ 1-5)

ตารางที่ 1 จำนวนอนุภาคไวรัสที่ตรวจพบเมื่อใช้ CTV antiserum ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

| ความเข้มข้น | ค่าเฉลี่ยจำนวนอนุภาคไวรัส/ช่องกริด |
|---|---|
| 1:10 | 17.65[a] |
| 1:50 | 11.70[b] |
| 1:100 | 5.20[c] |
| 1:500 | 3.55[d] |
| Negative stain | 4.70[c] |

อักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธีการของ Duncan's multiple range test

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเม็ดทองที่จับเกาะบนอนุภาคไวรัสเมื่อใช้ CTV antiserum ที่ระดับ ความเข้มข้นแตกต่างกัน

| ความเข้มข้น | ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดทอง/อนุภาค CTV |
|---|---|
| 1:10 | 145.97[a] |
| 1:50 | 95.70[b] |
| 1:100 | 49.90[c] |
| 1:500 | 27.62[d] |

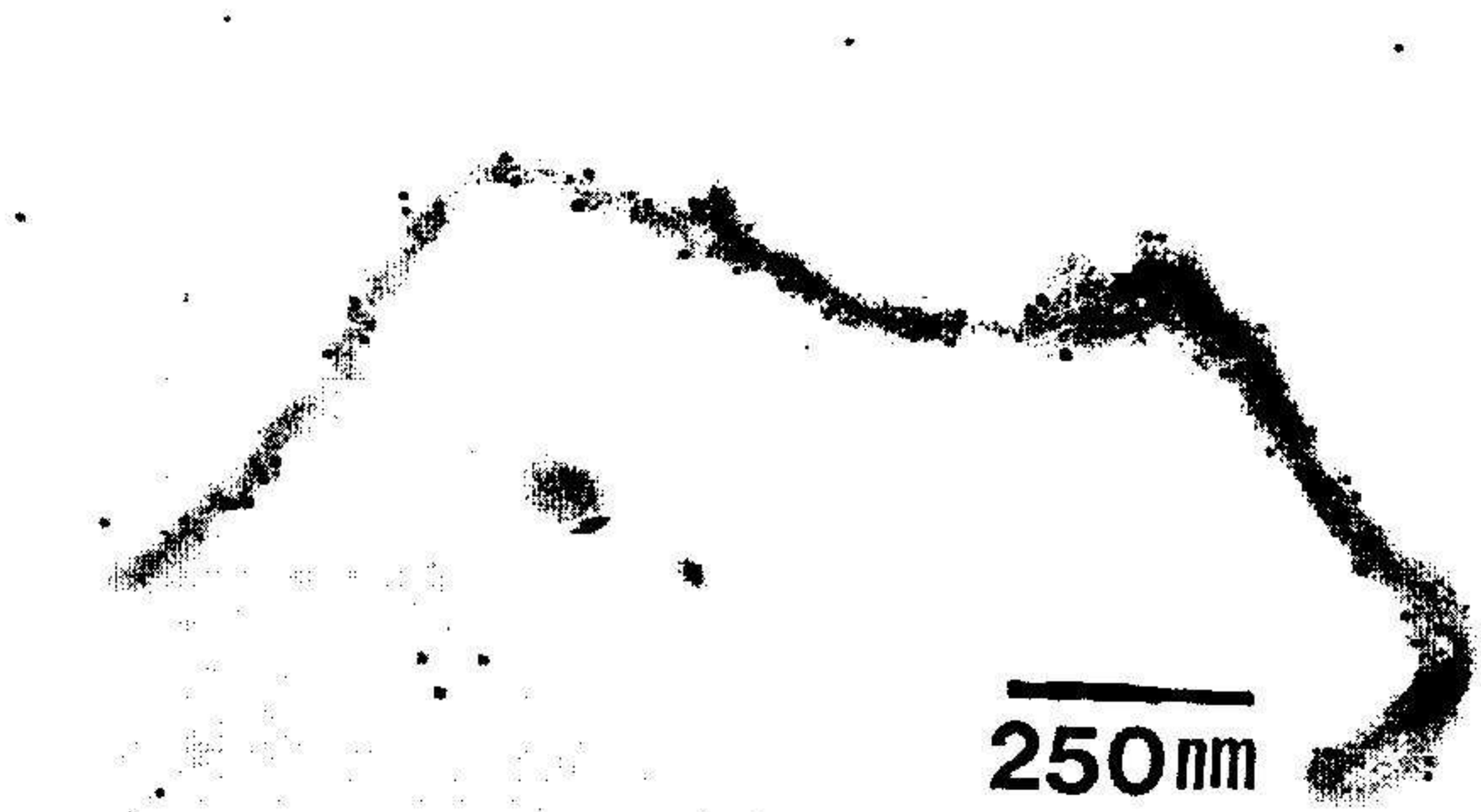
อักษรเหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและอักษรต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามวิธีการของ Duncan's multiple range test

