

ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสกับการแพร่ระบาดของโรคใหม่แปลงปลูกแตงกวา
สลัดกับถั่วฝักยาวภายหลังการทำนา

RELATIONSHIP OF VIRUSES AND DISEASE EPIDEMIC IN ALTERNATE
CUCUMBER WITH YARD LONG BEAN CROP AFTER RICE



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของวารสารศึกษาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตรศาสตร์
บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ป.ศ. 2549

ISBN 974-15-2343-2

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

**ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสกับการแพร่ระบาดของโรคในแปลงปลูกแตงกวา
สลัดกับถั่วฝักยาวภายหลังการทำนา**

**RELATIONSHIP OF VIRUSES AND DISEASE EPIDEMIC IN ALTERNATE
CUCUMBER WITH YARD LONG BEAN CROP AFTER RICE**



คมนตรี แสงจินดา

KOMSORN SANGJINDA

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน... 63440
วัน,เดือน,ปี. 28 ส.ค. 2549

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2343-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**RELATIONSHIP OF VIRUSES AND DISEASE EPIDEMIC IN ALTERNATE
CUCUMBER WITH YARD LONG BEAN CROP AFTER RICE**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN PLANT PEST MANAGEMENT TECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2006

ISBN 974-15-2343-2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2006

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

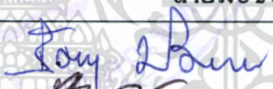

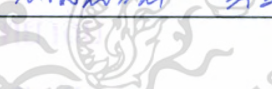
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสกับการแพร่ระบาดของโรคในแปลงปลูกแตงกวา
สลัดกับถั่วฝักยาวภายหลังการทำนา
RELATIONSHIP OF VIRUSES AND DISEASE EPIDEMIC IN ALTERNATE
CUCUMBER WITH YARD LONG BEAN CROP AFTER RICE

ชื่อนักศึกษา นายคมสร แสงจินดา
รหัสประจำตัว 44066307
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.นवलพรรณ งามยี่สุน

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.รัตนา	ปรมาคม	
ผศ.ดร.พรหมมาศ	คูหากาญจน์	
ผศ.ดร.นवलพรรณ	งามยี่สุน	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 26 เมษายน 549 เวลา 13.30-16.30 น.
สถานที่สอบ ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ (ชั้น 3 ตึก L)

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผศ.ดร.จารุวัตร เจริญสุข)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่... 24 ...เดือน... พฤษภาคม... พ.ศ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสกับการแพร่ระบาดของโรคในแปลงปลูก แตงกวาสลับกับถั่วฝักยาวภายหลังการทำนา
นักศึกษา	นายคมศร แสงจินดา
รหัสประจำตัว	44066307
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. นवलพรรณ งามยี่สุ่น

บทคัดย่อ

ความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัสกับการแพร่ระบาดของโรคในแปลงปลูกแตงกวาสลับกับถั่วฝักยาว ภายหลังการทำนาในเขตพื้นที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี ศึกษาโดยการสำรวจอาการของโรคไวรัสทั้งในถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืชและพืชข้างเคียง รวมทั้งแมลงในแปลงปลูกตลอดปี ลักษณะการถ่ายทอดเชื้อและการวินิจฉัยชนิดของเชื้อที่เข้าทำลายเพื่อผลในการควบคุมโรคไวรัส อย่างมีประสิทธิภาพ

การสำรวจอาการ โรคไวรัสใน ถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืช และพืชข้างเคียง ในแปลงปลูกพืช สลับภายหลังการทำนา พบอาการของโรคไวรัสในถั่วฝักยาวแตกต่างกัน 7 อาการดังนี้ 1) สีเขียว เข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อน แผลพอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง 2) ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง สีใบเขียว เข้ม ใบพอง พื้นใบบางส่วนสีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ 3) เส้นใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและ เส้นใบ พื้นใบสีเขียวอ่อน 4) ใบ ค้างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วใบและเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้น แคระแกร็น 5) ใบเรียวยาว ผิดรูปร่าง 6) ค้างเขียวตามเส้นใบและขอบใบโค้งลง 7) ยอดแตกพุ่ม แฉ่ ในแตงกวาพบอาการของโรคไวรัส 3 ลักษณะอาการ ได้แก่ 1) ค้างเหลืองกระจายทั่วใบ 2) เส้นใบและพื้นใบเป็นสีเหลือง 3) จุดพองสีเขียวกระจายทั่วใบ พื้นใบมีสีเขียวอ่อน เชื้อไวรัส สามารถถ่ายทอดด้วยวิธี Mechanical sap transmission จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวอาการที่ 1-6 และจากใบแตงกวาทั้ง 3 อาการ แต่อาการในแตงกวาที่ถูกถ่ายทอดมีอาการค้างเขียวแตกต่างกับ อาการที่ได้จากการสำรวจ นอกจากนี้ยังถ่ายทอดสู่ *Chenopodium amaranticolor*

ส่วนวัชพืชและพืชข้างเคียงที่ทำการสำรวจ ได้แก่ อุดพืชแสดงอาการค้างเขียวเป็นร่างแห ผักขมหนามแสดงอาการค้างเป็นจุดเหลืองอ่อน หญ้ายาง แสดงอาการค้างสีเขียวเข้มตามแนวเส้น ใบ ผักเสี้ยนแสดงอาการค้างเหลืองอ่อนใบบิดเบี้ยว ผักแคระแสดงอาการค้างสีเขียวตามเส้นใบ ครอบจักรวาลแสดงอาการใบลิบเล็ก ในพืชข้างเคียง โหระพาและแมงลักแสดงอาการค้างเหลืองใบ บิดเบี้ยว กระเพราแสดงอาการค้างเหลืองกระจายทั่วใบ มะเขือพวงแสดงอาการค้างเขียวอ่อนใบ

ฝักรูปเล็กน้อย มะเขือเทศแสดงอาการค้างเขียวเข้มใบเป็นคลื่น พริกแสดงอาการค้างเขียวอ่อนใบมีขนาดเล็ก ใบฝักรูป

จากการสำรวจแมลงในแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกัน และบริเวณรอบๆ แปลงปลูกในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบแมลง ได้แก่ แมลงหวีขาว (*Bemisia tabaci*) เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis gossypii*) เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ (*Myzus persicae*) เพลี้ยจักจั่นสีเขียว (*Nephotettix virescens*) เพลี้ยกระโดด (*Nilaparvata lugens*) ตั๊กแตน (*Cyrtacanthacris tatarica* L.) ค้างคาว (*Micraspis* sp.)

การตรวจสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวและแตงกวาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดอำเภอท่าช้าง จังหวัดเพชรบุรีอย่างละ 5 พันธุ์ดังนี้ พันธุ์ถั่วฝักยาว ได้แก่ พันธุ์ขุนศึก No.7 พันธุ์สมบูรณ์โชค No.99 พันธุ์ไผ่ขวาง 005 พันธุ์ถั่วน้ำชี พันธุ์ BIG 1 และ พันธุ์แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มีชัย พันธุ์เมฆอน พันธุ์อะตอม พันธุ์อมตะ 765 พันธุ์เทมมี พบว่าในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ถั่วฝักยาวเริ่มแสดงอาการของโรคไวรัส และในเวลา 4 สัปดาห์ อาการที่ปรากฏมีความแตกต่างกัน 4 ลักษณะอาการ ได้แก่ อาการใบค้างเป็นปื้นเล็กๆตามด้วยอาการเหลืองทั้งใบก่อนที่ใบจะหลุดร่วง อาการค้างเขียวเป็นร่างแหตามเส้นใบ อาการแผลจุดสีเขียวอ่อนกระจายบนใบ ซึ่งอาการทั้ง 3 ลักษณะนี้พบบนใบแก่ก่อน ส่วนอาการจุดเหลืองบนใบ เส้นใบหดยู่ทำให้ใบบิดเบี้ยว พบปรากฏบนใบ trifoliate คู่แรกเท่านั้น พบเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้ออยู่ที่ 1-10.5 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสบนแตงกวาพันธุ์ต่างๆ ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อทางดิน

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสสาเหตุโรคในถั่วฝักยาวและแตงกวา ใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยาโดยวิธี ELISA พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirus ในแตงกวาทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบในตัวอย่างถั่วฝักยาว การตรวจสอบเชื้อ cucumber mosaic virus ในถั่วฝักยาวและแตงกวาที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลับ ที่ทำการเก็บตัวอย่างทุกฤดู ตลอดทั้งปี พบว่ามีเชื้อ cucumber mosaic virus ในทุกตัวอย่างของ ถั่วฝักยาวและแตงกวา ในขณะที่ผลการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคแบบ flexuous ขนาดประมาณ 600-650 นาโนเมตร และลักษณะอนุภาคแบบ isometric ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30.38 นาโนเมตร

การตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธีการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อ และการใช้วิธี RT - PCR และ realtime PCR พบว่าในเกือบทุกตัวอย่างที่ทำการสำรวจมีเชื้อ CMV เข้าทำลาย ทั้งตัวอย่าง ถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืช และพืชข้างเคียงยกเว้นผักแครด และพบไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup 3 ชนิด ในตัวอย่างถั่วฝักยาวโดย PCR product ที่ได้ band ที่ 1 มีขนาด 1182 bp band ที่ 2 มีขนาด 1219 bp band ที่ 3 มีขนาด 1259 bp และจากการเปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับ จำนวนและลำดับ nucleotide base ของสมาชิกในกลุ่ม potyvirusgroup และอาการบน *Chenopodium amaranticolor* ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วฝักยาวในแปลงปลูกเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเข้าทำลายร่วมของเชื้อ CMV และสมาชิกของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup ซึ่ง 2 ใน 3 ของเชื้อดังกล่าวคือเชื้อ bean yellow mosaic virus (BYMV) ซึ่งมีขนาด 1209 bp และ blackeye cowpea mosaic virus (BLCMV) ซึ่งมีขนาด 1242 bp ในขณะที่แตงกวาถูกเข้าทำลายโดยเชื้อ cucumber mosaic virus และ เชื้อในกลุ่ม gemenovirusgroup

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ CMV จัดเป็นเชื้อปัญหาหลักพบอยู่ในตัวอย่างใบพืชที่ตรวจสอบเกือบทุกชนิดและมีการติดมากับเมล็ดถั่วฝักยาวที่ใช้ทำพันธุ์ เชื้อนี้สามารถเข้าทำลายทั้งในลักษณะเชื้อเดี่ยวหรือเข้าทำลายร่วม ซึ่งในกรณีหลังทำให้อาการของโรครุนแรงขึ้นพบทั้งในแตงกวาที่เชื้อนี้เข้าทำลายร่วมกับเชื้อในกลุ่ม gemenovirusgroup และในถั่วฝักยาวในแปลงปลูกซึ่งเป็นการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ CMV และสมาชิกของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup คือเชื้อ BYMV และ BLCMV การสำรวจพบชนิดของเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด คือ *A. gossypii* และ *M. persicae* ซึ่งจัดเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อ CMV ในลักษณะ non - persistent และชนิดของวัชพืชและพืชข้างเคียง ซึ่งเป็นทั้งพืชอาหารของเพลี้ยอ่อนและพืชอาศัยของเชื้อ การแพร่ระบาดของเชื้อ CMV โดยตรงในกรณีของถั่วฝักยาวมาจากการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด ส่วนการเข้าทำลายของเชื้อในช่วงปลูกจะอาศัยเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะหลัก โดยดูดกินอาหารจากวัชพืช และพืชข้างเคียง ซึ่งเป็นแหล่งสะสมเชื้อข้ามฤดูปลูกทำให้เชื้อ CMV สามารถแพร่ระบาดอย่างต่อเนื่องและรุนแรง ในขณะที่เดียวกันเพลี้ยอ่อน 2 ชนิดนี้ยังเป็นแมลงพาหะของเชื้อ BYMV และ BLCMV และแมลงหิวข้าวพาหะของเชื้อไวรัสในกลุ่ม gemenovirusgroup ซึ่งเข้าทำลายได้ทั้งถั่วฝักยาวและแตงกวาในแปลงปลูกพืชสลับของอำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรีที่มีพืชเหล่านี้ปลูกเกือบตลอดเวลาตลอดปี

Thesis Title	RELATIONSHIP OF VIRUSES AND DISEASE EPIDEMIC IN ALTERNATE CUCUMBER WITH YARD LONG BEAN CROP AFTER RICE
Student	Mr. Komsorn Sangjinda
Student ID	44066307
Degree	Master of Science
Programme	Pest Management
Year	2006
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nualpan Ngamyeesoon

ABSTRACT

Relationship of viruses on disease epidemic in alternate cucumber and yard long bean crop after rice in Banlard district; Petchaburi province was demonstrated by survey of virus diseases and insects on yard long bean, cucumber, weeds and adjacent plants throughout the year; mode of disease transmission and diagnosis for efficient methods of disease control. Survey of virus diseases on yard long bean, cucumber, weeds and adjacent plants in field after rice growing season were conducted. Seven different virus symptoms were found as follow ;

- 1) dark green banding along the veins with slightly blisters on leaves and leaf malformation,
- 2) dark green blisters and yellow mosaic with severe leaf distortion,
- 3) dark green vein netting,
- 4) yellow leaves with green mosaic along the vein with stunting growth,
- 5) malformation of leaves with narrow leaf and shoes-string like,
- 6) vein banding with rolling of leaves,
- 7) witches broom symptom.

Whereas, on cucumber leaves three different symptoms revealed 1) yellow chlorosis with mosaic 2) slightly yellow leaves with green blisters and mosaic 3) yellow leaves with green blisters along the vein. Mechanical sap transmission of all diseased leaves to original plants was successful in yard long bean symptoms No.1- 6 of long yard bean, while in cucumber only mosaic symptom on leaves was tranferred. Moreover, transmission to *Chenopodium amaranticolor* was studied.

Virus-like symptoms found on weeds were vein netting on *Typhonium trilobatum*, yellow mosaic on *Amaranthus spinosus*, vein banding on *Euphorbia heterophylla*, yellow mosaic with leaf distortion on *Cleome gynandra*, mosaic on *Synedrella nodiiflora* and stunted leaves on *Abutilon indicum*. On adjacent plants showed yellow mosaic and leaf distortion on *Ocimum basillicum* and *Solanum torvum*, yellow chlorosis mottle on *O. sanctum*, green mosaic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

with crinkling of leaf on *Lycopersicon esculentum* and light green mosaic with leaf malformation on *Capsicum frutescens*. Moreover, the insects found throughout the year were white fly (*Bemisia tabaci*), aphids (*Aphis gossypii* and *Myzus persicae*), (*Nephotettix virescens*, *Nilaparvata lugens*, *Cyrtacanthacris tatarica* and *Micraspis sp.*

Study of virus transmission through seeds were demonstrated on 5 varieties of both yard long bean seeds and cucumber seeds named Kunsuk No. 7, Somboon Chok No.99, Phai Kwang 005, Lum Num Chee and Big 1 for yard long bean seeds and Mechai, Amazon, Atom, Amata 765 and Tammy for cucumber seeds. At 4 week age, there were 4 different virus symptoms detected on yard long bean seedlings. On primary leaves, light green patches with yellow leaves and leaf falling, vein netting and light green mottle were found, while on the first trifoliate leaves, yellow chlorosis with vein shrinking and leaf distortion was detected. Seed transmission percentage on yard long bean seeds was at 1-10.5%. On the contrary, no seed transmission was found on cucumber seeds.

Serological tests of virus infected cucumber and yard long bean leaves using ELISA technique with antiserum against geminivirus group and cucumber mosaic virus (CMV) were studied. The result showed that virus member belongs to geminivirus group infected all cucumber leaves, but not yard long bean leaves. While, CMV was found in all leaf samples tested. Electron microscopy study using leaf dip technique on infected yard long bean leaves got 2 types of virus particles. One was flexuous rods with 600-650 nm. in length and another was isometric with 30.38 nm. in diameter.

