ว.วิชาการ กษ. 11 (3) : 162 - 168

วารสารวิชาการเกษตร ปีที่ 11 กันยายน - ธันวาคม 2536

การวินิจฉัยความแตกต่างระหว่างเชื้อมายโคพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและหญ้าแพรกด้วยวิธี ELISA และ SDS-PAGE

Discrimination between MLOs associated with white leaf diseases of sugarcane and bermuda grass by ELISA and SDS-PAGE

นงลักษณ์ ศรินทุ[1] และ เอ็ม เอฟ คลาค[2]

Nonglak Sarindu[1] and M.F. Clark[2]

ABSTRACT

Cuttings from sugarcane and bermuda grass plants with white leaf symptoms were collected in Thailand and transferred to a glassshouse at East Malling during 1989-90. Using these plants as source materials, procedures were devised for the partial purification of MLO-associated immunogens. Antisera were raised separately to the sugarcane white leaf (SCWL) and bermuda grass white leaf (BGWL) immunogens. These antisera exhibited specificity for their homologous MLO antigens in F $(ab')_2$ indirect enzyme linked immunosorbent assays (ELISA). No cross reaction was observed in reciprocal tests between these two MLO sources and their antisera. Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting of SCWL and BGWL antigen preparations revealed a single major protein antigen for each MLO, with molecular weight of 21 kd for SCWL and 19 kd for BGWL. Each MLO antigen reacted only with its homologous antibody. The specificity of the antibody reaction by ELISA, western blotting and the differences in electrophoretic migration of the MLO antigens provide evidence for the separate identities of the MLOs causing the sugarcane and bermuda grass white leaf diseases.

Keywords : Sugarcane and bermuda grass. MLO antiserum, white leaf disease

บทคัดย่อ

การทดลองทำที่เมืองอีสท์มอลลิ่ง ประเทศอังกฤษ ในปี 2532-2533 โดยนำท่อนพันธุ์อ้อยที่เป็นโรคใบขาว และหญ้าแพรกใบขาวในธรรมชาติ ไปปลูกในโรงต้นไม้ทดลอง และใช้อ้อยและหญ้าแพรกที่เป็นโรคดังกล่าว เป็นแหล่งของโรคซึ่งใช้แยกให้ได้โปรตีนของมายโคพลาสมาหรือแอนตีเจน ผลิตแอนตีซีรัมของเชื้อมายโคพลาสมาสาเหตุของโรคแต่ละชนิด เมื่อทดสอบปฏิกิริยากับแอนตีเจนหรือน้ำคั้นจากใบอ้อยเป็นโรคโดยวิธี F$(ab')_2$ indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ปรากฏว่า แอนตีซีรัมของเชื้อมายโคพลาสมาแยกจากโรคใบขาวอ้อยจะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับน้ำคั้นจากอ้อยเป็นโรคใบขาว และแอนตีซีรัมของเชื้อมายโคพลาสมาแยกจากโรคใบขาวหญ้าแพรก

[1] กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กทม. 10900

Division of Plant Pathology and Microbiology, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

[2] Horticulture Research International, East Malling, Kent ME19 6BJ, U.K.

จะทำปฏิกิริยาเฉพาะกับน้ำคั้นจากหญ้าแพรกเป็นโรคใบขาว แอนตีซีรัมทั้งสองชนิดไม่ทำปฏิกิริยากับแอนตีเจนต่างชนิด เมื่อใช้โปรตีนของมายโคพลาสมาจากอ้อยใบขาวและจากหญ้าแพรกใบขาว มาแยกโดยวิธี Sodium dodeeyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ western blot ปรากฏว่ามายโคพลาสมาแต่ละชนิดจะมีโปรตีนสำคัญหนึ่งชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน คือ 21 kd สำหรับอ้อยใบขาว และ 19 kd สำหรับหญ้าแพรกใบขาว โปรตีนของมายโคพลาสมาแต่ละชนิดจะทำปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับแอนตีบอดีของโปรตีนนั้น ๆ เท่านั้น จากปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงจากวิธี ELISA, western blot และจากระยะทางการเคลื่อนที่ใน PAGE แสดงว่าเชื้อมายโคพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อย และโรคใบขาวหญ้าแพรกเป็นเชื้อต่างชนิดกัน