ตารางที่ 3 จำนวนเม็ดทองที่จับเกาะบนอนุภาคไวรัสเมื่อใช้ CTV antiserum และ Normal rabbit serum

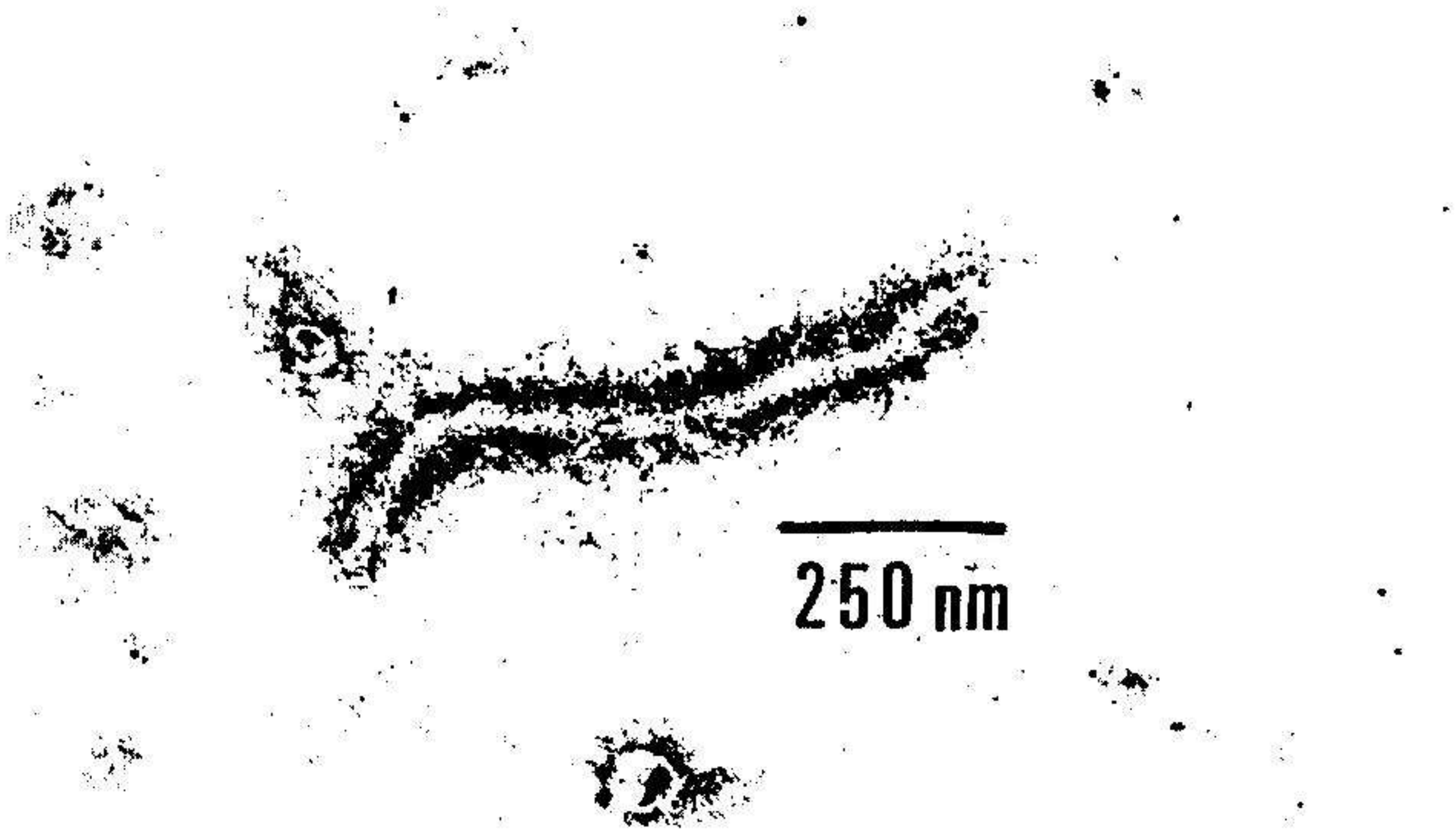
| ความเข้มข้น | จำนวนเม็ดทอง/อนุภาค CTV | |
|---|---|---|
| | **CTV antiserum** | **Normal rabbit serum** |
| 1:10 | 145.97 | 7.27** |
| 1:50 | 95.70 | 4.52** |
| 1:100 | 49.90 | 2.77** |
| 1:500 | 27.62 | 0.55** |

** แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

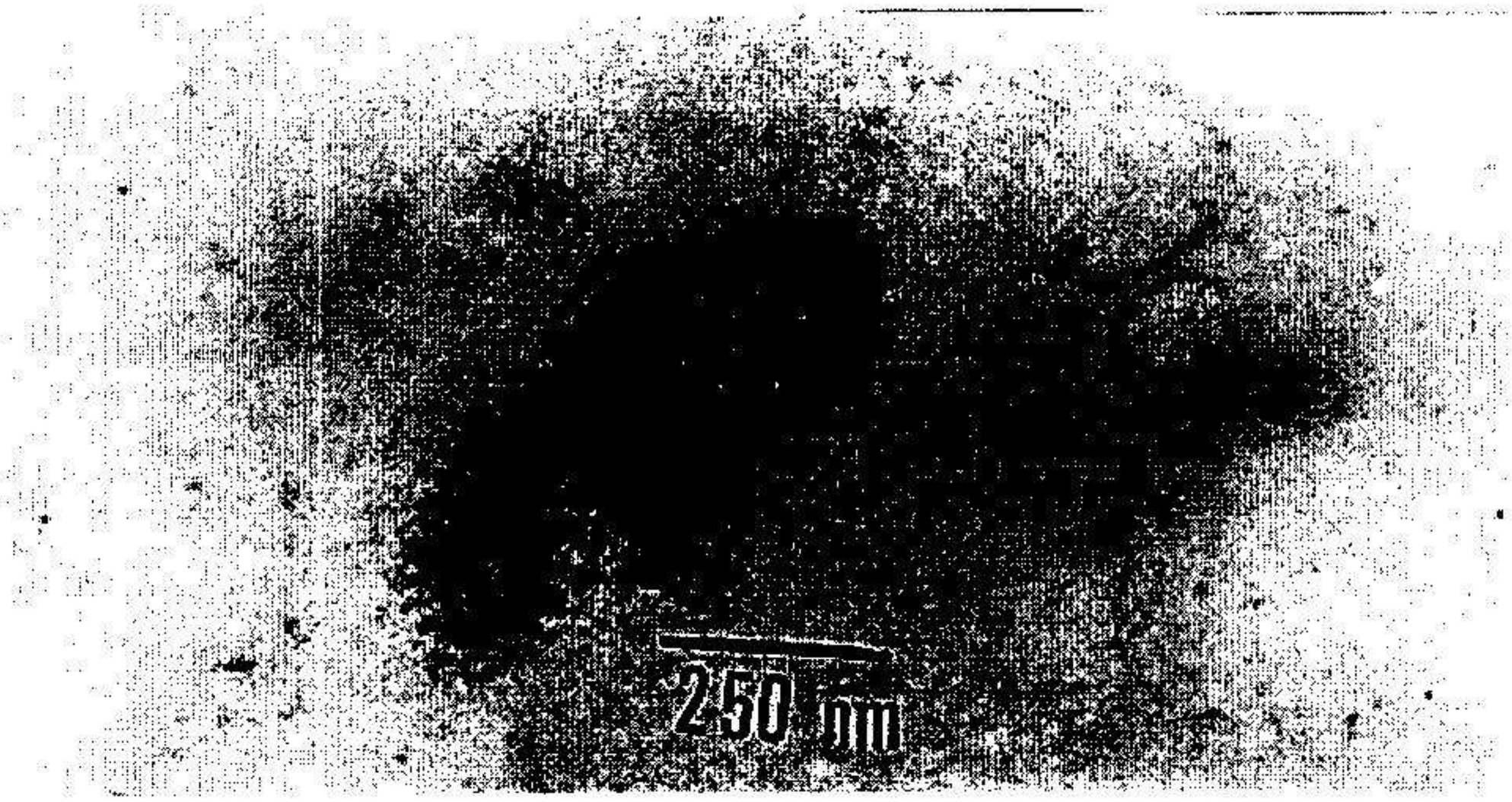
วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยโดย Duncan's multiple range test.