Molecular study and nucleic acid analysis using dsRNA detection and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with CMV primers, degenerate potyvirus group primers and cowpea aphid-borne mosaic virus primers were conducted. Detection of virus on all diseased plants included cucumbers, yard long beans, weeds, adjacent plants and virus transmission through seeds was performed by extraction and analysis of viral dsRNA. Confirmation of CMV was done by RT-PCR. The results showed that all diseased plants were infected by CMV except *Synedrella nodiflora*. Moreover realtime PCR study of infected long yard bean leaves with degenerate poty-group primers, revealed 3 specific bands amplified the variable 5'-terminal region of coat protein cistron together with the 3'-terminal region of the nuclear inclusion b protein cistron of potyviruses, suggesting the presence of 3 member of potyvirus. The RT-PCR product of these 3 bands were 1182 bp, 1219 bp and 1259 bp respectively, which closely corresponded to

bean yellow mosaic virus (BYMV) at 1209 bp. (band 2) and blackeye cowpea mosaic virus at 1242 bp. (BLCMV) (band 3).

The results, together with symptom on *Chenopodium amranticolor*, lead to conclude that yard long bean leaves were mix - infected with CMV and 3 virus members of potyvirus group, that 2 in 3 of these were BYMV and BLCMV. Whereas, cucumber leaves were dual-infected by CMV and virus member of geminivirus group.

The study pointed out that CMV was the major virus infected yard long beans, cucumber, weeds, adjacent plants and transmitted through seed. The virus could infect solely or mix infect with others, which cause more severe symptom. CMV was detected in both yard long beans with BYMV or/and BLCMV and cucumbers with geminivirusgroup. *Aphis gossypii* and *Myzus persicae* were CMV vector in non-persistent manner, while infected weeds and adjacent plants were their host. The virus spreaded directly through yard long beans by infected seeds, whereas field infection was responsible by aphids, fed by weeds and adjacent plants which also were disease reservoir. That caused CMV spreading continuously and severely. Moreover, these 2 aphids also transmit BYMV and BLCMV, on the other hands white fly (*Bemisia tabaci*) transmit geminivirusgroup to both yard long beans and cucumbers. This is prolonged problem in Banlard district; Petchaburi province as long as farmers carry on growing yard long beans, cucumber and rice as alternate crops overlapping all year round.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ศศ.ดร. นवलพรรณ งามยี่สุน อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. รัตนา ปรมาศ และ ศศ.ดร. พรหมมาศ อุทากาญจน์ ที่ได้ให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บิศา มารดา และญาติๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำงานครั้งนี้ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี

สุดท้าย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คมศร แสงจินดา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	IV
กิตติกรรมประกาศ.....	VII
สารบัญ.....	VIII
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XI
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.2.1 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	20
3.1 วิธีการทดลอง.....	20
3.2 สถานที่ทำการทดลอง.....	34
3.3 ระยะเวลาในการทดลอง.....	34
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	35
4.1 สํารวจโรคไวรัสในแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกสลับในพื้นที่เดียวกัน.....	35
4.2 การสำรวจแมงพาหะวัชพืชใกล้เคียงที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส.....	40
4.3 การตรวจสอบด้วยวิธีการทางเซรุ่มวิทยา.....	43
4.4 การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด(seed transmission).....	43
4.5 การศึกษาการถ่ายทอดทางดิน (soil transmission).....	46
4.6 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope).....	46
4.7 การตรวจสอบกรดนิวคลีอิกสายคู่เชื้อไวรัส (dsRNA detection).....	48
4.8 การตรวจสอบด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	51
4.9 การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเครื่อง real time PCR.....	52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
4.10 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ในการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในแปลงปลูก แตงกวาและถั่วฝักยาว.....	69
บทที่ 5 วิจัยและสรุปผลการทดลอง.....	73
บรรณานุกรม.....	80
ประวัติผู้เขียน.....	88



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 แสดงรายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลแตง โดยพาหะต่างๆ และลักษณะในการถ่ายทอด.....	6
2.2 แสดงรายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลถั่ว โดยพาหะต่างๆ และลักษณะของการถ่ายทอด.....	12
2.3 พืชอาศัยของไวรัสแตงกวาและถั่วฝักยาว.....	13
3.1 แสดงแผนผัง การตรวจ ELISA จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวและใบแตงกวาที่ แสดงอาการ โรคไวรัสที่เก็บมาจากแปลงปลูกเพื่อตรวจสอบหาเชื้อ ไวรัสกลุ่ม Geminivirus ชื่อ TYLCV และ CMV.....	25
4.1 เปรียบเทียบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดของถั่วฝักยาวและแตงกวา ทั้ง 5 พันธุ์.....	44
4.2 ผลการตรวจเชื้อ cucumber mosaic virus โดยวิธีการ PCR.....	55
4.3 ผลการตรวจสอบขนาด PCR product จากการตรวจสอบเชื้อใน potyvirus group.....	66
4.4 การสำรวจแตงกวาและถั่วฝักยาวในแปลงปลูกและการตรวจสอบวินิจฉัยเชื้อ ไวรัส.....	69
4.5 การสำรวจ และวินิจฉัยเชื้อ CMV ในวัชพืชและพืชข้างเคียงที่แสดงอาการของ โรคไวรัส และไม่แสดงอาการของโรคไวรัส.....	70
4.6 ชนิดของแมลงที่พบในแปลงและคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส.....	71

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 แสดงอุปกรณ์ชุดสกัด UltraClean™ Plant RNA Isolation Kit.....	28
3.2 อุปกรณ์ในชุด Plant concert solution.....	30
3.3 แผนที่พันธุกรรมของ potyvirus genome.....	32
4.1 อาการโรคไวรัสบนใบถั่วฝักยาวจากการสำรวจ.....	37
4.2 อาการโรคไวรัสบนใบแดงกวาจากการสำรวจและการถ่ายทอดเชื้อจากน้ำคั้น.....	38
4.3 ผลการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวเป็นโรคสู่ต้น <i>Chenopodium amaranticolor</i>	39
4.4 อาการของโรคไวรัสบนวัชพืชและพืชข้างเคียง.....	41
4.5 ชนิดของแมลงที่สำรวจพบในแปลงปลูก.....	42
4.6 อาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดถั่วฝักยาว.....	45
4.7 ลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน.....	47
4.8 patterns ของ dsRNA จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บรวบรวมจากแปลงปลูก.....	49
4.9 patterns ของ dsRNA จากตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการของโรคไวรัส.....	50
4.10 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของ Primer CMV1 และ CMV2.....	54
4.11 Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR) ของ CMV จากใบตัวอย่างถั่วฝักยาว และตัวอย่างแดงกวาที่เก็บรวบรวมจากแปลงปลูก.....	56
4.12 ความแตกต่างของขนาด PCR product จากการตรวจสอบเชื้อ CMV ตัวอย่าง ถั่วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูกและเมล็ดพันธุ์.....	57
4.13 กราฟแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างถั่วฝักยาวจากแปลงปลูก และเมล็ดพันธุ์.....	58
4.14 ผลภายหลังการย่อย PCR product ของเชื้อ CMV ด้วย enzyme EcoR1.....	59
4.15 ผลภายหลังการย่อย PCR product ของเชื้อ CMV ด้วย enzyme MSp1.....	60
4.16 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 45 – 65 องศาเซลเซียสสำหรับ degenerate primer pot 1 และ pot2.....	61
4.17 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 38 – 50 องศาเซลเซียสสำหรับ degenerate primer pot 1 และ pot 2 ในเครื่อง real time PCR.....	62
4.18 ผลการตรวจสอบเชื้อในกลุ่ม potyvirusgroup ด้วย real time PCR.....	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.19 ความแตกต่างของขนาด PCR product จากการตรวจสอบเชื้อใน potyvirusgroup.....	64
4.20 กราฟแสดงค่าน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างถั่วฝักยาวจากแปลงปลูกที่พบ band ต่างกัน 3 band.....	65
4.21 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ bean yellow mosaic virus 1209 bp.....	67
4.22 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ blackeye cowpea mosaic virus 12426 bp.....	68



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

พืชผักเศรษฐกิจในประเทศไทยมีหลายชนิด รวมทั้งแตงกวา และถั่วฝักยาวซึ่งเป็นพืชผักที่มีคุณค่าทางอาหารสูง นิยมรับประทานทั้งที่เป็นผักสด และสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิดนอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารในรูปบรรจุกระป๋องและแช่แข็ง ปัจจุบันนี้ นอกจากการปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้วยังจัดเป็นพืชส่งออกที่ทำรายได้แก่ประเทศอีกด้วย ทำให้ ความต้องการในการบริโภคและการแปรรูปเพิ่มมากขึ้นในแต่ละเดือน รายงานความต้องการแตงกวาเข้าสู่โรงงานในปี 2540 เป็นจำนวนถึง 960 คันต่อเดือน (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2540) แหล่งปลูกแตงกวาที่สำคัญได้แก่ จังหวัด ลำปาง พิจิตร นครสวรรค์ นครราชสีมา บุรีรัมย์ ขอนแก่น ระยอง ปราจีนบุรีและชลบุรี ส่วนแหล่งปลูกถั่วฝักยาวได้แก่ จังหวัด ปทุมธานี นครปฐม ราชบุรี อ่างทอง สระบุรี นครนายก นครราชสีมา หนองคาย อุตรธานี บุรีรัมย์ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด นครสวรรค์ เชียงใหม่ ลำปาง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราชและตรัง

การปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวในประเทศไทยมักประสบปัญหา โรคและแมลงเสมอทำให้ ผลผลิตและคุณภาพของผลและฝักลดลง สาเหตุ โรคที่สำคัญได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรียและโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้พืชเกิดความเสียหายทั้งทางราก ลำต้น ใบ ดอกและผล ส่งผลให้ ผลผลิตที่ได้ลดลง คุณภาพต่ำกว่าปกติ จึงไม่เป็นที่ต้องการของตลาด โดยเฉพาะ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งทำการป้องกันกำจัด ได้ยากเพราะมีพาหะในการนำโรคหลายชนิด ต้นที่เป็นโรคแล้วรักษาไม่หายต้องกำจัด โดยการถอนทิ้งและนำไปเผาเมื่อตรวจพบเท่านั้น การควบคุม โรคอย่างมีประสิทธิภาพจึงต้องกำจัดพาหะของเชื้อ เช่น แมลง วัชพืชและพืชอื่นๆ ที่ปลูกในบริเวณนั้นด้วย

แตงกวาและถั่วฝักยาวเป็นพืชล้มลุกที่สามารถปลูกได้ตลอดปี ปัจจุบัน ในพื้นที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี นิยมปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวเป็นพืชสลับหลังจากการทำนา โดยการปลูกหมุนเวียนกันระหว่างแตงกวากับถั่วฝักยาว การปลูกสลับเพื่อเป็นการเสริมรายได้เพราะรัฐบาลสนับสนุนการทำนาได้ปีละ 1 ครั้งเนื่องจากปัญหาการเกิดดินเปรี้ยว ดินเค็ม ความแห้งแล้งและน้ำท่วมฉับพลัน แตงกวาและถั่วฝักยาวเป็นพืชที่มีอายุสั้น มีอายุการเก็บเกี่ยว 2-3 เดือน มีความต้องการสภาพแวดล้อมในการเพาะปลูกที่ใกล้เคียงกันสามารถปลูกได้ในพื้นที่เดียวกันจึงนิยมปลูกสลับกันต่อเนื่องในพื้นที่นาหลังการปลูกข้าว เพื่อเป็นการเพิ่มธาตุอาหารในดินด้วย เนื่องจากถั่วฝักยาวเป็นพืชตระกูลถั่วซึ่งมีระบบรากแข็งแรง บริเวณปมของรากมีแบคทีเรียที่ตรึงไนโตรเจนจากอากาศมาเก็บสะสมไว้ในดินจึงเป็นการเพิ่มธาตุอาหารให้แก่พืช และเป็นการปรับปรุงดินสามารถลดการใช้ปุ๋ยนอกจากนี้ยังลดค่าใช้จ่ายในด้านอุปกรณ์การเพาะปลูกบางชนิดเพราะการปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวาสามารถใช้อุปกรณ์ร่วมกันได้ แต่ในการปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวสลับในพื้นที่เดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแตงกวาและถั่วฝักยาว

แตงกวาเป็นพืชที่มีชื่อสามัญว่า cucumber มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cucumis sativus* L. อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae แตงกวาเป็นพืชที่มีลำต้นเป็นเถาเลื้อยมีมือเกาะช่วยพยุงลำต้น ระบบรากเป็นรากแก้ว ใบเป็นใบเดี่ยวมี 3-5 แฉก ดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่แยกกันแต่อยู่ในต้นเดียวกัน ดอกตัวผู้จะอยู่เป็นกลุ่ม กลุ่มละ 3-5 ดอก ดอกตัวเมียเกิดเดี่ยวๆ มีสีเหลือง มีการผสมข้ามตามธรรมชาติ โดยอาศัยลมและแมลง (จานุลักษณะ ขนบศ. 2535) เป็นพืชที่ปลูกง่าย ปลูกได้ตลอดปีในดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วนปนทราย pH ที่เหมาะสมคือ 5.5 - 6.8 ความชื้นพอเหมาะ ไม่ชอบน้ำขังและอากาศค่อนข้างแห้ง แสงแดดเต็มที่ อุณหภูมิช่วงที่เหมาะสม 18.3 - 24 องศาเซลเซียส ชื่ออื่นๆ ที่ใช้เรียกกัน ในภาคเหนือ ได้แก่ แตงขี้ไก่ แตงขี้ควาย แตงข้าง แตงร้าน แตงปี แตงยาง แตงเหิน และแตงอ้ม (เมืองทอง ทวนทวี. 2532)

ถั่วฝักยาวเป็นพืชที่มีชื่อสามัญว่า yard long bean มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna sesquipedalis* Wight. จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae ถั่วฝักยาวมีลำต้นเลื้อย การเลื้อยของเถามีทิศทางการพันทวนเข็มนาฬิกา ลักษณะดอกแบบ raceme เกิดตามมุมใบหรือซอกใบ แต่ละซอมี 1-6 ดอกย่อย เป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอกมี 5 กลีบ มีการผสมตัวเองสูง เมล็ดพันธุ์มีขนาดใหญ่ ปลูกค่อนข้างง่าย โตเร็ว ปลูกได้ทุกฤดูกาล แต่ชอบอากาศค่อนข้างร้อน ฝนไม่ชุก ขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วนปนทราย pH ที่เหมาะสม 5.6 - 6 ความชื้นพอเหมาะ แสงแดดเต็มที่ อุณหภูมิช่วงที่เหมาะสม 16 - 24 องศาเซลเซียส แต่ช่วงที่เจริญได้ดี 15 - 35 องศาเซลเซียส เจริญเติบโตช้าในสภาพอุณหภูมิต่ำ ชื่ออื่นๆ ที่ใช้เรียกกัน ในภาคเหนือ คือ ถั่วคอก ถั่วปี ถั่วสายเสื่อ ถั่วใส่หมู ถั่วหมาเน่า ถั่วหลา และถั่วพุงหมู ในปราจีนบุรี

2.2 โรคไวรัสที่เข้าทำลายและทำความเสียหายกับแตงกวาและถั่วฝักยาว

2.2.1 โรคไวรัสที่เข้าทำลายและทำความเสียหายกับแตงกวา

เนื่องจากแตงกวาและถั่วฝักยาวจัดเป็นพืชผักที่มีรายงานการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสหลายชนิดเพราะพืชทั้ง 2 จัดเป็นพืชอาศัยที่ค้ำของเชื้อและเชื้อไวรัสสาเหตุส่วนใหญ่สามารถถ่ายทอดได้ด้วยวิธีการสัมผัส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเป็นพาหะ เช่น แมลง ไล่เดือนฝอย วัชพืช พืชที่ปลูกข้างเคียง เชื้อไวรัสที่พบบ่อย และก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชตระกูลแตงรวมถึงแตงกวาในทุกแหล่งปลูก คือเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ทำให้แตงกวาแสดงอาการลำต้นแคระแกร็น