คำหลัก : อ้อย และหญ้าแพรก มายโคพลาสมา แอนตีซีรัม โรคใบขาว

คำนำ

โรคใบขาวเป็นโรคที่สำคัญโรคหนึ่งของอ้อยในประเทศไทย ที่ทำให้ผลผลิตลดลงหรือเกือบเก็บผลผลิตไม่ได้เลย โรคนี้ระบาดทำความเสียหายในทุกพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งอ้อยที่ปลูกในเขต จ.ระยอง ชลบุรี ลำปาง อุดรธานี ประจวบคีรีขันธ์ และกำแพงเพชร (ลักษณ์ และคณะ 2528) อ้อยเป็นโรคจะแสดงอาการใบขาว การแตกกอน้อยและแตกเป็นฝอย ไม่ย่างปล้อง ต้นที่แสดงอาการรุนแรงจะตายไปในที่สุด Maramorosch และคณะ (1975) ได้ศึกษาอ้อยเป็นโรคใบขาวในประเทศไทย พบว่าโรคนี้มีสาเหตุจากเชื้อมายโคพลาสมา (Mycoplasma-like organism หรือ MLO) เชื้อโรคจะถ่ายทอดโดยติดไปกับท่ออ้อย และโดยมีเพลี้ยจั๊กจั่นสีน้ำตาล *Matsumuratettix hiroglyphicus* Mat. **เป็นพาหะ** (Matsumoto *et al.* 1968, Yang and Pan, 1970) ลักษณ์ และ คณะ(2517)สำรวจพบแมลงชนิดนี้แพร่ระบาดในท้องที่ จ.อุดรธานี และประจวบคีรีขันธ์ เป็นแมลงชนิดเดียวกันกับที่เป็นพาหะนำโรคใบขาวที่ไต้หวัน

หญ้าแพรก *(Cynodon dactylon)* ใบขาว เป็นอีกโรคหนึ่งที่พบเห็นทั่วไปตามแหล่งที่มีหญ้าแพรกขึ้นอยู่ และมีรายงานว่ามีสาเหตุจากเชื้อมายโคพลาสมา (Maramorosch *et al.* 1975, Bar-Joseph *et al.* 1975) ยังไม่มีรายงานว่าโรคใบขาวอ้อยกับโรคใบขาวหญ้าแพรกจะเกี่ยวข้องกันหรือไม่ และไม่มีหลักฐานยืนยันการถ่ายทอดเชื้อโรคจากอ้อยใบขาวไปยังหญ้าแพรกหรือตรงกันข้าม

การแยกเชื้อสาเหตุจากพืชเป็นโรคให้บริสุทธิ์ เป็นสิ่งจำเป็นในการผลิตแอนตีซีรัมที่มีคุณภาพสำหรับใช้วินิจฉัยโรคด้วยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) จากการค้นคว้าวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ เมื่อไม่นานมานี้ ทำให้การแยกเชื้อมายโคพลาสมาจากพืชเป็นไปได้มากขึ้น จึงมีรายงานการผลิตแอนตีซีรัมของเชื้อมายโคพลาสมาพืชออกมาเป็นจำนวนมาก (Clark *et al.* 1983, Sinha & Benhamou 1983, Lin and Chen 1985, Caudwell *et al.* 1988, Clark *et al.* 1988, Clark *et al.* 1989, Jiang *et al.* 1989) ซึ่งสามารถใช้ในการวินิจฉัยและจำแนกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิดได้

ในรายงานนี้จะกล่าวถึงการผลิตแอนตีซีรัมของเชื้อมายโคพลาสมาสาเหตุโรคใบขาวอ้อยและหญ้าแพรก เพื่อใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของสองโรคนี้ ด้วยวิธี ELISA และวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) และ western blot

อุปกรณ์และวิธีการ

นำท่อนอ้อยเป็นโรคใบขาวจากสภาพไร่ หญ้าแพรกที่มีอาการใบขาวในธรรมชาติ และหญ้าแพรกปกติมาปลูกขยายพันธุ์ไว้ในเรือนต้นไม้ทดลองที่เมืองอีสท์มอลลิ่ง ประเทศอังกฤษ ส่วนอ้อยปกติคืออ้อยที่ไม่เป็นโรคใบขาวนั้นได้จากการผลิตโดยการเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Visessuwan *et al.* 1988) และปลูกขยายพันธุ์ไว้ในสถานที่เดียวกัน

การผลิตแอนตีซีรัมทำเป็น 2 ชุดทั้งของโรคใบขาวอ้อย และใบขาวหญ้าแพรก โดยใช้วิธีการเตรียมแอนตีเจนต่างกันเล็กน้อย ซึ่งเป็นวิธีที่ปรับปรุงจากวิธีของ Clark และคณะ (1983, 1988) ในชุดแรกเตรียมแอนตีเจนจากอ้อยใบขาวและหญ้าแพรกใบขาวด้วยวิธีเดียวกัน โดยใช้ใบอ้อยเป็นโรคหรือต้นและใบหญ้าแพรกเป็นโรคหนัก 5 กรัม มาล้างในน้ำก๊อกนานประมาณ 30 นาที ซับน้ำให้แห้ง บดด้วยโกร่งใน GM บัฟเฟอร์ (buffer) ซึ่งเย็นจัด ปริมาณ 50 มิลลิลิตร อันประกอบด้วย 0.3 M glycine, 0.05 M $MgCl_2$, 0.1 M NaCl และซูโครส 50 กรัม/ลิตร ที่ pH 8 และเติม sodium mercaptoacetate จำนวน 2 กรัม/ลิตร บดละเอียด แล้วคั้นน้ำสกัดจากพืชผ่านผ้าขาวบางสองชั้น ปั่นน้ำคั้นในเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง 2,000 g นาน 5 นาที ปั่นส่วนที่ไม่ตกตะกอนอีกครั้งด้วยแรงเหวี่ยง 8,000 g เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนที่