**รูปที่ 1** แสดงอนุภาค CTV ในน้ำคั้นใบส้มจุกดักจับด้วย CTV antiserum ที่ระดับความเข้มข้ม 1:10 และ Protien A-gold (9 nm.)

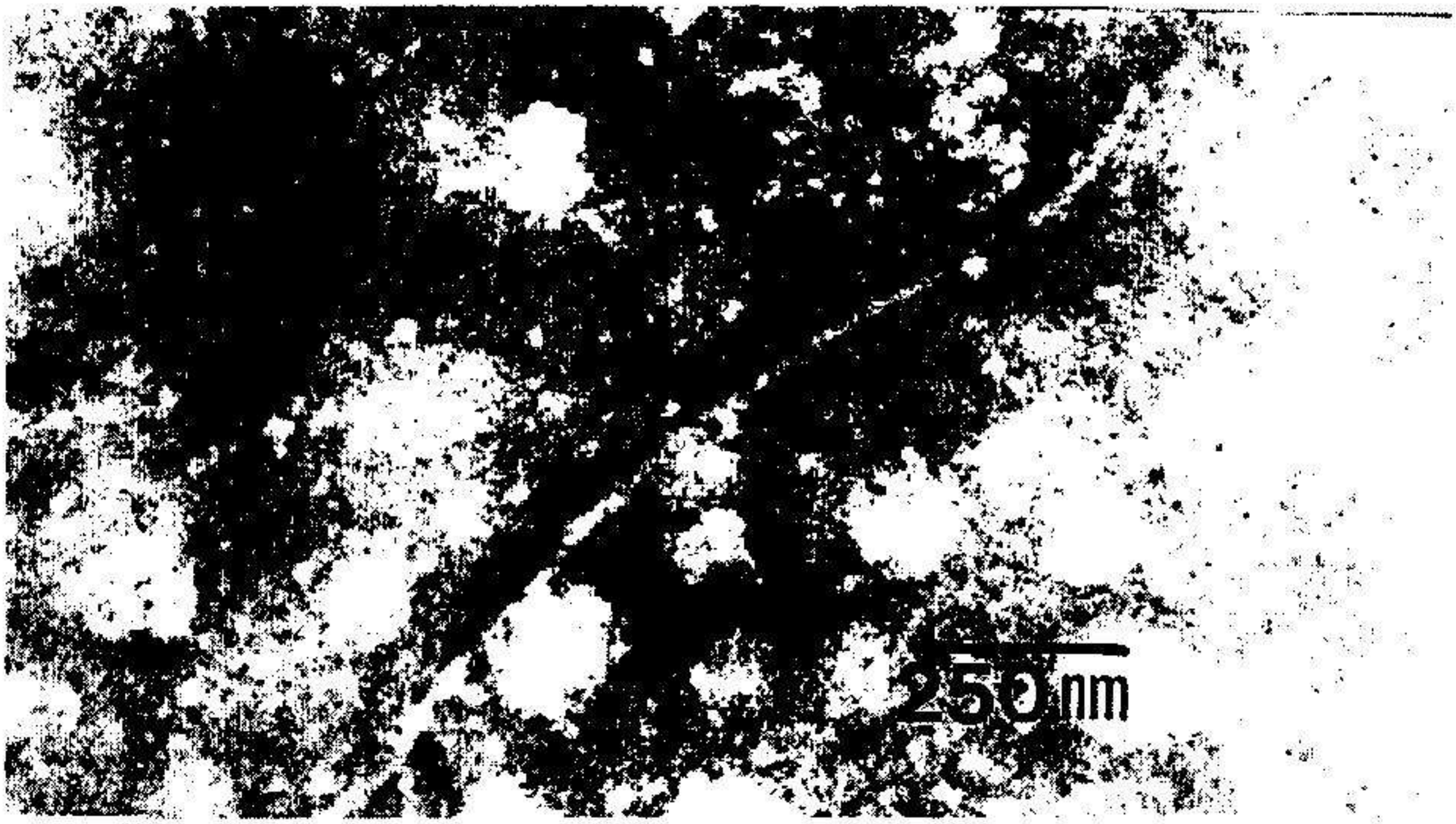



**รูปที่ 2** แสดงอนุภาค CTV ในน้ำคั้นใบส้มจุกดักจับด้วย CTV antiserum ที่ระดับความเข้มข้ม 1:50 และ Protien A-gold (9 nm.)