อย่างรุนแรง ใบมีอาการค้างเหลืองอย่างชัดเจน ตามด้วยลักษณะใบที่ผิดปกติรูปร่าง ขนาดใบลดลง (Francki. et al. 1979) ปัญหาการเกิดโรคไวรัส ในแตงกวาในประเทศไทย มีการศึกษาอาการและเชื้อสาเหตุ โดยการสำรวจโรคไวรัสในแตงและพบว่าแตงทุกชนิดแสดงอาการใบค้างเนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย (ธีระ สุตบุตร. 2535 ; เครือพันธุ์ กิตติปกรณ. 2537) ในกรณีของเชื้อ watermelon mosaic virus (WMV) อาการที่พบบนแตงคือใบค้างสีเหลือง หรือเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม ใบขรุขระเป็นคลื่น ใบมีขนาดลดลงและเสีयरูปร่าง ในปี 2537 (ศักดิ์ สุนทรสิงห์) รายงานโรคยอดหงิกของแตงร้านและแตงกวาเกิดจากเชื้อ leaf curl virus (LCV) ทำให้ต้นแคระแกร็นใบมีขนาดเล็กลง เส้นใบนูนหนาเด่นชัดขึ้น ใบหดสั้น มีสีเขียวเข้มกว่าปกติ ต้นหยุดการเจริญ ไม่ติดดอกออกผล เชื้อไวรัสมีเปลือกไฟเป็นแมลงพาหะ การรายงานการแพร่ระบาด และการถ่ายทอดเชื้อ โดย ศักดิ์ สุนทรสิงห์ (2537) รายงานว่าโรคใบค้างลาย cucumber mosaic virus (CMV) สามารถระบาดโดยทางน้ำคั้น โดยมีแมลงต่างๆหลายชนิดเป็นพาหะ แต่ที่สำคัญที่สุด คือ เพลี้ยอ่อน ชนิดต่างๆ ได้แก่ *Aphis gossypii*, *Aulacorthum circumflexum*, *A. solani*, *Myzus persicae*, *Mueosplum euphorbiae*, *Phorodon humuli* และ *P. canabis* การถ่ายทอดโรคมักด้วยกันหลายทางคือ ทางเมล็ดพันธุ์ที่วางขายทั่วไปตามท้องตลาด เชื้อจะติดไปกับเมล็ด ถ่ายทอดโดยวิธีการสัมผัสจากมนุษย์และเครื่องมือทางการเกษตร ทางวัชพืชและพืชปลูกที่อยู่บริเวณใกล้เคียงโดยผ่านทางเต่าทอง ตั๊กแตนและเพลี้ยอ่อนหลายชนิด เช่น *M. persicae*, *A. fabae*, *A. medicagenis*, *A. gossypii* และ *Macrosiphum euphorbiae* (พิบูลย์ มงคลสุข. 2530) อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2542) ศึกษาอาการของแตงที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายพบว่า โรคใบค้าง อาการสีเขียวสลับเหลือง เนื้อใบนูนพองบริเวณที่มีสีเขียว เนื้อใบขรุขระ หงิกไม่สม่ำเสมอ ขอบใบม้วนงอ ต้นแคระแกร็นเป็นพุ่ม ใบที่ยอดมีสีเหลืองผิวเป็นคลื่นเล็กน้อยการเจริญของยอดอ่อนหยุดชะงัก

นอกจากนี้ในต่างประเทศพบรายงานการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในพืชตระกูลแตง โดย Green (1991) รายงานว่าเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) สามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 770 ชนิด ทำให้เกิดอาการ ใบค้างมีสีเหลืองซีด ใบบิดเบี้ยวผิดปกติ ใบเล็กเรียวยาวเป็นแผลแห้งตาย และ Atiri et al. (1992) รายงานว่าเชื้อ CMV จำนวน 5 isolate ที่รวบรวมในสวนผักผลไม้ที่ Agricultural college ในประเทศอินเดียสามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ใน *Chenopodium amaranticolor*, *Cucumis sativus*, *Gomphrena globosa*, *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum*, *Physalis floridana*, *Vigna unguiculata* และ *Zinnia degans* และวัชพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Amaranthus viridis*, *Digera arvensis*, และ *Physalis minima* นอกจากนี้ยังเข้าทำลายวัชพืช chickweed (*Stellaria media*) (Friess and Maillet. 1997) ในขณะที่ Gusmini et al. (2000) รายงานการแพร่ระบาดของเชื้อ CMV โดยพืชพันธุ์ป่าและวัชพืช 9 ชนิด ซึ่งเป็นปัญหาในการเป็นแหล่งสะสมของเชื้อ Blancard et al. (1994) รายงานว่า squash mosaic virus (SqMV) ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับแตงในหลายประเทศ เช่นประเทศ ออสเตรเลีย ได้หวันและประเทศทาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอนได้ของแถบเมดิเตอร์เรเนียน อาการที่พบเส้นใบค่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนเริ่มปรากฏที่ ใบแท้ใบแรก ขอบใบข่น โค้งงอ Thomas *et al.* (1996) พบว่าแดงส่วนใหญ่อ่อนแอต่อการเข้า ทำลายของเชื้อ papaya ring spot -W (PRSV -W) โดยใบจะแสดงอาการเด่นชัด มีอาการ แคระแกร็นรุนแรง ใบค่างเขียว บิดเบี้ยวผิดปกติรูปร่าง ใบเล็กแหลมเรียวยาว นอกจากนี้ Zitikait (2002) รายงานลักษณะอาการโรคไวรัสของแดงกว่ามีอาการเส้นใบค่างและโปร่งแสง (vein clearing mosaic and mottling) ใบผิดปกติ และการเจริญเติบโตช้า และ Sevik and Sokmer (2003) ทำการสำรวจโรคไวรัส ในพื้นที่ปลูกแดง 45 แปลงในประเทศ ตุรกี ระหว่างเดือน มิถุนายนถึง ตุลาคม ในปี 1999 -2000 และตรวจสอบเชื้อด้วยวิธีการ enzyme - linked immunosorbent assay พบการเข้าทำลายของเชื้อ watermelon mosaic virus (WMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) และ cucumber mosaic virus (CMV) คิดเป็น 53.9 38.38 และ 20.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลแดงมีสิ่งมีชีวิตเป็นพาหะหลาย ชนิด (ตารางที่ 2.1)

2.2.1 โรคไวรัสที่เข้าทำลายและทำความเสียหายกับถั่วฝักยาว

ปัญหาโรคไวรัสที่เกิดกับถั่วฝักยาวมีรายงานในประเทศไทยโดย ชีระ สูตะบุตร (2535) รายงาน โรคไวรัสใบค่างเหลืองถั่วฝักยาวซึ่งเกิดจาก cowpea aphid - borne mosaic virus (CAMV) ทำความเสียหายแพร่ระบาดกว้างขวางในเขตที่มีการปลูกถั่วฝักยาว ทำให้เกิดอาการ ใบค่างสีเหลือง อาการชัดเจนในใบแก่ บนใบอ่อนที่มีอาการรุนแรงใบจะมีสีเหลือง ใบม้วนงอและผลผลิตลดลง กว่าปกติโดยเชื้อสาเหตุสามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ด เมื่อนำไปปลูกอาการจะปรากฏที่ใบเลี้ยงหรือใบจริงคู่แรก โดยใบมีอาการค่างสีเหลืองสลับเขียวอ่อนหรือขาวซีด ต้นกล้าแคระแกร็นใบม้วนงอ เชื้อนี้ยังสามารถถ่ายทอดด้วยเพลี้ยอ่อน จมูกพล สารระคาย และอรพรรณ วิเศษสังข์ (2537) รายงาน ว่าโรคใบค่างของถั่วฝักยาวเกิดจากเชื้อไวรัสโดย มีแมลงปากดูดเป็นพาหะ อาการคือใบค่าง สีเหลืองสลับเขียวอ่อนและขาวซีด เชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดได้ โดยพบว่า เชื้อ cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) ทำให้เกิดอาการใบค่างซึ่งเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางน้ำคั้น โดยมี แมลง bean leaf beetle (*Cerotoma trifurcate*) และ spotted cucumber beetle (*Diabrotica undecimpunctata* howard) เป็นพาหะที่สำคัญ (Walters and Dodd, 1969) อนงค์ จันทร์ศรีกุล(2542) ทำการสำรวจอาการของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายพบว่าใบถั่วฝักยาวแสดงอาการ ต่างกันดังนี้ ใบค่าง อาการใบเป็นลายสีเหลืองอ่อนและเขียว สีของใบไม่สม่ำเสมอและใบม้วนงอ โรคใบหยกเป็นคลื่น อาการ ใบอ่อน โค้งงอเนื้อใบเป็นคลื่น ยอดหงิกชะงักการเจริญ ยอดแห้งและ ดอกร่วง โรคใบค่างลายวงกลมสีเหลือง ใบสีเหลืองซ้อนกันหลายชั้น ใบเหลืองและร่วงก่อนกำหนด นอกจากนี้ Thomas *et al.* (1996) รายงานรายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลแดง โดยพาหะต่างๆและลักษณะในการถ่ายทอด ดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 รายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลแตงโดยพาหะต่างๆและ
ลักษณะในการถ่ายทอด ที่มา : (Thomas *et al.* 1996)

Vector	Virus or Viroid	Taxonomic Group ^b	Other Modes of Transmission ^a	
Aphids	Bryonia mottle	Potyvirus	M	
	Clover yellow vein	Potyvirus	M	
	Cucumber mosaic	Cucumovirus	M,S	
	Cucurbit aphid- borne yellows	Luteovirus	...	
	Melon veinbanding mosaic	Potyvirus	M	
	Muskmelon vein necrosis	Carlavirus	M	
	Papaya ringspot type W	Potyvirus	M	
	Telfairia mosaic	Potyvirus	M,S	
	Watermelon mosaic	Potyvirus	M	
	Watermelon mosaic Morocco	Potyvirus	M	
	Zucchini yellow fleck	Potyvirus	M	
	Zucchini yellow mosaic	Potyvirus	M,S	
	Beetles	Melon rugose mosaic	Tymovirus	M
		Squash mosaci	Comovirus	M,S
Wild cucumber mosaic		Tymovirus	M,S	
Fungi	Cucumber necrosis	Tombusvirus	M	
	Melon necrotic spot	Camovirus	M,S	
Leafhoppers	Beet curly top	Geminivirus	...	
Nematodes	Tobacco ringspot	Nepovirus	M,S	
	Tomato ringspot	Nepovirus	M	
Thrips	Tomato spotted wite	Tospovirus	M	
	Watermelon silver mottle	Tospovirus	M	
Whiteflies	Beet pseudo – yellows	Closterovirus	...	
	Cucumber vein – yellow ing	...	M	
	Cucurbit yellow stunting disorder	Closterovirus	...	
	Lettuce infectious yellows	Closterovirus	...	
	Squash leaf curl	Geminivirus	M	
	Watermelon chlorotic stunt	Geminivirus	...	

^aM = mechanical transmission , S = seed transmission

^bThe taxonomy of this virus is uncertain

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานที่พบในต่างประเทศ Mali *et al.* (1989) รายงานว่าปัญหาการเกิดโรคไวรัสในแปลงปลูกถั่วในประเทศอินเดียที่เกิดจากการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ เกิดจากเชื้อ blackeye cowpea mosaic virus. ถึง 7.8 – 41.6 เปอร์เซ็นต์ เกิดจากเชื้อ cowpea aphid – borne mosaic virus. คิดเป็น 3.1 – 20 เปอร์เซ็นต์ และเกิดจากเชื้อ cucumber mosaic virus. เป็นจำนวน 1.3 – 25.8 เปอร์เซ็นต์

Yilmaz and Ozaslan (1989) รายงานการตรวจพบเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus ในตัวอย่างน้ำคั้นจากเมล็ดถั่วฝักยาวครั้งแรกในประเทศตุรกีโดยวิธี ELISA Gumedzoe *et al.* (1990) ศึกษาโรคไวรัสของถั่วในประเทศโทโก (Togo) และทำการวินิจฉัยเชื้อด้วยวิธีทางเซรุ่มวิทยาและอาการของพืชอาศัย พบการเข้าทำลายของเชื้อ cowpea yellow mosaic (cowpea mosaic cumovirus) ถึง 65 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ cowpea mottle 35 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อทั้งสองนี้รวมถึงเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus (blackeye cowpea mosaic potyvirus) เชื้อ cowpea mild mottle virus และเชื้อ southern bean mosaic sobemovirus Karki *et al.* (1990) ทำการสำรวจโรคไวรัสของถั่ว ในตำบล Chitwan และ Nawalparasi ประเทศเนปาลพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยถึง 84.5 เปอร์เซ็นต์ ถั่วแสดงอาการใบเหลืองอย่างรุนแรงโดยเฉพาะใบอ่อนในขณะที่ฝักมีลักษณะบิดเบี้ยวขนาดลดลง โดยคาดว่าเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายคือเชื้อ cowpea golden mosaic virus ในปี 1990 – 1991 จากรายงานใน Proceeding of International Workshop TARI พบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชตระกูลถั่วรวมถึงถั่วฝักยาวในประเทศไต้หวัน ได้แก่เชื้อ bean common mosaic virus (BCMV), black eye cowpea mosaic virus (BICMV), cowpea mosaic virus (CMV), cowpea aphid – borne mosaic virus (CAMV), cucumber mosaic virus (CMV), peanut mottle virus (PMV) และ peanut stripe virus (PSV) Jeyanandarajah (1992) จากการสำรวจโรคไวรัสที่คิดมากับเมล็ดถั่วต่างๆที่ใช้ในการบริโภคในประเทศศรีลังกา พบเชื้อ blackeye cowpea mosaic (BLCMV), bean common mosaic (BCMV) และเชื้อ cucumber mosaic virus ในถั่วฝักยาวและถั่วเขียว Patil and Gupta (1992 a) วินิจฉัยเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเมล็ดค่างบนถั่วฝักยาว ในประเทศอินเดียโดยการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดเชื้อ อาการบนพืชอาศัย คุณสมบัติทางชีววิทยาและฟิสิกส์ของน้ำคั้นพืชเป็นโรค สันฐานวิทยาของเชื้อ รวมทั้งคุณสมบัติทางเซรุ่มวิทยา พบว่าเชื้อสาเหตุคือ bean common mosaic virus สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ 1-2 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้ออยู่ที่ส่วน testa ของเมล็ด Gumedzoe (1993) ศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในถั่วฝักยาวในพื้นที่ปลูกต่างๆของประเทศโทโก (Togo) โดยการใช้ antiserum ของเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus (blackeye cowpea mosaic potyvirus ; BCMV), เชื้อ cowpea mottle virus (CPMoV), เชื้อ cowpea mosaic comovirus (CPMV), เชื้อ southern bean mosaic sobemovirus (SBMV), เชื้อ cowpea mild mottle carlavirus (CMMV) และเชื้อ cowpea strain of tobacco mosaic tobamovirus (TMV-CS) พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเข้าทำลายของเชื้อ CPMV มากที่สุดและยังพบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสเหล่านี้มากกว่า 1 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อดังกล่าวก่อให้เกิดโรคในพืชป่าต่างๆเช่นพบเชื้อ SBMV ใน *Cassia hirsuta*, เชื้อ CMMV ใน *Centrosema pubescens*, เชื้อ CMMV และ BCMV ใน *Nauclea latifolia* และเชื้อ TMV-CS ใน *Mucuna sp.*