ไม่ตกตะกอนมาเติม polyethylene glycol (PEG) 6,000 ในปริมาณ 60 กรัม/ลิตร คนให้ละลาย แล้วตั้งไว้ในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง ปั่นด้วยความเร็ว 12,000 g นาน 40 นาที ละลายตะกอนสีเขียวด้วย 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมสารแขวนลอยนี้กับ Freund's complete adjuvant สำหรับการฉีดกระต่ายครั้งแรก หรือ Freund's incomplete adjuvant สำหรับการฉีดกระต่ายครั้งต่อ ๆ ไป ผสมให้เข้ากันจนเป็น emulsion การฉีดกระต่ายแต่ละครั้งทำการฉีดที่กล้ามเนื้อ (intramuscular) และใต้ผิวหนัง (subcutaneous & intradermal) หลาย ๆ จุด ฉีดกระต่ายทุก 2-3 สัปดาห์ เจาะเลือดกระต่ายจากเส้นเลือดที่ใบหูหลังจากการฉีดครั้งที่สี่ประมาณ 7 วัน และมีการฉีดครั้งต่อ ๆ ไป เพื่อกระตุ้นให้กระต่ายสร้างแอนติบอดีมากขึ้น แล้วเจาะเลือดมาทดสอบแอนติซีรัมที่ได้ใช้ในการประเมินขั้นตอนต่าง ๆ ของวิธีการเตรียมแอนติเจนด้วยวิธี ELISA (Fig.1) จากผลการประเมินนี้นำมาปรับปรุงวิธีการให้ดีขึ้น

การผลิตแอนติซีรัมชุดที่สองของอ้อยใบขาว เริ่มจากการคั้นน้ำจากใบอ้อยเหมือนวิธีดังกล่าวแล้วหลังจากกรองด้วยผ้าขาวบาง นำมาผ่าน Sepharose 4B column ซึ่งล้างด้วย GM บัฟเฟอร์ เก็บส่วนสีเขียวส่วนแรกที่ผ่าน column ออก ปั่นด้วยแรงเหวี่ยงที่ 63,000 g นาน 40 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วย PBS ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ปั่นอีกครั้งด้วยแรงเหวี่ยง 2,000 g เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดตะกอน เอาส่วนที่ไม่ตกตะกอนมาผสมกับ adjuvant ให้เข้ากันเป็น emulsion ฉีดเข้ากระต่ายเช่นเดียวกับที่กล่าวแล้ว

การเตรียมแอนติเจนชุดที่สองของหญ้าแพรกใบขาว ทำการสกัดน้ำคั้นจากหญ้าแพรกวิธีเดียวกับที่กล่าวมาแล้ว ทำให้โปรตีนตกตะกอนด้วย PEG 6,000 แล้ว de-saltged บน sepharose 4B column ซึ่งปรับสภาพด้วย GM บัฟเฟอร์ เพื่อช่วยการละลายและกำจัด PEG เก็บสารแขวนลอยสีเขียวส่วนแรกที่ผ่าน column ออกมา ผสมกับ IgG ที่เตรียมจากแอนติซีรัมของหญ้าแพรกปกติ ในอัตราส่วน 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักพืช 4 กรัม ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) แล้วปั่นด้วยความเร็ว 8,000 g นาน 5 นาที เพื่อกำจัดตะกอนแอนติบอดีของกระต่ายส่วนเกิน และแอนติเจนที่ถูกจับด้วยแอนติบอดีแล้วแต่ไม่ตกตะกอนจะถูกกำจัดด้วยการผ่าน column ของ protein A-Sepharose 4B แอนติเจนของมายโคพลาสมาจะได้จากการปั่นอีกครั้งหนึ่งที่ 63,000 g เป็นเวลา 40 นาที ละลายตะกอนที่ได้จากการหมุนเหวี่ยง ใน 0.1 M PBS 1 มิลลิลิตร ผสมกับ adjuvant และฉีดเข้ากระต่ายด้วยวิธีดังกล่าวแล้ว