**รูปที่ 3** แสดงอนุภาค CTV ในน้ำคั้นใบส้มจุกดักจับด้วย CTV antiserum ที่ระดับความเข้มข้ม 1:100 และ Protien A-gold (9 nm.)

**รูปที่ 4** แสดงอนุภาค CTV ในน้ำคั้นใบส้มจุกดักจับด้วย CTV antiserum ที่ระดับความเข้มข้น 1:500 และ Protien A-gold (9 nm.)




**รูปที่ 5** แสดงอนุภาค CTV ในน้ำคั้นใบส้มจุกย้อมด้วย 2% uranyl acetate

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการตรวจหาอนุภาคทริสเตซาไวรัสในน้ำคั้นของส้มจุกโดยเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์พบจำนวนอนุภาคไวรัสมากกว่าการใช้เทคนิคย้อมสี (negative stain) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เมื่อใช้แอนติเซรัมที่ระดับความเข้มข้น 1:10 และ 1:50 (ตารางที่ 1) แต่เมื่อลดความเข้มข้นของแอนติเซรัมที่ระดับ 1:100 และ 1:500 จำนวนไวรัสที่ตรวจพบใกล้เคียงกับการย้อมสี ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้เทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์ ทำให้ตรวจพบอนุภาคไวรัสได้มากขึ้น เมื่อใช้แอนติเซรัมซึ่งมีระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม แต่ในการทดลองครั้งนี้ระดับความเข้มข้นของแอนติเซรัมที่ให้ผลการตรวจนับอนุภาคไวรัสสูงสุดคือ 1:10 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแอนติเซรัมที่ใช้มีความสามารถในการทำปฏิกริยากับไวรัสต่ำ (low titre) ดังนั้นจึงควรเพิ่มประสิทธิภาพของแอนติเซรัมที่ใช้เพื่อที่จะใช้แอนติเซรัมในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้ซึ่งจะเป็นการประหยัดแอนติเซรัม

หากเปรียบเทียบความยากง่ายในการค้นหาอนุภาคไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน จากกริดที่เตรียมโดยเทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์และเทคนิคการย้อมสี พบว่าเทคนิคแรกตรวจหาอนุภาคไวรัสได้ง่ายกว่า เพราะสังเกตุได้จากเม็ดทองที่จับเกาะอยู่บนอนุภาค (รูปที่ 1-4) อีกทั้งในการเตรียมตัวอย่างด้วยวิธีดังกล่าวมีการล้างกริดทุกขั้นตอน ทำให้พื้นหลัง (back ground) สะอาดขึ้น มองเห็นอนุภาคไวรัสชัดเจนยิ่งขึ้น เปรียบเทียบกับการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคการย้อมสี พื้นหลังปนเปื้อนด้วยเศษชิ้นส่วนของพืช ทำให้อนุภาคไวรัสกลมกลืนไปกับพื้นหลัง สังเกตุได้ยาก (รูปที่ 5) นอกจากนี้การใช้ BSA ผสมในบัพเฟอร์ที่ใช้ล้างกริด ช่วยปิดกั้น (block) พื้นที่ว่างบนกริดที่ไม่มีอนุภาคไวรัสปรากฏอยู่ไม่ให้ protein A-gold ไปจับเกาะในลักษณะ non-specific[10] ดังจะเห็นได้ว่าพื้นหลังในภาพถ่าย (รูปที่ 1-4) มีเม็ดทองปรากฏอยู่น้อยมาก นอกจากนี้อนุภาคไวรัสที่ตรวจพบมีทั้งที่เป็นอนุภาคสมบูรณ์ (full length) และที่แตกหัก

ผลการตรวจนับจำนวนเม็ดทองที่จับเกาะอยู่บนอนุภาคไวรัสแสดงให้เห็นว่าแอนติเซรัมที่ใช้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อทริสเตซาไวรัสที่ต้องการตรวจหา ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อใช้แอนติเซรัมของ ทริสเตซาในการเตรียมตัวอย่าง พบจำนวนเม็ดทองที่จับเกาะอยู่บนอนุภาคไวรัสมากกว่าเมื่อใช้ normal rabbit serum ในทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 3) ซึ่งเป็นความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ดังนั้นการใช้เทคนิคอิมมูโนโกลเลเบลลิงค์ในการตรวจเชื้อไวรัสจึงสามารถใช้แยกแยะชนิดหรือสายพันธุ์ไวรัสได้ด้วย โดยขึ้นอยู่กับแอนติเซรัมที่นำมาใช้