Bashir and Hampton (1993) ทำการสำรวจโรคไวรัสในถั่วฝักยาว ในเขตเมือง Punjab และ เมือง North-West Frontier ในประเทศปากีสถาน ในช่วงฤดูร้อนระหว่างปี 1990-1991 โดยวิธี direct antigen coating หรือ DAS-ELISA พบชนิดของเชื้อต่างๆและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค ดังนี้ cowpea aphid-borne mosaic potyvirus (CABMV), southern bean mosaic sobemovirus (SBMV), cowpea severe mosaic comovirus (CSMV), blackeye cowpea mosaic potyvirus (BICMV) และ cowpea mottle virus (CPMoV) อยู่ที่ 29 21 17 8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Ndiaye *et al.* (1993) ศึกษาโรคไวรัสในถั่วฝักยาวในประเทศ Senegal ทวีปแอฟริกาใต้ ช่วงฤดูฝนของปี 1990 -1991 โดยการเก็บตัวอย่างใบที่แสดงอาการของโรคไวรัสมาตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบการเข้าทำลายของเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic (blackeye cowpea mosaic potyvirus ; BCMV), cowpea mottle virus (CPMoV), cowpea severe mosaic comovirus (CSMV) และ southern bean mosaic sobemovirus (SBMV) โดยเชื้อเหล่านี้สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ Nain *et al.* (1994 b) ศึกษาชนิดของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการต่างที่แตกต่างกันบนถั่วฝักยาวที่พบในเขตตอนเหนือของประเทศอินเดียโดยการตรวจสอบทางเซรัมวิทยา ลักษณะการถ่ายทอด และอาการบนพืชอาศัย พบเชื้อไวรัส 8 ชนิดได้แก่เชื้อ alfalfa mosaic alfamovirus (AMV), cowpea aphid-borne mosaic potyvirus (blackeye cowpea mosaic potyvirus; BLCMV), southern bean mosaic sobemovirus cowpea strain (ABMV-CS), blackeye cowpea mosaic potyvirus (BLCMV), cowpea mosaic comovirus (CPMV), cowpea mild mottle carlavirus (CPMMV), cowpea chlorotic mottle bromovirus (CCMV) และเชื้อ cowpea yellow mosaic geminivirus (cowpea mosaic comovirus ; CPMV) นอกจากนี้พบว่าเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ในระดับที่ต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อและพันธุ์ของถั่วฝักยาวโดยเชื้อ BLCMV, CPMV และเชื้อ CPMMV สามารถได้ 7.04 - 32.05, 1.14 - 4.70 และ 1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ Gubb (1994) พบว่าในประเทศซิมบับเว (Zimbabwe) มีการนำ monoclonal antibodies มาใช้ในการตรวจสอบเชื้อ blackeye cowpea mosaic virus (BLCMV) และเชื้อ cowpea aphid - borne mosaic virus (CAMV) จากตัวอย่างใบถั่วที่แสดงอาการของโรคไวรัสจำนวน 109 ตัวอย่างด้วยวิธี agar gel diffusion และ ELISA พบการเข้าทำลายของเชื้อ CAMV ใน 75 ตัวอย่าง Hadiastono (1996) รายงานการเข้าทำลายของเชื้อ blackeye cowpea mosaic potyvirus ในถั่วฝักยาวในเขตพื้นที่ตะวันออกเฉียงเหนือของเกาะชวา ประเทศอินโดนีเซีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kline and Anderson (1997) พบว่าเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) เป็น 1 ในเชื้อไวรัสที่มีรายงานการเข้าทำลายถั่ว (cowpea) ทั้งในทวีปแอฟริกา เอเชีย และทวีปยุโรป แต่พบรายงานของเชื้อนี้เข้าทำลายงา (sesame ; *Sesamum indicum* L.) ในแปลงปลูกใกล้เคียงกับแปลงที่นำถั่วเข้ามาปลูกเป็นครั้งแรก ในรัฐจอร์เจีย (Georgia) เมื่อปี 1997 และตรวจพบเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดของเชื้อนี้ถึง 28 เปอร์เซ็นต์ จากการนำเมล็ดถั่วพันธุ์ Chinese Red ที่เก็บเกี่ยวจากแหล่งปลูกทางใต้ของรัฐเท็กซัส (Texas) มาปลูกโดยต้นถั่วที่เป็นโรค แสดงอาการค้างอย่างชัดเจนบนใบ primary และ trifoliolate Ngo-Bich-Hao *et al.* (2003) รายงานการตรวจพบ blackeye cowpea mosaic strain ของเชื้อ bean common mosaic virus (BCMV-BICM) serotype B ในถั่วฝักยาวในประเทศเวียดนาม โดยเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดได้ 0.8-12.4 เปอร์เซ็นต์ Puttaraju *et al.* (2003) ตรวจพบการเข้าทำลายของเชื้อ blackeye cowpea mosaic (BLCMV) ในใบและเมล็ดของถั่วด้วยการศึกษาอาการบนพืชอาศัยและวิธี ELISA ในประเทศอินเดียพบว่า ใบถั่วจำนวน 148 ตัวอย่าง พบเชื้อนี้ 128 ตัวอย่าง และในเมล็ด 17 ตัวอย่างจากทั้งหมด 65 ตัวอย่าง โดยเชื้อถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ 7 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่าความเข้มข้นของเชื้ออยู่ในปริมาณสูงในถั่วที่แสดงอาการใบบิดเบี้ยวอย่างรุนแรง นอกจากนี้ตรวจพบเชื้อในส่วนต่างๆของดอกจากต้นที่เป็นโรคและในส่วน of embryonic axis และ cotyledon ของเมล็ด

Nagaraju and Murthy (1994) รายงานเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) เชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการใบค่าง (mosaic) และเส้นใบค่างเป็นปื้น (vein banding) โดยเชื้อสามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้นและทางเมล็ด มีเพลี้ยอ่อน *A. craccivora* และ *M. persicae* เป็นแมลงพาหะคุณสมบัติของน้ำคั้นพืชเป็นโรคมีย dilution end point (DEP) 1: 1000-1:5000 มี thermal inactivation point (TIP) อยู่ระหว่างอุณหภูมิ 60 - 65 องศาเซลเซียส และมี longevity in vitro (LIV) นาน 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 23 - 25 องศาเซลเซียส และ 7 วันที่อุณหภูมิ 14 องศาเซลเซียส การศึกษาอาการบนพืชอาศัยพบว่าเชื้อก่อให้เกิดอาการแผลจุดเหลืองและเส้นใบหนามบน *Cucurbita moschata* และ *Luffa acutangula* และยังทำให้เกิดอาการใบค่างแบบ systemic บน pigeon pea guar *Phaseolus aureus* และ *P. vulgaris* ในขณะที่บน *C. amaranticolor* และ *C. quinoa* พบอาการแผลจุดเหลืองบนใบที่ปลูกเชื้อ Dahal and Albrechtsen (1996) รายงานเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วฝักยาวในประเทศเนปาลทำให้เกิดอาการใบค่างและเส้นใบค่างเป็นปื้นๆอย่างชัดเจน เชื้อถ่ายทอดโดยน้ำคั้นและเพลี้ยอ่อน อนุภาคมีลักษณะคดงอเป็นเกลียวเชือก (flexuous rod) ขนาด 770 นาโนเมตร และทำปฏิกิริยาทางเซรัมวิทยา กับ antiserum ของเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี immunosorbent electron microscopy (ISEM)

Patil and Gupta (1992 b) ศึกษาผลกระทบของเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวที่มีอาการค้างเนื่องจากการติดเชื้อ bean common mosaic ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต พบว่าในต้นถั่วที่เป็นโรค ความสูงของต้นลดลง จำนวนฝักต่อต้นลดลงแต่จำนวนเมล็ดต่อฝักไม่แตกต่างจากต้นปกติ ผลผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยรวมของถั่วฝักยาวพันธุ์ Pusa-4 ลดลงถึง 42.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาทดสอบในสภาพแปลงปลูก Aftab *et al.* (1993) ศึกษาผลกระทบต่อผลผลิตและการเจริญเติบโตของถั่วฝักยาวเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อ mungbean yellow mosaic virus bigeminivirus ในแหล่งปลูกในเมือง Islamabad ประเทศปากีสถาน โดยถั่วฝักยาวแสดงอาการแผลจุดสีเหลืองหรือแผลจุดสีซีดขาวบนใบ แผลงพาดของเชื้อคือแมลงหิวขาว (*Bemisia tabaci*) พบว่าความสูงของต้น จำนวนฝัก จำนวนเมล็ดและผลผลิตต่อต้นลดลง 10.3 50.5 44.7 และ 49.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Vale *et al.* (1994) ศึกษาผลของการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสต่างกลุ่มในถั่วฝักยาว พันธุ์ Pitiuba Macaibo CNC-0434 และพันธุ์ Setentao ต่อเชื้อ cowpea severe mosaic comovirus (CpSMV), cowpea (aphid-borne) mosaic virus (blackeye cowpea mosaic potyvirus (BCpMV) และเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) และการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ (CMV+BCpMV CMV+CpSMV BCpMV+CpSMV CMV+BCpMV+CpSMV) พบว่าเชื้อ CMV+CpSMV และ BCpMV+CpSMV ช่วยเสริมการเข้าทำลายกันในถั่วพันธุ์ Pitiuba และพันธุ์ Setentao ในขณะที่เชื้อไวรัส 3 ชนิดคือ CMV+BCpMV+CpSMV เสริมการเข้าทำลายทำให้ถั่วแสดงอาการ necrosis และต้นตาย Anderson *et al.* (1996) รายงานการเข้าทำลายของเชื้อ blackeye cowpea mosaic ในถั่ว (cowpea) ซึ่งมีความต้านทานโรคในระดับต่างกัน พืชบางกลุ่มแสดงอาการของโรคช้าและไม่รุนแรงในขณะที่บางกลุ่มแสดงอาการต่างอย่างรุนแรงถึงแม้ว่าจากการตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของเชื้อโดยวิธี ELISA พบความเข้มข้นอยู่ในระดับเดียวกัน และเมื่อศึกษาการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ blackeye cowpea mosaic และ cucumber mosaic virus โดยการตรวจสอบด้วยวิธีเดียวกันพบว่าระดับความเข้มข้นของเชื้อ CMV ลดลงเมื่อพืชมีอายุมากขึ้นแต่การเข้าทำลายร่วมของเชื้อทั้งสองทำให้พืชแสดงอาการใบด่างและแคะแกระอย่างรุนแรง

Mali *et al.* (1989) รายงานชนิดของเชื้อไวรัสที่สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดถั่วฝักยาวในประเทศอินเดีย พบว่าเชื้อ blackeye cowpea mosaic potyvirus, cowpea aphid-borne mosaic virus, cucumber mosaic virus และ sunn-hemp mosaic tobamovirus สามารถถ่ายทอดเชื้อได้ 7.8-41.6 3.1-20 1.3-25.8 และ 2.5-17.5 เปอร์เซ็นต์ โดยอัตราในการถ่ายทอดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพันธุ์และลักษณะพันธุกรรมของถั่ว Hampton *et al.* (1992) ทำการตรวจสอบเมล็ด cowpea (*Vigna unguiculata* subsp *unguiculata*) เพื่อศึกษาความสามารถของเชื้อไวรัสในการถ่ายทอดผ่านเมล็ดและพบว่าเชื้อไวรัสที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้คือ cowpea aphid – borne mosaic (CABMV), cowpea mild mottle virus (CMMV), cowpea mosaic virus (CPMV), cowpea sever mosaic virus (CSMV), cucumber mosaic virus (CMV) southern bean mosaic virus (SBMV) Gillaspie *et al.* (1993) ศึกษาเมล็ดถั่วฝักยาวที่มีการติดเชื้อ blackeye cowpea mosaic potyvirus (BICMV) พบเปอร์เซ็นต์ในการถ่ายทอดคือ 0.4 - 50 เปอร์เซ็นต์ และจากการตรวจสอบเชื้อด้วยวิธี DAS-ELISA

และ bioassay บนต้น *C. amaranticolor*. พบเชื้อนี้อยู่ในส่วนของ cotyledon และ embryo axes แต่ในส่วนของ testa พบเพียงเล็กน้อย

Nain *et al.* (1994 a) ศึกษาความสัมพันธ์ของประสิทธิภาพในการการถ่ายทอดเชื้อไวรัสต่อระยะการเจริญเติบโตของถั่วฝักยาวพันธุ์ FS-68 HFC 42-1 JC-5 และพันธุ์ JC-10 ในประเทศอินเดีย เชื้อไวรัสที่ใช้ศึกษาคือเชื้อ alfalfa mosaic alfamovirus (AMV), cowpea aphid-borne mosaic virus (blackeye cowpea mosaic virus ; BECPMV), southern bean mosaic sobemovirus (SBMV), cowpea mosaic potyvirus (CPMV) และเชื้อ cowpea mosaic comovirus (CPMV) พบความสัมพันธ์ผกผันระหว่างเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อผ่านทางเมล็ดต่ออายุของถั่วฝักยาวที่ทำการปลูกเชื้อ โดยเชื้อไวรัสที่ใช้ศึกษาสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดในเปอร์เซ็นต์สูงเมื่อทำการปลูกเชื้อถั่วฝักยาวอายุ 1 สัปดาห์ และเชื้อไวรัสทั้ง 5 ชนิดยังสามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้เมื่อทำการปลูกเชื้อในถั่วฝักยาวอายุ 3 สัปดาห์ ในขณะที่ทำการปลูกเชื้อเมื่อถั่วฝักยาวอายุ 6 สัปดาห์ถั่วไม่แสดงอาการของโรค แต่เชื้อ AMV, BECPMV และ CPMV ยังถ่ายทอดผ่านเมล็ดได้ Premala *et al.* (1996) รายงานเชื้อ blackeye cowpea mosaic potyvirus (BICMV) สาเหตุโรคใบค่างรุนแรงในถั่วฝักยาวพันธุ์ Polonmae ในประเทศศรีลังกา เชื้อถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ 3-27 เปอร์เซ็นต์ทั้งในเมล็ดสดที่เพิ่งเก็บเกี่ยวและเมล็ดที่เก็บไว้นานถึง 7 ปีที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส เชื้ออยู่ในส่วนของ cotyledon และ embryo การใช้ความร้อนชื้นหรือความร้อนแห้งไม่สามารถทำลายเชื้อที่เมล็ดได้ นอกจากนี้การเข้าทำลายร่วมระหว่างเชื้อนี้และเชื้อ cucumber mosaic virus ทำให้ความรุนแรงของโรคมากขึ้น Gillaspie *et al.* (1998) รายงานว่าพบ seed borne cucumber mosaic virus strain ใหม่ที่มีอิทธิพลต่อความรุนแรงกับอาการบนถั่วจำนวนมาก ตรวจพบในรัฐจอร์เจีย (Georgia) ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี 1994 CMV - Csb strain นี้ไม่แสดงอาการของโรคบนยาสูบ แต่แสดงอาการรุนแรงมากบนถั่วโดยต้นที่เป็นโรคแสดงอาการต้นแคระแกร็น เมื่อเข้าทำลายร่วมกับเชื้อ blackeye cowpea mosaic virus แพร่ระบาดกว้างขวางกว่าเชื้อ CMV isolates seed borne เดิม โดยความรุนแรงของอาการไม่เกี่ยวกับ satellite RNA และ strain ดังกล่าวยังเป็นสมาชิกของ Subgroup I ของ CMV strains โดยการวิเคราะห์ด้วย nucleic acid hybridization assays

Nagaraju and Murthy (1994) รายงานการศึกษาโรคค่างของ Cowpea (*Vigna unguiculata* L) ที่มีอาการค่าง สีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนทั่วทั้งต้น และเส้นใบค่างสีเขียวเข้ม เชื้อสามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะได้แก่ เพลี้ยอ่อน *A. craccivora* และ *M. perisicae* และทางวิธีน้ำคั้น Thottappilly and Rossel (1992) พบว่าในประเทศแอฟริกา มีรายงานแมลงพาหะของเชื้อไวรัสได้แก่ แมลงปีกแข็ง 3 ชนิดถ่ายทอดเชื้อ cowpea yellow mosaic virus, cowpea mottle virus และ southern bean mosaic virus เพลี้ยอ่อน 2 ชนิดถ่ายทอดเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus และ cucumber mosaic virus แมลงหิวข้าว 2 ชนิด ถ่ายทอดเชื้อ cowpea golden mosaic virus และ cowpea mild mottle virus ส่วนใหญ่พบในเขตตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศ Nagaraju and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Murthy (1997) รายงานการถ่ายทอดเชื้อ cowpea mosaic comovirus โดยเพลี้ยอ่อน *M. persicae* แบบ non-persistent