แอนติซีรัมที่ได้จากกระต่ายจะต้องทำการ cross-absorbed ด้วยน้ำสกัดจากพืชปกติหลาย ๆ ครั้งตามวิธีของ Clark และคณะ (1983) ทำการแยกเอา IgG ตามวิธีของ Clark & Adams (1977) แล้วแยกเอา $F(ab')_2$ ด้วยวิธีของ Barbara & Clark (1982) IgG และ $F(ab')_2$ เก็บไว้ที่ 4 °C โดย ใส่ sodium azide ปริมาณ 0.02 กรัม/ลิตร หรือผสมกับ glycerol ปริมาณเท่ากัน

การทดสอบด้วยวิธี ELISA ใช้ $F(ab')_2$ indirect method (Barbara Clark 1982) IgG ที่ใช้จะทำให้เจือจางด้วยน้ำคั้นของพืชปกติในอัตราส่วน 1:40 (w/v) ตรวจการจับของแอนติบอดีด้วย horseradish peroxidase-labelled protein A (PA-HRP) (Sigma Chemical Company) ใช้ 3,3'5,5'-tetramethylbenzidine (Bos *et al.*, 1981) แอนติเจน แอนติบอดี และ PA-HRP ทำให้เจือจางด้วย PBS-TPO (PBS + 0.05% Tween 20, ovalbumin จำนวน 2 กรัม และ polyvinyl pyrrolidone จำนวน 20 กรัม ในหนึ่งลิตร)

การวิเคราะห์โปรตีนของ MLO ด้วยวิธี sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ต้องต้มให้เดือด 3 นาทีใน tris-HCl sample buffer ซึ่งประกอบด้วย 20 กรัม/ SDS 1 ลิตร และ 5% ของ 2-mercaptoethanol การแยกทำใน 12% acrylamide slab gel หนา 0.75 มม. (mini-Protean, Bio-Rad Laboratories Ltd). ซึ่งใช้ระบบบัฟเฟอร์ ซึ่งรายงานโดย Laemmli (Laemmli 1970) หลังจากทำ electrophoresis แล้ว ย้ายแผ่น (slab) gel ไปยังเครื่อง mini-transblot (Bio-Rad Laboratories Ltd.) ซึ่งโปรตีนจะถูกถ่ายไปยัง nitro-cellulose membrane (Schleicher & Schull) ด้วยกระแสไฟฟ้าที่ 30 โวลท์ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และใช้บัฟเฟอร์ประกอบด้วย 25 mM tris-glycine, pH 8.3 หลังจากนั้นแช่ เมมเบรน ใน 20 กรัม/ bovine serum albumin (BSA) 1 ลิตร หรือ 50 กรัม/ skim milk powder 1 ลิตร แล้ว probe ด้วย antibody ของ SCWL และ BGWL ผสมกัน ตามด้วย protein A ซึ่ง conjugate กับ alkaline phosphatase

(PA-ALP) และตรวจปฏิกิริยาด้วย sodium 1-naphthyl phosphate และ Fast red TR ใน Tris-HCl-$MgCL_2$ บัฟเฟอร์ pH 8.4

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเตรียมแอนตีเจน

โรคใบขาวอ้อย จากการประเมินวิธีการแยกเชื้อมายโคพลาสมาจากอ้อยใบขาวด้วยแอนตีซีรัมชุดแรก ปรากฏว่าสูญเสียแอนตีเจนไปเป็นจำนวนมากทุกขั้นตอน เมื่อปรับปรุงวิธีการแยกเชื้อในการผลิตแอนตีซีรัมชุดที่ 2 ซึ่งลดขั้นตอนของวิธีการลงเป็นการประหยัดเวลาและลดการสูญเสียแอนตีเจนได้มาก (Fig.1) การแยกเชื้อแต่ละครั้งจะได้แอนตีเจนลดลงจากปริมาณของแอนตีเจนในน้ำคั้นพืชเริ่มต้นในช่วง 30 - 70% ถึงแม้มีการเจือปนของส่วนประกอบของพืชในขั้นตอนสุดท้ายของการแยกเชื้ออย่างเห็นได้ชัด แต่แอนตีซีรัมที่ผลิตจากการแยกเชื้อวิธีนี้ก็ให้ titer สูงกว่าแอนตีซีรัมที่ใช้วิธีการแยกเชื้อวิธีแกร