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเข้าทำลายถั่วฝักยาวโดย มีแมลงเป็นพาหะต่อไปนี้ (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 รายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลถั่วโดยพาหะต่างๆ และ ลักษณะ ของการถ่ายทอด ที่มา : (Sinclair and Backman. 1993)

Vector	Virus or Viroid	Taxonomic Group ^b	Other Modes of Transmission ^a
Aphids	Peanut mottle	Potyvirus	M
	Peanut Strip	Potyvirus	M,S
	Soybean dwarf	Luteovirus	G
	Soybean chlorotic mottle	Caulimovirus	M
	Bean yellow mosaic	Potyvirus	M
Beetles	Cowpea chlorotic mottle	Bromovirus	M
	Cowpea sever mosaic	Comovirus	M,S
	Bean pod mottle	Comovirus	M,S
	Blachgram mottle	Ungrouped virus	M
Nematodes	Tobacco ringspot	Nepovirus	M, S, G
Whiteflies	Cowpea mild mottle	Carlavirus	M
	Mungbean yellow mosaic	Geminivirus	M

^aM = mechanical transmission , S = seed transmission , G = grafting

^bThe taxonomy of this virus is uncertain

Kannan *et al.* (1993) ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคใบด่างของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus (CAMV) โดยใช้การฉีดพ่นน้ำคั้นของพืชต่อไปนี้ *Prosopis chilensis*, *Vitex negundo*, *Azadirachta indica*. และ *Madhuca longifolia*. พบว่าสามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคและเพิ่มผลผลิตของถั่วฝักยาวได้โดยเฉพาะการใช้น้ำคั้นจากของ *A. indica* ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ทำให้เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคอยู่ที่ 7.9 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับแปลง control ที่ 18.7 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตเท่ากับ 890 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์ ในขณะที่แปลง control ได้ 540 กิโลกรัมต่อเฮกเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chang *et al.* (1994) แนะนำการใช้เมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวปลอดโรคปลูกเพื่อลดปัญหาการเกิดโรคใบค่างของถั่วฝักยาวพันธุ์ San-Tse-Chin-Pi เนื่องจากเชื้อ cucumber mosaic virus และเชื้อ blackeye cowpea mosaic potyvirus ซึ่งวิธีนี้ลดการเกิดโรคได้ 30 - 72 เปอร์เซ็นต์และยังช่วยเพิ่มผลผลิตได้ 11-74 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพืชอาศัยของไวรัสแดงและถั่วฝักยาวมีมากมายได้แก่ Family Chenopodiaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Amaranthaceae, Apocynaceae, Labiatae, Solanaceae และ Compositae ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 พืชอาศัยของไวรัสแดงกวาและถั่วฝักยาว ที่มา: (ธีระ สุตะบุตร. 2535. ; อุดม ฟ้างูสง. 2527)

ชนิดของพืชอาศัยของเชื้อไวรัส	
ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ
Family Leguminosae	
<i>Arachis hypogaea</i> L.	ถั่วลิสง
<i>Cassia occidentalis</i> L.	ซีเหล็กเทศ
<i>Cassia tora</i> L.	จุมเห็ดไทย
<i>Crotalaria juncea</i> L.	ปอเทือง
<i>Lupinus albus</i> L.	-
<i>Phaseolus aureus</i> L.	ถั่วเขียว
<i>P. vulgaris</i> L.	ถั่วแขก
<i>Pisum sativum</i> L.	ถั่วลันเตา
<i>Stizolobium deeringianum</i> Bort.	ถั่วพรี
<i>Vicia faba</i> L.	ถั่วปากอ้า
<i>Vigna sesquipedalis</i> Wight.	ถั่วฝักยาว
<i>V. sinensis</i> Savi ex Hassk.	ถั่วพุ่ม
<i>Sesamun orientale</i> L.	งา
Family Solanaceae	
<i>Capsicum frutescens</i> L.	พริก
<i>C. minimum</i> Roxb.	พริกขี้หนู
<i>Datura stramonium</i> L.	ตำโพง
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill	มะเขือเทศ
<i>Petunia hybrida</i> Vilm.	พืชุนี
<i>Solanum melongena</i> L.	มะเขือยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) พืชอาศัยของไวรัสแดงกวางและถั่วฝักยาว

ชนิดของพืชอาศัยของเชื้อไวรัส	
ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ
Family Amaranthaceae	
<i>Amaranthus caudatus</i> L.	หงอนไก่
<i>Gomphrena globosa</i> L.	บานไม่รู้โรย
Family Apocynaceae	
<i>Vinca rosea</i> L.	พังพวย
Family Chenopodiaceae	
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Goosefoot
<i>C. capitatum</i> Aschers	-
<i>Beta vulgaris</i> L.	ผักกาดแดง
Family Compositae	
<i>Helianthus giganteus</i> L.	ทานตะวัน
<i>Zinnia elegans</i> Jacq.	บานชื่น
<i>Synedrella nodiflora</i> Gaertn.	ผักแครด
Family Labiatae	
<i>Ocimum basilicum</i> L.	โหระพา
<i>O. gratissimum</i> L.	โหระพาช้าง
<i>O. sanctum</i> L.	กะเพรา

2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคทาง molecular biology

2.3.1 การตรวจสอบโดยการแยกสกัด dsRNA

การนำเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิกแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction) มาใช้ในการตรวจสอบและวินิจฉัยเชื้อไวรัส ซึ่งไวรัสส่วนใหญ่มีหน่วยพันธุกรรมเป็น RNA การเข้าทำลายของเชื้อไวรัส เชื้อมีการทวีจำนวน (multiplication) ทำให้เกิด double stranded RNA (dsRNA) อาศัยปรากฏการณ์ในการเกิด dsRNA ดังกล่าว จึงทำการแยกสกัด RNA ออกมาเพื่อตรวจสอบขนาดของ dsRNA ซึ่งจะมีขนาดโมเลกุลประมาณ $> 0.1 \times 10^6$ dalton ของเชื้อ การวินิจฉัยชนิดของเชื้อจะพิจารณาจากลักษณะ จำนวน และระยะทางการเคลื่อนที่ของ dsRNA บนตัวกลาง (matrix) เช่น polyacrylamide gel หรือ agarose (Morris and Dodds. 1979 ; Jordan *et al.* 1983)

นวลพรรณ งามยี่สุ่น (2540) รายงานว่าเทคนิคในการสกัด dsRNA ของเชื้อไวรัสเพื่อการตรวจสอบและวินิจฉัยชนิดของเชื้อแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน

1. การแยกสกัด dsRNA (dsRNA extraction)

2. การใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก dsRNA ของเชื้อ (electrophoresis) โดยอาศัยหลักการที่ว่า โมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ โดยการเคลื่อนที่จะแตกต่างกันไปขึ้นกับคุณสมบัติของโมเลกุล เช่น ขนาด รูปร่าง และประจุ ซึ่งกระแสไฟฟ้าที่ใช้จะอยู่ระหว่าง 50-120 voltage โดยขึ้นอยู่กับขนาดของ gel

3. การตรวจสอบและวิเคราะห์ผล โดยสังเกตลักษณะ จำนวน ระยะทางการเคลื่อนที่ของ dsRNA ภายหลัง electrophoresis นำ gel มาทำการย้อมสีด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เพื่อดูลักษณะการเคลื่อนที่ของ dsRNA โดยใช้กล้องแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 260-302 นาโนเมตร.

วิธีนี้นำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสและกลุ่มของเชื้อไวรัสหลายชนิด เช่น การตรวจสอบเชื้อไวรัสยาสูบ (Ikegami and Fraendel-Conrat. 1975) โรคไวรัสของเห็ด (Morris and Dodds. 1979) เชื้อ lettuce speckles mottle virus (Fald *et al.* 1979) เชื้อ barley yellow dwarf virus (Gildow *et al.* 1983) โรค avocado streak disease (Jordan *et al.* 1983) ไวรัสในกลุ่ม closterovirus (Dodds and Bar-Joseph. 1983) ไวรัสใบค่างของ *Cassia corymbosa* (Ngamyeesoon and Hick. 1998) และไวรัสในไม้ประดับเนื้อแข็ง (Hicks *et al.* 1988) และ Martelli *et al.* (1995) เก็บตัวอย่างส่วน cortical ของ olive พันธุ์ต่างๆที่แสดงอาการลำต้นแตกอย่างรุนแรง แตกเพียงเล็กน้อยและพวกที่ไม่แสดงอาการ มาตรวจสอบพบเชื้อ Olive latent 1 virus (OLV-1) เป็นเชื้อสาเหตุ Tzeng *et al.* (1996) ใช้ phenol-sodium dodecyl sulfate ในการสกัด dsRNA เชื้อ closterovirus สาเหตุของโรคใบหงิกขององุ่น โดยใช้เนื้อเยื่อส่วน cortical พบว่าการใช้สารละลายนี้ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ปริมาณของ dsRNA เพิ่มขึ้น Grieco *et al.* (2000) รายงานว่าวิธีการตรวจสอบขั้นพื้นฐานโดย mechanical transmission ผู้พืชทดสอบในพืชบางชนิดยังประสบปัญหาจึงนำเทคนิคทางด้าน molecular detection ได้แก่ dsRNA extraction และ molecular hybridization มาตรวจสอบเชื้อไวรัสในต้น olive ในประเทศอิตาลี พบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างจำนวน 210 จากตัวอย่างทั้งหมด 286 ตัวอย่าง และพบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ผลิมีปริมาณของ dsRNA สูงกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ร่วง นอกจากนี้จากการศึกษาของ (นวลพรรณ งามยี่สุน และกิริติกุล ชีกว้าง. 2546) รายงานว่าการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อจากใบมะลิที่แสดงอาการเป็นโรคจากสภาพธรรมชาติ และมะลิที่แสดงอาการใบค่างจากการถ่ายทอดเชื้อโดย *M. persicae* โดยใช้ Rneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) พบการเข้าทำลายของเชื้อ Cucumber mosaic virus (CMV) นวลพรรณ งามยี่สุน และคมสร แสงจินดา (2548) รายงานการตรวจเชื้อ CMV ในถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกับการทำนารวมทั้งการตรวจวัชพืชและพืชข้างเคียงด้วยวิธี dsRNA extraction

2.3.2 การตรวจสอบโดยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction)

ปัจจุบันเทคนิค PCR หรือ Polymerase Chain Reaction ได้ถูกพัฒนาและนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสต่างๆ โดยประกอบด้วยขั้นตอนเพียง 3 ขั้นตอนคือ

1. การสกัด DNA หรือ RNA (Reaction Preparation)

เป็นการแยกสกัดเอาสารพันธุกรรมออกจากสิ่งส่งตรวจ ก่อนที่จะนำสารพันธุกรรมที่ได้ไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคต่างๆ ทางด้านชีวโมเลกุล

2. การทำปฏิกิริยาอุณหภูมิเมอเรส (Thermal Cycling)

หลักการทั่วไปของเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) หรือ In vitro enzymatic gene amplification เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของ DNA ในหลอดทดลอง การเพิ่มขยายปริมาณ DNA จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ DNA แม่พิมพ์ (template DNA) thermostable DNA polymerase deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด oligonucleotide primers และ Buffer ที่เหมาะสม ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรรูกลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

2.1 ขั้นตอน Denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำและหรือสั้นเกินไป จะทำให้การแยกสายแม่พิมพ์ไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ประสิทธิภาพการทำ PCR ลดลง โดยทั่วไปการ denature ที่ 94 – 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาทีก็เพียงพอสำหรับการแยกสายแม่พิมพ์อย่างสมบูรณ์ แต่ในทางปฏิบัติจริงๆ เวลาที่ใช้อาจปรับเปลี่ยน ตามความเหมาะสมขึ้นกับลักษณะความซับซ้อน (complexity) ของแม่พิมพ์ ลักษณะและขนาดของหลอด PCR ปริมาตรของปฏิกิริยา PCR ชนิดของเครื่อง thermocycler ที่ใช้ ในกรณีแม่พิมพ์ที่มี GC content สูง อาจต้องใช้เวลา denature นานขึ้น หรือใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น การเติม glycerol ลงไป เพื่อกันการระเหยของน้ำ พยายามหลีกเลี่ยงการใช้ อุณหภูมิที่สูงเกินไป และหรือนานเกินไป เนื่องจากจะทำให้ activity ของ polymerase ลดลง

2.2 ขั้นตอน Annealing เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50 – 55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม ขั้นตอนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพและความจำเพาะในการทำ PCR โดยทั่วไปสามารถทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยการหาค่า T_m ของ Primer โดยการใช้ software หรือสูตรคำนวณได้ดังนี้ $T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$ ซึ่งจะได้ค่า T_m อย่างคร่าวๆ จากนั้นเปรียบเทียบการทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่างกันประมาณ 2 องศาเซลเซียส หลากๆ อุณหภูมิ โดยใช้ค่า $T_m - 5$ องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิหลัก การใช้อุณหภูมิต่ำเกินไป ทำให้การ annealing อย่างไม่จำเพาะเกิดขึ้นอย่างมากมาย แต่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไป การ annealing จะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่มีเลย

2.3 ขั้นตอน Primer extension เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทาง 5' ไป 3' อุณหภูมิขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70 – 75 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาที่ใช้ขึ้นกับความยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และความเข้มข้นของสายแม่พิมพ์รวมทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในปฏิกิริยาคือ การสังเคราะห์จะดำเนินตามลำดับ 3 ขั้นตอน ซ้ำกันเป็นจำนวน 20 – 30 รอบ ทำให้ได้ PCR product หรือ amplified product เป็นดีเอ็นเอสายใหม่เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก

3. การตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า และการบันทึกผล (Detection)

หลังจากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เสร็จสมบูรณ์แล้ว นำผลผลิตที่ได้คือ ซินดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากมีจำนวนซ้ำของลำดับเบสแกนไม่เท่ากันมาแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยใช้ตัวกลางชนิดอะกาโรส (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 2-3 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 180 โวลต์ โดยใช้เวลาประมาณ 30 - 40 นาที ซินดีเอ็นเอซึ่งมีประจุเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก โดยซินดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าซินดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ เมื่อซินดีเอ็นเอแยกโดยสมบูรณ์แล้วจึงนำ agarose gel มาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และนำไปบันทึกผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อดูลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น

การศึกษาของ Choi *et al.* (1998) รายงานว่า พบเชื้อ CMV, CGMMV และ ZYMV จากผลและเมล็ดของพริก และ แตงกวา ด้วยวิธี reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR) Faten *et al.* (1999) พบว่าการจำแนกเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus คือ potato virus Y (PVY) และ Pepper vein mottle virus (PVMV) ของ pepper (*Capsicum annum* L.) ในประเทศอินเดียในช่วงปี 1995-1997 โดยการใช้วิธี RT-PCR พบว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อกลุ่ม potyvirus สูง ซึ่งเชื้อ PVY พบว่ามีรายงานการแพร่ระบาดมานานแล้วแต่สำหรับเชื้อ PVMV เป็นการสำรวจพบเป็นครั้งแรกในประเทศอินเดีย นอกจากนี้ Gillaspie *et al.* (2001) รายงานว่า cowpea aphid – borne mosaic virus (CAMV) strain Brazilian เป็นเชื้อที่รุนแรงมากในถั่วลิสง และเป็นปัญหาในหลายพื้นที่ถ่ายทอดทางเมล็ด 0.15 เปอร์เซ็นต์ ในถั่วลิสง ใช้ primer ที่ออกแบบจาก coat protein และหาค่าโดย RT – PCR forward primer 5'- CGCTCAAACCCATTGTAGAA – 3' และ reverse primer 5' –TATTGCTTCCCTTGCTCTTTC – 3' ขนาด 221 bp RT – PCR มีความไวในการตรวจหาเชื้อไวรัสมากกว่าวิธีการ ELISA Gillaspie *et al.* (1999) รายงานว่า RT – PCR เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจสอบ cowpea mottle carmovirus (CPMoV) ใน *Vigna* spp. ตรวจพบไวรัสในเนื้อเชื้อที่เจอจาก 9-10 เท่า การออกแบบ primer จาก ลำดับเบสของ CPMoV สามารถตรวจพบ CPMoV ในพืชที่ติดเชื้อไวรัสต่างกัน 10 isolates เช่นเชื้อ bean mild mosaic carmovirus หรือ melon necrotic spot carmovirus หรือ ไวรัสทั่วไปของ cowpea (blackeye cowpea mosaic potyvirus cowpea chlorotic mottle bromovirus, cowpea severe mosaic comovirus, cucumber mosaic cucumovirus, peanut stunt cucumovirus, southern bean mosaic sobemovirus (Bean southern mosaic sobemovirus), sunn-hemp mosaic tobamovirus และ white clover mosaic potyvirus) วิธี RT – PCR มีความไวสูงกว่า DAS – ELISA ในการตรวจ CPMoV และไม่มีความผิดพลาดของปฏิกิริยา positive ขณะที่บางครั้งพบความผิดพลาดในการตรวจด้วยวิธี ELISA ส่วน Chen and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wang (2001) รายงานว่า blackeye cowpea mosaic virus (BICMV) เป็นสมาชิกกลุ่ม potyvirus และเป็นปัญหาไวรัสที่ติดเชื่อในการปลูกพืชในวงศ์ Leguminaceae ในการศึกษา cDNA ของ 3' terminal ของ BICMV – TW และการเพิ่มปริมาณด้วย RT-PCR ก่อนทำการวิเคราะห์ nucleotide และลำดับ amino acid ของ coat protein และการศึกษา 3' non – translated region (NTR) ของ BICMV – TW เปรียบเทียบกับรายงานสมาชิกอื่นของ bean common mosaic virus subgroup (BICMV-F; BICMV-W; CABMV-TH ;AzMV-H; PStV-China G; PStV-B ;BCMV-NY15; BCMV-NL1 และ BCMV-NL4) จากแหล่งต่างๆพบว่า ลำดับของ nucleotide ขนาด 1112 bp ใน 3' terminal regions ของ BICMV-TW ประกอบด้วย 861 nucleotides ของ CP gene 287 bp amino acid ตามด้วย non – translated region 251 nucleotides และ 3' poly(A) การเปรียบเทียบ BICMV – TW กับรายงานสมาชิกอื่นของ bean common mosaic virus subgroup เหมือนกับไวรัสสมาชิกทั้งหมด แต่ต่างกันตรง strains ของเชื้อ

นอกจากนี้ยังมีรายงานจาก Kundu *et al.* (2003) รายงานการใช้เทคนิค RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) และ DAS-ELISA (Double antibody sandwich-enzyme linked immuno-sorbent assay) ในการตรวจสอบเชื้อ apple stem grooving virus (ASPV) ซึ่งพบเชื้อไวรัสในทุกเนื้อเยื่อที่มาตรวจสอบคือ ส่วนเปลือก ตา กลีบดอกและใบของต้นแอปเปิ้ลที่เก็บตัวอย่างมาตรวจในช่วงเวลาที่แตกต่างกันใน 1 ปี

Marinho *et al.* (2003) ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบเชื้อ apple stem grooving virus (ASPV) ในเนื้อเยื่อทุกส่วนของต้นแอปเปิ้ล โดยใช้ primer ASGV4F-AAAASGV4R ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ ASPV ในการ replicase gene ด้วยระบบ Titan RT-PCR โดยนำน้ำคั้นของใบหรือเปลือกของต้นแอปเปิ้ลมาเป็น first strand จากนั้นตรวจสอบการเกิดสีหลังจากการทำ PCR ด้วย sandwich hybridisation 2 ชนิด คือ biotin-labelled capture probe และ digoxigenin (DIG) –labelled detection probe ซึ่งพบว่าการใช้ primer ASGV4F-AAAASGV4R สามารถตรวจพบเชื้อ ASPV ได้แม้มีปริมาณตัวอย่างในปริมาณเล็กน้อย (400 fg)

Mirosława (2004) รายงานการใช้เทคนิค RT-PCR ตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ strawberry mottle virus (SMoV) ในพืช *Fragaria virginiana* UC-11 ซึ่งเป็นพืชที่มี polysaccharides และ phenolic compound มาก ทดลองเปรียบเทียบการสกัด RNA ของเชื้อไวรัสใน 2 วิธีคือ วิธี lithium method (homogenization in buffer lithium chloride) และวิธี silica capture method ตรวจสอบ RNA 1 µl ที่ความเข้มข้น 5 dilutions คือ 1:50 1:100 1:200 1:400 และ 1:800 พบว่าวิธี lithium method ดีกว่าวิธี silica capture method เพราะว่าจาก agarose gel electrophoresis แล้วย้อมสีด้วย ethidium bromide วิธี lithium method สามารถเห็น band RNA ที่ความเข้มข้น 1:50 1:100 1:200 และ 1:400 แต่สำหรับวิธี silica capture method ไม่สามารถเห็น band RNA ที่ความเข้มข้นทั้ง 5 เลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shuju *et al.* (2004) รายงานการออกแบบ primer 5 คู่ และ การสังเคราะห์ลำดับเบส RNA ของ CMV WMV -2 TMV CGMMV และ SQMV โดย reverse transcription polymerase chain reaction (RT -PCR) ซึ่งสกัด RNA ทั้งหมดมาจากใบแตงกวาที่ติดเชื้อและใบปกติ ตรวจพบ 98 ตัวอย่างที่รวบรวมจากบางเขตของ Tianjin ในประเทศจีนในปี 2002 และ 2003 ไวรัสสาเหตุหลักของแตงกวาใน Tianjin คือ เชื้อ CMV WMV -2 และ TMV โดยพบอัตราการเกิดโรคที่ 96.94 77.55 และ 38.67 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Cigdem and Filiz (2005) รายงานการสำรวจโรค Apple chlorotic leaf spot (ACLSV) ในประเทศตุรกี จำนวน 369 ตัวอย่างจากพืชพวก stone fruit คือ Cherry peach nectarine apricot และ plum โดยนำตัวอย่างที่แสดงอาการคล้ายอาการที่เกิดจากเชื้อ ACLSV มาตรวจด้วยเทคนิค DAS-ELISA และ RT-PCR พบว่าการใช้เทคนิค ELISA ในการตรวจสอบพบเชื้อ ACLSV ใน 13 ตัวอย่าง ในขณะที่การใช้วิธี PCR พบ ตัวอย่างจำนวน 51 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก พืชพวก apricot พบเชื้อมากที่สุดรองลงมาคือ peach cherry และ plum

อย่างไรก็ตามการใช้วิธี RT-PCR ในการวินิจฉัยชนิดและการตรวจสอบเชื้อไวรัสก็ยังมีข้อเสียในแง่ของการต้องใช้ทักษะและประสบการณ์ในการปฏิบัติงาน รวมถึงโอกาสเสี่ยงในการเกิด cross-contaminate ทำให้ได้ผลลักษณะ false positive ดังนั้นการนำวิธีการตรวจสอบด้วยเครื่อง realtime PCR สามารถลดปัญหาดังกล่าวและยังลดขั้นตอนในการทำ electrophoresis เพื่อตรวจสอบ PCR product ที่ได้ realtime PCR ถูกนำมาใช้ในการศึกษาเชื้อโรคไวรัสเช่น Mumford *et al.* (2000) ใช้เทคนิคนี้ในการตรวจสอบเชื้อ potato mop top virus และ เชื้อ tobacco rattle virus ในมันฝรั่ง Boonham *et al.* (2002) ตรวจสอบเชื้อ tomato spotted wilt virus ในตัวเพลี้ยไฟซึ่งเป็นแมลงพาหะ Korimbocus *et al.* (2002) ศึกษาเชื้อ sugarcane yellow leaf virus ในอ้อย Mumford *et al.* (2004) ทำการตรวจสอบเชื้อ barley yellow virus และ barley mild mosaic virus ในข้าวบาร์เลย์ ในขณะที่ Ratti *et al.* (2004) นำเทคนิค realtime PCR มาตรวจสอบเชื้อ soil - borne cereal mosaic virus ในข้าวสาลีที่ใช้ปลูกในฤดูหนาว

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วิธีการทดลอง

3.1.1 การสำรวจโรคไวรัสในแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกสลับในพื้นที่เดียวกันและการถ่ายทอดโรคด้วยวิธีการปลูกเชื่อมด้วยน้ำคั้น (Mechanical sap transmission)

ทำการเก็บตัวอย่างใบแตงกวาและใบถั่วฝักยาวที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัสในแปลงปลูกของเกษตรกรในท้องที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี ซึ่งเป็นหนึ่งในพื้นที่ที่ทำการปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวหลังจากการทำนา โดยทำการสำรวจตลอดทั้งปีสลับแปลงปลูกหมุนเวียนไป และทำการบันทึกลักษณะอาการก่อนเก็บใบที่แสดงอาการใส่ในถุงพลาสติกโดยแยกใส่ถุงในแต่ละอาการต่าง ๆ กันแล้วใส่ในกล่องน้ำแข็งเพื่อนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ ทำการถ่ายรูปเพื่อบันทึกลักษณะอาการต่างๆ ทั้งจากใบแตงกวาและถั่วฝักยาว ก่อนแบ่งใบพืชเป็น โรคออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่งนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นช่องแช่แข็งที่ (-4 องศาเซลเซียส) อีกส่วนนำมาทำการถ่ายทอดเชื้อโดยการนำตัวอย่างใบที่แสดงอาการมาทำการปลูกเชื่อมไวรัสในแตงกวาและถั่วฝักยาวด้วยวิธีการ Mechanical sap transmission โดยก่อนปลูกเชื่อมทำการคลุมดินกล้าแตงกวาและถั่วฝักยาวอายุ 7-10 วันด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ 24 ชั่วโมง เพื่อให้พืชมีสภาพอ่อนแอเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ การปลูกเชื่อมคือนำใบพืชที่แสดงอาการของโรคไวรัสที่ชัดเจนและคาดว่ามีความเข้มข้นของเชื้ออยู่สูงโดยเฉพาะใบอ่อน บดกับสารละลาย 0.05 M Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 M pH 7.2 ในโถรงที่แช่เย็น ใช้อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อสารละลาย buffer 2-4 มิลลิลิตร และใส่ผง celite เล็กน้อยเพื่อไปทำให้พืชเกิดบาดแผลเพื่อให้เชื้อสามารถผ่านเข้าสู่พืชได้ง่าย หลังจากนั้นใช้นิ้วมือที่สะอาดทาน้ำคั้นเบาเบาไปยังใบเลี้ยง (cotyledon) ของต้นกล้าแตงกวาหรือบนใบแก่คู่แรกของถั่วฝักยาวที่ต้องการปลูกเชื่อม ทำเครื่องหมายหรือสัญลักษณ์ลงบนใบให้ทราบว่าเป็นใบที่ทำการปลูกเชื่อมเพื่อให้ง่ายต่อการสังเกตเมื่อต้องติดตามผลการแสดงอาการ หลังจากนั้นพรมน้ำเล็กน้อยลงบนใบพืชเพื่อเป็นการล้างเศษพืชที่ติดอยู่ในน้ำคั้นที่ทาออกจากใบพืชแล้วคลุมพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ชุบน้ำทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเอาวัสดุคลุมออก จากนั้นนำพืชที่ปลูกเชื่อมทั้งหมดไปเก็บในโรงเรือนกันแมลง สังเกตและบันทึกลักษณะอาการที่เกิดขึ้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาเชื้อไวรัสต่อไป

3.1.2 การสำรวจแมลงพาหะ วัชพืชและพืชใกล้เคียงที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงที่พบในแปลงปลูกพืชทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี มาจัดจำแนกชนิดของแมลงและบันทึกช่วงเวลาพบ ทำการเก็บตัวอย่างวัชพืชและพืชบริเวณใกล้เคียงที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบแสดงอาการคล้ายโรคไวรัสทุกช่วงฤดู โดยเก็บแยกชนิดใส่ถุงพลาสติกเก็บในกระติกน้ำแข็งนำกลับมาห้องปฏิบัติการ เพื่อบันทึกภาพและจำแนกชนิดพืชก่อนแบ่งใบที่แสดงอาการส่วนหนึ่งไปปลูกเชื่อมบนต้นกล้าแตงกวาและถั่วฝักยาว ด้วยวิธีการ Mechanical sap transmission ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น (3.2.1)

3.1.3 การวินิจฉัยชนิดของเชื้อไวรัสด้วยวิธีการทาง เซรุ่มวิทยา

ทำการตรวจสอบหาเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirus group และเชื้อ cucumber mosaic virus เพื่อเป็นการยืนยันชนิดของเชื้อไวรัสสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคกับแตงกวาและถั่วฝักยาวในแปลงปลูก โดยใช้เทคนิคทางเซรุ่มวิทยา ด้วยวิธีการ ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) แบบ indirect

ขั้นตอนและวิธีการในการตรวจสอบเชื้อไวรัส การตรวจสอบโดยวิธี Indirect ELISA มีขั้นตอนดังนี้

1) ตัดส่วนใบของชิ้นส่วนแต่ละตัวอย่าง มาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง โดยแต่ละตัวอย่างจะมีน้ำหนัก 0.5 กรัม

2) วางแผนการตรวจสอบตัวอย่างลงบนตารางทดสอบ โดยในแต่ละตัวอย่างทำการทดสอบ 2 ซ้ำ พร้อมทั้งหุ้มตัวอย่างเปรียบเทียบ ใบพืชเป็นโรคและใบพืชปกติเปรียบเทียบ

3) บดตัวอย่างพืช (ใบถั่วฝักยาว และใบแตงกวา) ที่แสดงอาการของโรคอย่างชัดเจนในสารละลาย coating buffer ให้ได้น้ำก้นเข้มข้น 1 : 100 และ 1 : 1000 (w / v) โดยบดตัวอย่างพืชในถุงพลาสติกขนาดเล็กจำนวน 1 ตัวอย่างต่อ 1 ถุง

4) หยคน้ำก้นตัวอย่างพืชทดสอบที่บดใน coating buffer ลงใน polystyrene plate ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมตามแผนผังตารางทดสอบ ควรระวังการปนเปื้อนใน plate หรือหลุมอื่นๆ

5) นำ plate ที่หยดตัวอย่างทั้งหมดเรียบร้อยแล้วใส่ในถุงพลาสติก ปิดปากถุงให้สนิท เก็บในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา นำ plate มาล้างด้วยสารละลาย PBS – Tween 3 ครั้งๆละ 3 นาที โดยสะบัด plate แรงๆ เพื่อมิให้มีหยดน้ำก้นติดอยู่ที่หลุม จากนั้นหยด PBS – Tween ลงในทุกหลุมควรระวังการปนเปื้อนระหว่างหลุม วาง plate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที เป็นการล้างครั้งที่ 1 ทำการล้างเช่นนี้จนครบ 3 ครั้ง เมื่อล้างครบ 3 ครั้งจึงคว่ำ plate โดยตบแรงๆ บนกระดาษซับหรือผ้าสะอาด

6) หยด antiserum ของเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirus group ได้แก่เชื้อ tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) และเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ในสารละลาย conjugate buffer ให้ได้ความเข้มข้น 1: 1000 แล้วหยดใน plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำ plate ไปบ่มในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดในการบ่ม plate แล้วทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ล้าง plate ด้วย PBS – Tween 3 ครั้งๆ ละ 3 นาทีทำเช่นเดียวกับในวิธีการข้อ 5 หยด Anti – Goat IgG (Alkaline phosphatase conjugate) ความเข้มข้น 1 : 2000 หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำ plate ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงเมื่อครบกำหนดในการบ่ม plate แล้วหยด Anti – Goat IgG เก็บเข้าไว้ในตู้เย็นเพื่อใช้ในครั้งต่อไป (ใช้ต่อเนื่องได้ 3 ครั้ง) ทำการล้าง plate ด้วย PBS – Tween 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที

7) นำ p- nitrophenyl phosphatase 5 มิลลิกรัมต่อ 10 มิลลิลิตร ละลายในสารละลาย substrate buffer แล้วหยด substrate ลงใน plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ทำการตรวจผลปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของสีที่เกิดขึ้นหลังจากทิ้งไว้ 1 ชั่วโมงเพื่อรอให้สีเหลืองของปฏิกิริยาชัดเจนยิ่งขึ้น

8) สังเกตและบันทึกการทดสอบ โดยการสังเกตระดับสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับสีของปฏิกิริยาที่ปรากฏบนตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรค (disease control) และตัวอย่างใบพืชปกติ (healthy control) และวิเคราะห์ผลจากค่า absorbance ของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยค่า absorbance ของพืชเป็นโรคมักมีค่าสูงกว่าพืชปกติอย่างน้อย 2 เท่า นอกจากนี้ยังแบ่งผลค่า absorbance เป็นระดับความเข้มสีของการเกิดปฏิกิริยาเป็น 4 ระดับ ดังนี้

ระดับ 3 = สีเหลืองเข้ม หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสสูง

ระดับ 2 = สีเหลือง หมายถึง มีปริมาณของเชื้อไวรัสปานกลาง

ระดับ 1 = สีเหลืองอ่อน หมายถึง มีปริมาณของเชื้อต่ำ

ระดับ 0 = ไม่เกิดสี หมายถึง ไม่มีปริมาณของเชื้อไวรัส

3.1.4 การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด (seed transmission)

การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ดโดยการนำเมล็ดพันธุ์ที่มีการจำหน่ายในตลาดอำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรีซึ่ง เป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกมาทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดพันธุ์โดยใช้ถั่วฝักยาวทั้งหมด 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขุนศึก No. 7 พันธุ์สมบุรณ์โชค No.99 พันธุ์ไผ่ขวาง 005 พันธุ์ลำน้ำชี พันธุ์ BIG1 และแดงกวาทั้งหมด 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มีชัย พันธุ์อเมซอน พันธุ์อะดอม พันธุ์อมตะ 765 และพันธุ์แทมมี โดยการทดสอบเมล็ดพันธุ์ละ 200 เมล็ดนำมาเพาะในตะกร้าที่เตรียมดินไว้แล้ว โดยใช้ดินที่ปราศจากเชื้อด้วยการนำดินไปอบฆ่าเชื้อก่อนนำมาปลูก จากนั้นใส่เมล็ดถั่วฝักยาว หรือแดงกวา แต่ละพันธุ์ลงไปในพันธุ์ละ 200 เมล็ด รดน้ำเช้าและเย็น และเก็บไว้ในโรงเรือนป้องกันแมลงหลังจากนั้นประมาณ 3 – 4 วัน ต้นกล้าจะเริ่มออกสังเกตอาการต้นพืชตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกลักษณะอาการคำนวณเปอร์เซ็นต์ต้นเป็น โรคและเก็บตัวอย่างต้นที่แสดงอาการของโรคไวรัสนำไปปลูกเชื้อเพื่อทำการวินิจฉัยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แผนผัง การตรวจ ELISA จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวและใบแตงกวาที่แสดงอาการ โรคไวรัสที่เก็บมาจากแปลงปลูกเพื่อตรวจสอบหาเชื้อไวรัสกลุ่ม Geminivirus เชื้อ TYLCV และ CMV

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	positive	positive	V6/1	V6/2								
B	negative	negative	C1/1	C1/2								
C	V1/1	V1/1	C2/1	C2/1								
D	V2/1	V2/2	C3/1	C3/2								
E	V3/1	V3/2										
F	V3/1	V3/2										
G	V4/1	V4/2										
H	V5/1	V5/2										

หมายเหตุ V (No./No.) = ตัวอย่างถั่วฝักยาวจากแปลงปลูก (ตัวอย่างที่ 1 / จำนวนซ้ำ)

C (No./No.) = ตัวอย่างแตงกวาจากแปลงปลูก (ตัวอย่างที่ 1 / จำนวนซ้ำ)

3.1.5 การศึกษาการถ่ายทอดโดยไส้เดือนฝอย (nematode transmission)

การศึกษากการถ่ายทอดโดยไส้เดือนฝอยทำโดยการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวา ที่แสดงอาการของเชื้อไวรัส โดยเก็บบริเวณรอบๆ โคนต้นของพืชที่แสดงอาการของโรคไวรัสที่ความลึกประมาณ 30 เซนติเมตร และนำมาทำการทดสอบการถ่ายทอดโดยไส้เดือนฝอย โดยนำดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกมาใส่ในกระถางที่เตรียมไว้ แล้วนำเมล็ดถั่วฝักยาวพันธุ์ลำน้ำชี และแตงกวาพันธุ์อมตะ 765 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกในขณะนี้ โดยใช้เมล็ดในการเพาะจำนวนพันธุ์ละ 200 เมล็ด รดน้ำเช้าและเย็น นำไปเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง หลังจากนั้นประมาณ 3 – 4 วัน ต้นกล้าจะเริ่มงอก และสังเกตลักษณะอาการตั้งแต่ระยะต้นกล้าที่เกิดขึ้นจนถึงประมาณ 2 สัปดาห์ ว่าปรากฏลักษณะอาการของโรคหรือไม่ เมื่อครบ 2 สัปดาห์จึงนำต้นที่ไม่ปรากฏอาการของโรคมาทำการปลูกเชื้อ (back test) สู่ต้นกล้าแตงกวาและถั่วฝักยาวอีกครั้ง ใน

กรณีที่พบต้นที่แสดงอาการจะทำการเก็บตัวอย่างต้นที่แสดงอาการของโรคไวรัสนำไปปลูกเชื้อเพื่อทำการวินิจฉัยต่อไป

3.1.6 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope; EM)

การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยวิธี Leaf dip technique โดยการนำตัวอย่างที่เก็บได้จากแปลงปลูกมาทำการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้น จากนั้นสังเกตอาการเมื่อพบว่าอาการชัดเจนจึงนำไปดังกล่าวไปตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Hitachi Model HU-12A) ในฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง) สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน โดยการบดตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคในสารละลาย phosphate buffer 0.1 M pH 7.5 ที่แช่เย็น ในอัตราส่วน 1 : 10 (w / v) แยกตะกอนเศษพืชออกแล้วหยคน้ำคั้นพืชเป็นโรคที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น parafilm ที่สะอาด นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh ที่เคลือบด้วย สารละลาย Formvar ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ใน chloroform (w/v) และผง carbon ซึ่งทำลายประจุผิวหน้ากริดแล้ววางคว่ำลงบนหยคน้ำคั้นประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นล้างกริดด้วย สารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.5 ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร ซับขอบกริดด้วยกระดาษกรองให้แห้งพอหมาด ช้อมด้วย สารละลาย uranyl acetate (UA) ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 0.3 มิลลิลิตร ซับขอบกริดให้แห้งอีกครั้งก่อนนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพื่อตรวจหาลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัส

3.1.7 การวินิจฉัยโดยการตรวจสอบกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัส (nucleic acid analysis)

3.1.7.1 การแยกสกัดกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัส (RNA extraction)

การแยกสกัดกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัสจากใบพืชที่เป็นโรคทำโดยการใช้ชุดสกัด UltraClean™ Plant RNA Isolation Kit. บริษัท MO BIO Laboratories, Inc. ซึ่งมีอุปกรณ์ในชุดดังกล่าว (ภาพที่ 3.1) และการใช้น้ำยา Plant concert solution บริษัท Invitrogen ซึ่งมีอุปกรณ์ในชุดดังกล่าว (ภาพที่ 3.2) โดยมีวิธีในการสกัดต่างกัน ในแต่ละขั้นตอนดังต่อไปนี้

การใช้ชุดสกัด UltraClean™ Plant RNA Isolation Kit บริษัท MO BIO Laboratories, Inc.

1) บดใบพืชที่แสดงอาการของเชื้อไวรัสชัดเจนน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลว เติมสารละลาย PMR1 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

2) ใส่น้ำที่เย็นไว้ประมาณ 600 ไมโครลิตร เติมสารละลาย PMR2 500 ไมโครลิตร และ เติม สารละลาย PMR 3 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกวนไปมา แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) คูณสารละลายจากข้อ 3. ใส่ในหลอดที่มี spin filter ให้ได้ปริมาตร 650 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทิ้งน้ำใสเก็บตะกอน

5) เติมสารละลาย PMR5 500 ไมโครลิตรนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที หลังจากนั้นเทน้ำใสทิ้ง หลังจากนั้นนำหลอดที่มี spin filter ไป หมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีเพื่อให้สารละลายที่ยังค้างอยู่บน filter ไหลผ่านลงมาจนหมด

6) นำ spin filter จากข้อ 5 มาใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย PMR6 ปริมาตร 30-50 ไมโครลิตร ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อละลายตะกอน RNA ที่ได้จากการสกัดทั้งหมด (total RNA) เก็บ RNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้





ภาพที่ 3.1 อุปกรณ์ชุดสกัด UltraClean™ Plant RNA Isolation Kit. บริษัท MO BIO

Laboratories.Inc. a = PMR1 b = PMR2 c = PMR3 d = PMR4 e = PMR5
f = PMR6 g = หลอดที่มี spin filter h = หลอดเก็บตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแยกสกัด โคยไซ้ น้ำยา Plant concert solution บริษัท Invitrogen

1) บดใบพืชที่แสดงอาการชัดเจนน้ำหนักประมาณ 0.1- 0.3 กรัม ด้วยไนโตรเจนเหลว เติมน้ำยา Plant concert solution ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Vortex ปั่นเป็นเวลา 30 วินาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที โดยการเอียงหลอด หลังจากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2) ควบน้ำใสใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 M ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติม Chloroform ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3) ควบน้ำใสส่วนบนใสในหลอดใหม่ ก่อนเติม 2 - propanol เท่ากับปริมาณน้ำใสที่ได้ หลังจากนั้น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4) ทิ้งน้ำใส เก็บตะกอน ก่อนเติม ethanol ความเข้มข้น 75 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที

5) ทิ้งน้ำใส แล้วนำหลอดทิ้งให้แห้ง (air-dry) ตะกอนที่ได้คือ RNA รวม (total RNA) ก่อนเติม Rnase free water ปริมาตร 10-30 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้



ภาพที่ 3.2 อุปกรณ์ในชุด Plant concert solution บริษัท Invitrogen ; a = Plant concert solution b = Chloroform c = 75% ethanol d = 2 - propanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.7.2 การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสโดยการตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อไวรัส (Double-stranded RNA detection)

การตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายใบแตงกวา ใบถั่วฝักยาว ใบวัชพืชและพืชใกล้เคียงทำโดยการนำใบพืชที่แสดงอาการมาทำการสกัด RNA ตามวิธีและขั้นตอนการสกัดในหัวข้อ 3.1.7.1 แล้วนำ total RNA ใน RNase-free water ที่ได้ไปทำการแยกด้วยวิธี electrophoresis โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 0.8เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวกลาง electrophoresis buffer ที่ใช้คือ Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (TAE) buffer ซึ่ง TAE buffer (50 X) ประกอบด้วย (Tris 242 กรัม : glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร : และ 0.5M EDTA pH 8.0 100 มิลลิลิตร ต่อลิตร) ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 50 voltage เวลา 2 ชั่วโมง

การหยอดตัวอย่างของ total RNA ที่สกัดได้จากใบพืชเป็นโรคทำโดยการผสม total RNA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กับ gel loading buffer (Bluejuice 10X จากบริษัท Invitrogen) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เข้าด้วยกันก่อนหยอดลงในแต่ละหลุมของ agarose gel สำหรับตัวเปรียบเทียบมาตรฐานคือ Lambda DNA ที่ถูกย่อยด้วย enzyme Hind III

การตรวจสอบและวิเคราะห์ผลโดยนำ gel มาทำการย้อมสีด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 15 นาที เพื่อดูลักษณะการเคลื่อนที่ของ dsRNA โดยใช้กล้องแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 260–302 นาโนเมตร จากลักษณะการเคลื่อนที่ของ band dsRNA ที่ตรวจสอบได้นั้น สามารถนำมาเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานที่ใช้ แล้วคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างที่ต้องการโดยเปรียบเทียบกับ linear curve การยืนยันผลว่า band ที่ได้เป็น dsRNA ทำโดยนำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15 M ที่มี enzyme RNase เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วนำมาตรวจสอบบนกล้องแสง ultraviolet อีกครั้ง แถบ band ของ dsRNA จะยังคงอยู่ไม่ถูกย่อยสลาย

ตัวอย่างใบพืชที่นำมาทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธีนี้คือ ใบถั่วฝักยาวที่แสดงอาการของโรคไวรัสจากการสำรวจในแปลงและการถ่ายทอดผ่านทางน้ำคั้นจำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากใบแตงกวาที่ได้จากการถ่ายทอดน้ำคั้นจากแตงกวาเป็นโรค 3 ตัวอย่างจากแปลงปลูกและใบของวัชพืชและพืชข้างเคียงแปลงปลูกที่แสดงอาการของโรคไวรัสจากการสำรวจตลอดปี

3.1.8 การตรวจสอบเชื้อโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.1.8.1 การเตรียม PCR mix (SuperscriptTM III one – step RT-PCR บริษัท Invitrogen)

โดยใช้ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตรต่อ 1 ปฏิกริยา primer ที่ใช้ศึกษามีทั้งหมด จำนวน 4 คู่ ด้วยกันประกอบด้วย degenerate primer

Pot1(5'ATTBTCDATRCACCA 3') (reverse) และ

Pot2 (5' TGYGAYGCBGATGGYTC 3') (forward)

โดย Pot 1 จับตรงตำแหน่ง CP : coat protein และ Pot 2 จับตรงตำแหน่ง Nib : nuclear inclusion b protein (ภาพที่ 3.3) (Colinet *et. al.* 1994) ใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup

primer CMV1(5'GCCGTAAGCTGGATGGACAA 3') (forward) และ

primerCMV2 (5'TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG3') (reverse)(Singh *et. al.*1995)

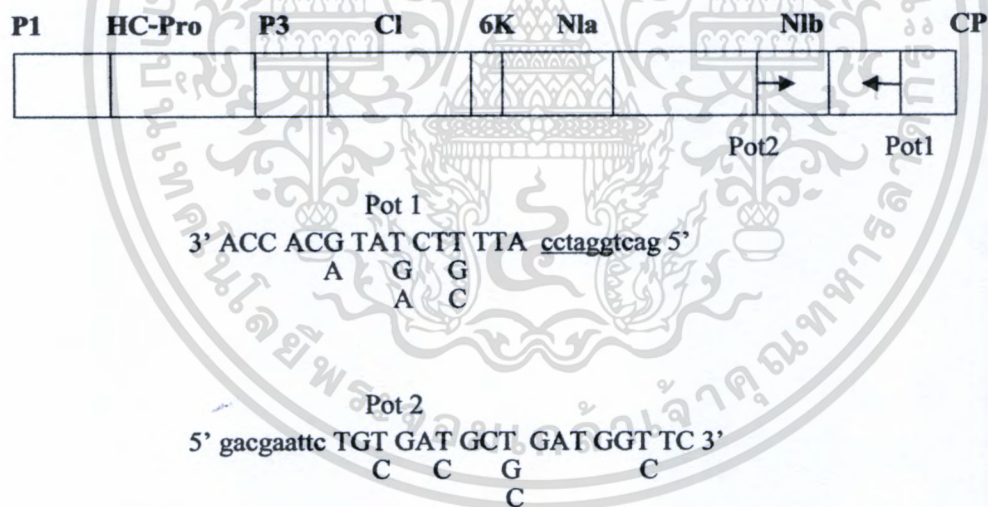
ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ cucumber mosaic virus

primer cowpea – aphid borne1(5'CCTCAAGGATGAGGTCGAAGAA 3') (forward)