โรคใบขาวหญ้าแพรก การแยกเชื้อโดยวิธีการที่ปรับปรุงให้ดีขึ้นในการผลิตแอนตีซีรัมชุดที่ 2 ให้แอนตีเจนสูงกว่าการแยกเชื้อของโรคใบขาวอ้อยมาก ให้แอนตีเจนสูงทุกครั้งที่ทำการแยกเชื้อ ราว 80% ของแอนตีเจนในน้ำคั้นพืชเริ่มต้น (Fig.1) แอนตีซีรัมที่ได้จากการฉีดกระต่ายด้วยแอนตีเจนซึ่งเตรียมโดยวิธีนี้ให้ titer สูงกว่าแอนตีซีรัมชุดแรก และมีแอนตีซีรัมต่อส่วนประกอบของพืชเจือปนน้อย

การวินิจฉัยมายโคพลาสมาด้วยวิธี ELISA

ทดสอบคุณภาพของแอนตีซีรัมของโรคใบขาวอ้อยและของใบขาวหญ้าแพรกในการตรวจจับเชื้อมายโคพลาสมาจากน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่ปลูกในเรือนทดลอง ด้วยวิธี $F(ab')_2$ indirect ELISA ปรากฏว่าอ้อยที่แสดงอาการใบขาวทุกต้นจะมีปฏิกิริยากับแอนตีซีรัม แต่อ้อยที่ไม่เป็นโรคจะให้ผลเช่นเดียวกับบัฟเฟอร์ ซึ่งใช้เป็นตัวเปรียบเทียบ ค่า ELISA จากอ้อยใบขาวแต่ละต้น

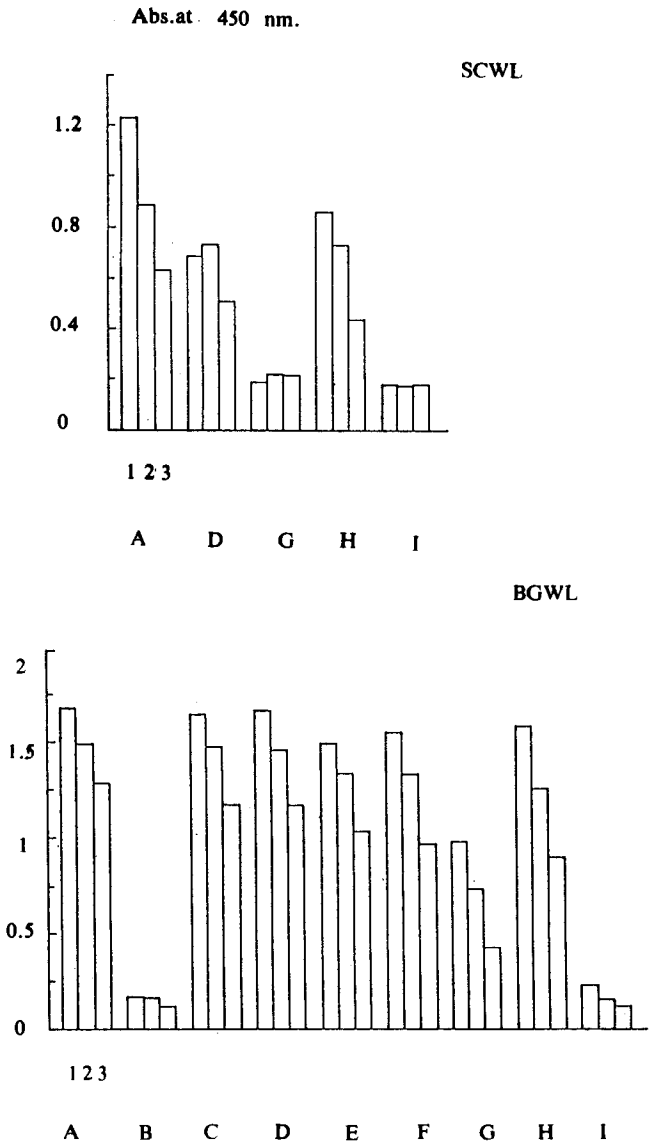

Fig. 1 Purification of MLO-associated antigens from extracts of sugar-cane whileleaf (SCWL) and bermuda-grass whileleaf (BGWL) infected plants. detection of antigens by ELISA following purification treatments, 1,2,3=antigen preparations diluted 1:20, 1:63 and 1:200, respectively, relative to fresh weight of plant tissue extracted. Rabbits were immunized with material corresponding to treatment H.Treatments:A,8K s/n;B,PEG pellet; D, x-absorbed; F, ex PAS;G, 40K s/n; H, 40K pellet; I, healthy 8K s/n.

แปรปรวนมาก แต่ไม่สามารถบอกได้แน่นอนถึงการกระจาย ของเชื้อมายโคพลาสมาภายในต้นพืช ความเข้มของปฏิกิริยา ELISA ไม่เป็นไปตามความเข้มของอาการใบขาว

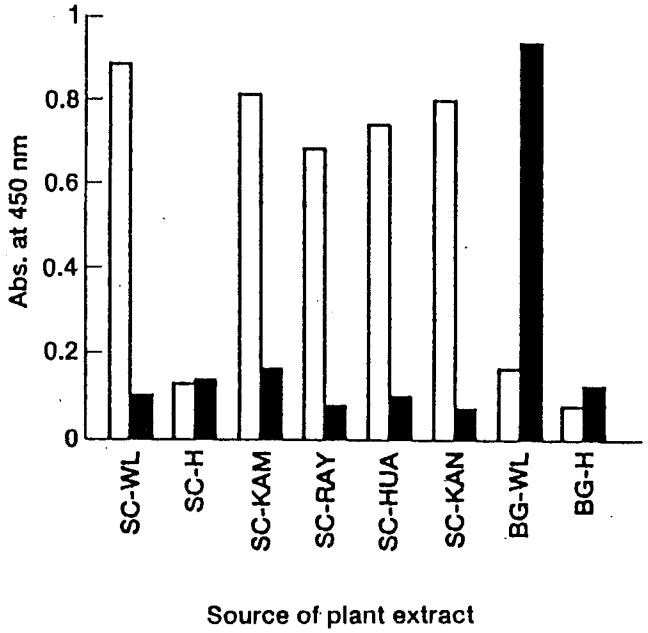

Fig.2 Detection by ELISA of sugar-cane whiteleaf (SCWL) MLO-associated antigens from fresh or freezedried samples of whiteleaf-affected sugar-cane plants growing in different locations in Thailand. Fresh leaf extracts were diluted 1:20 (g fr. wt/ml) relative to the weight of plant tissue extracted. Freeze-dried samples were soaked in 100 v/g dried tissue of extract buffer for 30 min prior to testing. SC-WL, SC-H = fresh, whiteleaf or healthy sugar-cane tissue, respectively; BG-WL, BG-H = fresh, whiteleaf or healthy bermuda-grass tissue, respectively; SC-KAM, SC-RAY, SC-HUA, SC-KAN = freeze-dried sugar-cane leaf samples from Kamphaensang, Rayong, Huahin or Kanchanaburi districts, respectively.

, reaction with SCWL antibodies; reaction with BGWL antibodies.

สำหรับหญ้าแพรกใบขาวให้ค่า ELISA สูงเสมอ ถึงแ จะทำให้น้ำคั้นพืชเจือจางหลายร้อยเท่าก็ยังแสดงปฏิกิริยากั แอนตีซีรัม และน้ำคั้นจากหญ้าแพรกปกติจะไม่แสดปฏิกิริยาเล

อ้อยใบขาวจากแหล่งต่าง ๆ ซึ่งทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำ (freez dried) ก็ทำปฏิกิริยากับแอนตีซีรัมของเชื้อโรคใบขาว ทั้งอ้อ ปกติและอ้อยเป็นโรคไม่ทำปฏิกิริยากับแอนตีซีรัมของหญ้าแพร ใบขาว (Fig.2)

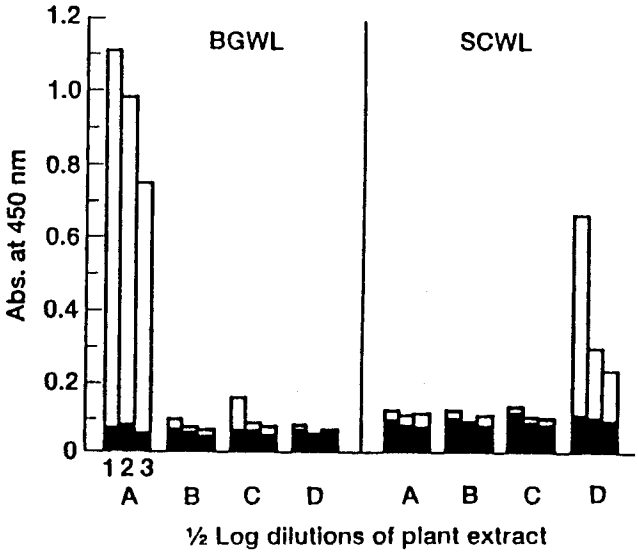

Fig. 3 Specificity of ELISA reaction of antibodies t sugar-cane whiteleaf (SCWL) and bermuda-grass whitelea (BGWL) MLO-associated antigens. 1,2,3 = leaf extract diluted 1:20, 1:63 and 1:200, respectively, relative to fres weight of plant tissue extracted. A, bermuda grass bulke sample; B, *B. distachya;* C, *D. aegyptium;* D, suga cane; ,infected plants; ,healthy plants.

การใช้แอนตีซีรัมของอ้อยใบขาวและหญ้าแพรกใบขาว ตรวจเชื้อมายโคพลาสมาในหญ้าสองชนิดที่มีอาการใบขาวและ ไม่มีอาการ คือ *Brachiaria distachya* และ *Dactyloctenium aegyptium* ด้วยวิธี ELISA ไม่มีปฏิกิริยาใด ๆ ระหว่างแอนตีเจน และแอนตีซีรัมต่างชนิด (Fig.3) แสดงให้เห็นถึงความแตกต่าง ของเชื้อมายโคพลาสมาในอ้อยและหญ้าแพรก ถึงแม้แอนตีซีรัม สองชนิดไม่ทำปฏิกิริยากับหญ้า *B. distachya* และ *D. aegyptium*

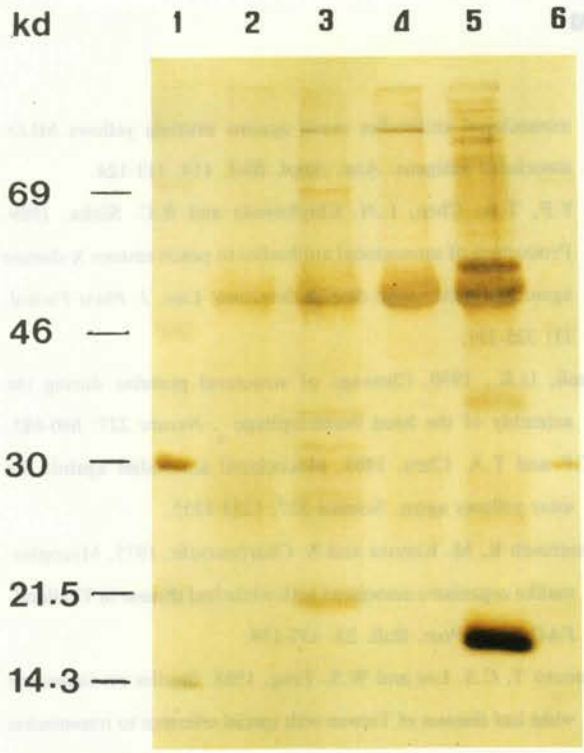

Fig.4. Immunostain of nitrocellulose membrane blotted proteins of SCWL and BGWL antigen preparations separated by SDS-PAGE. Tracks are; 2, healthy sugar-cane antigen; 5, BGWL antigen reacted with mixture of SCWL & BGWL antibodies and PA-ALP conjugate; 1,6, Rainbow protein molecular weight markers (Amesham International plc.)

แต่ก็สรุปไม่ได้แน่ชัดว่าเนื่องจากเป็นเชื้อต่างชนิด เพราะไม่มีแอนตีซีรัมของหญ้าทั้งสองมาทดลองเปรียบเทียบ

การวินิจฉัยมายโคพลาสมาด้วยวิธี SDS-PAGE

Polyacrylamide gel electrophoresis และ Western blot ของ SCWL และ BGWL แอนตีเจน (Fig.4) ปรากฏแถบ (band) ของโปรตีนสำคัญ 1 แถบ ของแต่ละแอนตีเจน ซึ่งต่างจากแอนตีเจนที่เตรียมจากอ้อยปกติ เมื่อคำนวณจากระยะการเคลื่อนที่ของ marker protein ซึ่งอยู่ใน gel เดียวกัน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน จะเท่ากับ 21 kd สำหรับ SCWL และ 19 kd สำหรับ BGWL แอนตีเจนแต่ละชนิดจะทำปฏิกิริยากับแอนตีบอดีของเชื้อนั้น ๆ เท่านั้น ซึ่งเป็นการยืนยันความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาที่ทดสอบโดยวิธี ELISA

ความเฉพาะเจาะจงของปฏิกิริยาของแอนตีบอดีโดยวิธี Western blot และความแตกต่างของระยะทางในการเคลื่อนที่ของแอนตีเจนของ MLO ทั้งสอง ใน electrophoresis เป็นหลักฐานยืนยันยิ่งขึ้นไปอีกว่า MLO สาเหตุของโรคใบขาวของอ้อย กับใบขาวหญ้าแพรกนั้นต่างชนิดกัน

สรุป

แอนตีซีรัมของเชื้อมายโคพลาสมาโรคใบขาวอ้อย และใบขาวหญ้าแพรก มีปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจงกับเชื้อชนิดนั้น ๆ ไม่เกิดปฏิกิริยาระหว่างโรคทั้งสอง แสดงให้เห็นว่าเชื้อโรคใบขาวอ้อยกับใบขาวหญ้าแพรกมีคุณลักษณะที่ต่างกัน ไม่ใช่เชื้อชนิดเดียวกัน และความทนทานของแอนตีเจนของสองเชื้อในระหว่างการเตรียมแอนตีเจน และตำแหน่งของโปรตีนต่างกันหลังจากการทำ western blot สนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าเชื้อต่างชนิดกันเป็นสาเหตุของโรคใบขาวอ้อยและใบขาวหญ้าแพรก

แอนตีซีรัมที่ผลิตได้สามารถใช้วินิจฉัยความสัมพันธ์ของเชื้อโรคดังกล่าวแล้ว ยังอาจใช้ตรวจเชื้อมายโคพลาสมาในอ้อยที่เก็บจากไร่ด้วยวิธีง่าย ๆ โดยการคั้นน้ำจากอ้อยเป็นโรคและทำให้เจือจางหลายร้อยเท่าก็ยังให้ปฏิกิริยาใน ELISA ซึ่งอาจใช้ให้เป็นประโยชน์ในการตัดทอนอ้อยปราศจากเชื้อเพื่อขยายพันธุ์ หรือในการผลิตพันธุ์อ้อยปลอดโรคโดยขบวนการทางเนื้อเยื่อ

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก Commission of the European Communities (CEC) project TS2.033.M(H) ในปี พ.ศ. 2532 - 2533 และดำเนินงานที่ Horticulture Research International เมือง East Malling ประเทศอังกฤษ โดยมี Dr. M.F. Clark เป็นที่ปรึกษาและผู้ร่วมงาน จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

ลักษณ์ วงศ์หิรัญภิญโญ ไสว เนื่องไผ่ และ อนงค์ จันทรศรีกุล. 2528. แมลงพาหะนำโรคใบขาวของอ้อย *Matsumuratetix hiroglyphicus* Mat. *กสิกร* 58 (6) : 503 - 507.

Barbara D.J and M.F. Clark. 1982. A simple indirect ELISA using $F(ab')_2$ fragments of immunoglobulin. *J. Gen. Virol.* 58: 315-322.

Bar-Joseph M, A. Zelcer and G. Loebenstein. 1975. Association of mycoplasmalike organisms with bermuda-grass yellow leaf. *Phytopath.* 65: 640-641.

Bos E.S, A.A. Van der Doelen, N. Van Rooy and A.H.W.M. Schuurs. 1981. 3,3',5,5'-Tetramethyl benzidine as an Ames test negative chromogen for horse-radish peroxidase inenzyme-immunoassay. *J. Immunoassay* 2: 187-204.

Caudwell A., C. Kuszala and A. Fleury. 1988. Preparation des antigenes des mycoplasmes (MLO) pathogenes de la flavescence doree, a partir de tissus vegetaux. *J. Phytopath.* 123: 124-132.

Clark M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.

Clark M.F, D.L. Davies and D.J. Barbara. 1983. Production and characteristics of antisera to *Spiroplasma citri* and clover phyllody-associated antigens derived from plants. *Ann. Appl. Biol.* 103: 251-259.

Clark MF, D.L. Davies, S.L. Buss and A. Morton. 1988. Serological discrimination among mycoplasma-like organisms using polyclonal and monoclonal antibodies. *Acta Horticulturae* 235: 107-113.

Clark M.F, A. Morton, S.L. Buss. 1989. Preparation of mycoplasma immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellows MLO-associated antigens. *Ann. Appl. Biol.* 114: 111-124.

Jiang Y.P, T.A. Chen, L.N. Chiykowski and R.C. Sinha. 1989. Production of monoclonal antibodies to peach eastern X-disease agent and their use in disease detection. *Can. J. Plant Pathol.* 11: 325-331.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage $_4$. *Nature* 227: 680-685.

Lin C.P and T.A. Chen. 1985. Mococlonal antibodies against the aster yellows agent. *Science* 227: 1233-1235.

Maramorosch K, M. Kimura and S. Chareonridhi. 1975. Mycoplasmalike organisms associated with white leaf disease in Thailand. *FAO Plant Prot. Bull.* 23: 137-139.

Matsumoto T, C.S. Lee and W.S. Teng. 1968. Studies on sugarcane white leaf diseases of Taiwan with special reference to transmission by a leafhopper, Epitettix hiroglyphicus Mats. Proceedings of the International Society of Sugarcane Technologists 13: 1090-1099.

Sinha R.C. and N. Benhamou. 1983. Detection of mycoplasmalike organism antigen from aster yellows-diseased plants by two serological procedures. *Phytopath.* 73: 1199 - 1202.

Visessuwan R., W. Korpraditskul, S. Attathom and S. Klingkong. 1988. Production of virus-free sugarcane by tissue culture. *Kasetsart J.* (National Science Supplement) 22: 30-36.

Yang S.L. and Y.S. Pan. 1970. Bionomics of *Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura, an insect vector of sugarcane white leaf disease. II. Development in relation to host plants. Report Taiwan Sugar Experiment Station 50 : 73-79.