และ primer cowpea–aphid borne2 (5'GGAAGTACGCTACCGTACTT3') (reverse) (ออกแบบเอง)

primer cowpea – aphid borne3 (5' CGCTCAAACCCATTGTAGAA 3') (forward)

และ primer cowpea – aphid borne4 (5'TATTGCTTCCCTTGCTCTTTC 3') (Gillaspie *et. al.* 2001) ใช้ในการตรวจสอบเชื้อ cowpea- aphid borned virus



ภาพที่ 3.3 แผนที่พันธุกรรมของ potyvirus genome แสดงตำแหน่งโดยเทียบกับ 2 degenerate

primer P1 : first protein; HC – Pro : helper component – protease; P3 : third protein;

CI : cytoplasmic inclusion protein; 6K : 6K peptide; NIa : nuclear inclusion a protein;

Nib : nuclear inclusion b protein (RNA polymerase); CP : coat protein (Colinet *et. al.*

1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียม PCR mix ประกอบด้วย 2 x buffer 12.5 ไมโครลิตร primer 1 ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ primer 2 ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร โดยใช้ น้ำ 1.5 ไมโครลิตร และ Superscript III RT 1 ไมโครลิตร ใส่หลอด PCR ไมโครทิวป์ ได้ปริมาณรวม 15 ไมโครลิตร ผสม TemplateRNA 10 ไมโครลิตร (total RNA) ที่แยกสกัดได้จากตัวอย่างใบพืชแล้วนำเข้าสู่เครื่อง PCR ต่อไป

3.1.8.2 การเตรียม cDNA โดยการใช้ Superscript[™] III First-Strand Synthesis System for RT-PCR

โดยการเตรียม primermix โดยผสม TemplateRNA 5 ไมโครลิตร Reverse primer ความเข้มข้น 5 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTP mix 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ DEPC - treated water ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดย briefly centrifuge นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้น แช่น้ำแข็งทันทีอย่างน้อย 1 นาที จากนั้นทำการเตรียม cDNA Synthesis MIX โดยการผสม 10 x RT Buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร MgCl₂ 25 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 4 ไมโครลิตร DTT 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร Rnase OUT[™] ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ SuperScript III RT ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยการใส่เรียงตามลำดับ ผสม primer mix กับ cDNA Synthesis mix โดยใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เท่ากันผสมโดยการ briefly centrifuge บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แช่น้ำแข็ง เติมน้ำ Rnase H 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.1.8.3 การเตรียม Platinum PCR supermix

โดยนำ cDNA ที่ทำการเตรียมเสร็จแล้วมาผสมกับ Platinum PCR supermix ของบริษัท Invitrogen โดยใช้ปริมาตรรวม 25.5 ไมโครลิตร การเตรียมใช้ PCR mix 22 ไมโครลิตร primer 1 ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร และ primer 2 ความเข้มข้น 0.05 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร Template cDNA 5 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอด PCR microtube แต่ละหลอดเตรียมเข้าเครื่อง PCR

3.1.8.4 การใส่หลอด PCR microtube ลงในเครื่อง Programable DNA Thermal Cycle ตามเงื่อนไขดังนี้

โปรแกรม PCR ของ เชื้อ CMV (cucumber mosaic virus)

55 องศาเซลเซียส 30 นาที	
94 องศาเซลเซียส 2 นาที	1 รอบ
94 องศาเซลเซียส 15 วินาที	} 40 รอบ
57,62, 67 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
72 องศาเซลเซียส 10 นาที	1 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรแกรม PCR ของ เชื้อ potyvirusgroup

94 องศาเซลเซียส 15 นาที	1 รอบ
94 องศาเซลเซียส 45 วินาที	} 40 รอบ
45 ,51.5 ,56.2, 60.9, 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส 2 นาที	
72 องศาเซลเซียส 10 นาที	1 รอบ

โปรแกรม PCR ของ เชื้อ cowpea aphid borne(1,2)

94 องศาเซลเซียส 2 นาที	1 รอบ
94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	} 40 รอบ
55 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
72 องศาเซลเซียส 5 นาที	1 รอบ

โปรแกรม PCR ของ เชื้อ cowpea aphid borne(3,4)

94 องศาเซลเซียส 2 นาที	1 รอบ
94 องศาเซลเซียส 30 วินาที	} 40 รอบ
50 องศาเซลเซียส 30 วินาที	
72 องศาเซลเซียส 1 นาที	
72 องศาเซลเซียส 5 นาที	1 รอบ

3.1.8.5 การใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก RT-PCR product ของเชื้อไวรัส (eletrophoresis)

เตรียม eletrophoresis buffer โดยใช้ TBE buffer (50x) ซึ่งประกอบ ด้วย Tris 242 กรัม, glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร และ 0.5 M EDTA (pH 8.0) 100 มิลลิลิตร ต่อ ลิตร โดยใช้ TBE buffer (10x) 50 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 450 มิลลิลิตร แล้วใช้ 50 มิลลิลิตร สำหรับ เตรียม agarose gel 0.8 เปอร์เซ็นต์ คนให้ละลายแล้วนำส่วนผสมดังกล่าวไปหลอมละลายด้วยเตาไมโครเวฟจนเป็นเนื้อเดียวกันไม่ควรให้เดือดเพราะจะเกิดการระเหยทำให้ปริมาตรเปลี่ยนแปลงไป หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้อุ่นพอดีที่สามารถจับด้วยมือเปล่าได้จึงนำไปเทในเจลแอมเบอร์ ก่อนเทเจลลงในเจลแอมเบอร์ ใส่หัวโดยให้ปลายหัวอยู่สูงจากฐานประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วเท agarose ที่อุ่นลงไป ทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวจึงค่อยๆ คึงหัวออก ถึงขั้นตอนนี้จะได้ agarose ที่มีหลุมสำหรับหยอดสารละลายดีเอ็นเอที่ต้องการแยกก่อนที่จะหยอดสารตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลุมที่เตรียมไว้ เท buffer ลงไปให้ท่วมเจลสูงประมาณ 1-3 มิลลิเมตร เตรียม loading dye ที่เข้มข้นประมาณ 10 เท่า ผสมกับ ethidium bromide

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร เมื่อต้องการใช้จะผสมกับดีเอ็นเอในอัตราส่วน 1:5 แล้วนำไปหยดลงในหลุมบน agarose ที่เตรียมไว้แต่ละหลุม โดยมีดีเอ็นเอมาตรฐานอยู่ด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้านของถาดเจลเช่นเดียวกันกับ positive และ negative control เปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าคงที่ประมาณ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 50 นาที แล้วนำถาดเจลไปตรวจสอบภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel Photodocumentation System ซึ่งสามารถมองเห็นแถบสีของดีเอ็นเอซึ่งเคลื่อนที่ไปจากขั้วลบไปยังขั้วบวก แล้วจากนั้นทำการบันทึกภาพและนำไปวิเคราะห์ผล

การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยใช้เทคนิค RT-PCR นำมาใช้ในการจำแนกเชื้อ CMV ในใบถั่วฝักยาว ใบแตงกวา ใบวชิช ใบพืชร้างเคียง ที่แสดงอาการของโรคไวรัสในแปลงปลูก นอกจากนี้ใช้ในการทดสอบเชื้อไวรัสที่ถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาว โดยทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ primer ในปฏิกิริยา PCR โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 57, 62 และ 67 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ PCR product ของเชื้อ CMV ถูกนำไปศึกษา subgroup ของเชื้อ โดยการย่อยด้วย enzyme EcoRI และ enzyme MspI จากบริษัท Invitrogen

ในกรณีการตรวจสอบเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup โดยเริ่มด้วยการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ degenerate primer Pot1 และ Pot2 ในปฏิกิริยา PCR โดยการทำการ gradient temperature ทดสอบที่อุณหภูมิ 45, 51.5, 56.2, 60.9 และ 65 องศาเซลเซียส ก่อนนำผลของ อุณหภูมิที่เหมาะสมมาใช้ในการจำแนกเชื้อต่อไป

ในกรณีการตรวจสอบเชื้อไวรัส cowpea aphid-borne virus โดยใช้ primer 2 ชุด ดังกล่าวข้างต้นพร้อมทั้งทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของปฏิกิริยา PCR โดยการทำการ gradient temperature ทดสอบที่อุณหภูมิ 45, 49, 53.8, 58.6, 63.1 และ 65 องศาเซลเซียส

3.1.9 การตรวจสอบด้วยเครื่อง real time PCR

การตรวจสอบด้วย real time PCR โดยใช้เครื่อง CHROMO 4 Real – Time PCR ของบริษัท ชีระเทคดิงส์ ใช้น้ำยา Quantitect SYBR® Green ปริมาตร 12 ไมโครลิตร และใช้ degenerate primer Pot1(5'ATTBTCDATRCACCA 3') และ degenerate primer Pot2 (5' TGYGAYGCBGATGGY TC 3') ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ Template cDNA 10 ไมโครลิตร ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วฝักยาว น้ำ 2 ไมโครลิตร โดยการศึกษา gradient temperature ที่อุณหภูมิที่ 38, 42, 45 และ 50 องศาเซลเซียส และใช้ตัวอย่างของเชื้อไวรัส passionfruit เป็น positive control

โปรแกรม real time PCR ของ เชื้อ potyvirusgroup

94 องศาเซลเซียส 15 นาที	}	1 รอบ
94 องศาเซลเซียส 45 วินาที		40 รอบ
38, 42 ,45, 50 องศาเซลเซียส 30 วินาที		
72 องศาเซลเซียส 2 นาที		
72 องศาเซลเซียส 10 นาที		1 รอบ

3.1.10 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ในการแพร่ระบาดเชื้อไวรัสในแปลงปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาว

โดยนำข้อมูลจากการศึกษาทั้งหมดมาหาความสัมพันธ์ โดยเฉพาะในแง่ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายรวมทั้งในแตงกวาและถั่วฝักยาว สิ่งมีชีวิตที่เป็นพาหะ รวมทั้งแมลง ใต้ดินฝอยในดิน วัชพืช และพืชข้างเคียง ซึ่งอาจเป็นพืชอาศัยที่ดีของเชื้อทำให้เป็นแหล่งสะสมเชื้อไวรัสที่จะเข้าทำลาย แตงกวาหรือถั่วฝักยาวในรุ่นต่อไป การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแปลงปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวนี้จะเป็นประโยชน์ในการป้องกันกำจัดโดยการตัดวงจรของเชื้อและโรคที่สัมพันธ์กัน เป็นการลดการแหล่งสะสมเชื้อหรือเป็นการลดพาหะของเชื้อ

3.2 สถานที่ทำการทดลอง

3.3.1 ห้องปฏิบัติการโรคพืชวิทยา ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3.2 โรงเรือนเพาะเลี้ยงของภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3.3 ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3.4 ห้องปฏิบัติการ ADB คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.3.5 ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง) สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

3.3 ระยะเวลาในการทดลอง

2 ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสำรวจโรคไวรัสในแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกสลับในพื้นที่เดียวกัน

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างใบถั่วฝักยาว และใบแตงกวาที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส จากแปลงปลูกที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกันภายหลังการทำนาของเกษตรกรในท้องที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี โดยทำการสำรวจตลอดทั้งปีสลับแปลงปลูกหมุนเวียนไป และทำการบันทึกลักษณะอาการ พบ ว่ามีถั่วฝักยาวที่แสดงอาการของโรคไวรัส 7 ลักษณะอาการ (ภาพที่ 4.1) ได้แก่

- 1) อาการเขียวเข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อนแผลพอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง
- 2) อาการใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้มเกือบหมด ใบพอง พื้นใบบางส่วนสีเหลือง แทรกอยู่ตามเส้นใบ

- 3) อาการเส้นใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและเส้น ใบพื้นใบสีเขียวอ่อน
- 4) อาการอาการ ค้างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วใบและเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้นแคระแกร็น
- 5) อาการ ใบเรียวยาวเล็ก ผิดรูปร่าง
- 6) อาการค้างเขียวตามเส้นใบและขอบใบโค้งลง
- 7) อาการยอดแตกพุ่มแฉ่

และพบว่าในแตงกวาพบอาการของโรคไวรัส 3 ลักษณะอาการ (ภาพที่ 4.2) ได้แก่

- 1) อาการค้างเหลืองกระจายทั่วใบ
- 2) อาการค้างเหลืองตามเส้นใบพื้นใบสีเหลือง
- 3) อาการจุดพองสีเขียว กระจายทั่วใบ พื้นใบสีเหลืองอ่อน

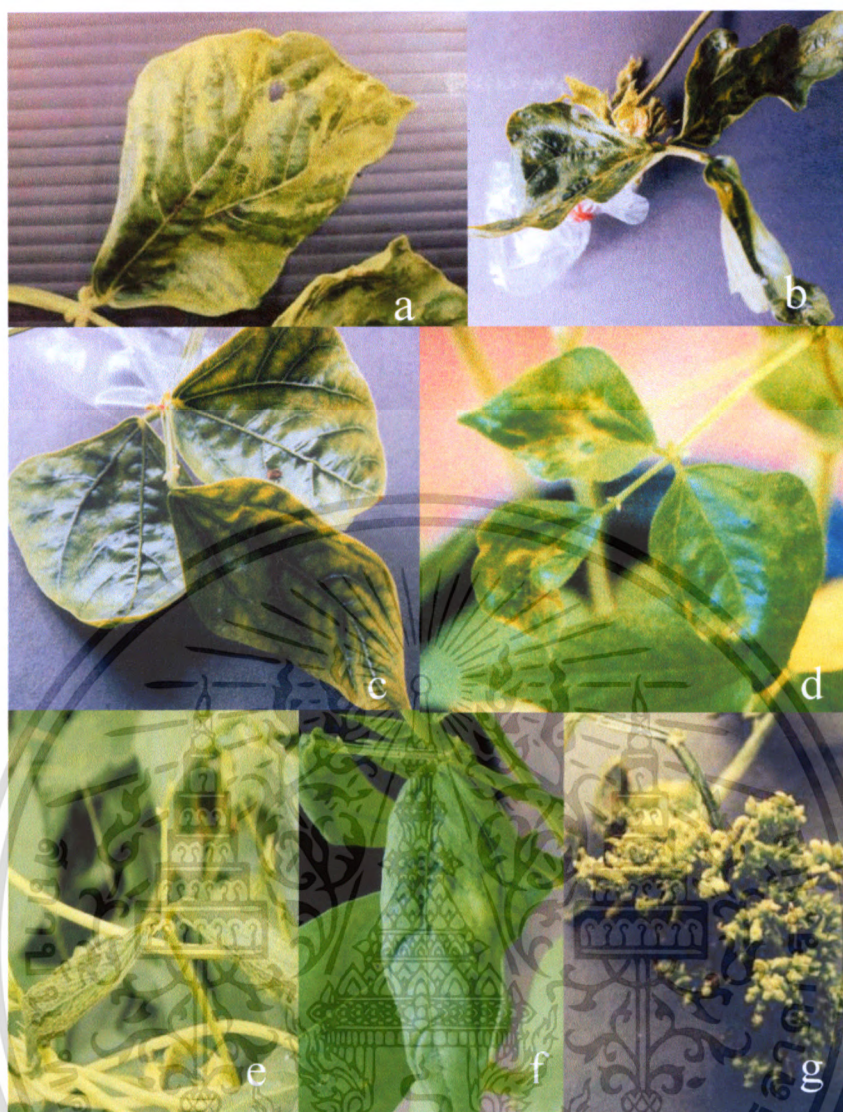
การถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Mechanical sap transmission ของถั่วฝักยาวที่แสดงอาการ เป็นโรคไวรัส ลงบนใบเลี้ยงคู่แรกของถั่วฝักยาวพบว่าถั่วฝักยาวจากตัวอย่างอาการที่ 1-6 สามารถถ่ายทอดได้ด้วยน้ำคั้น ในขณะที่ตัวอย่างอาการที่ 7 ไม่สามารถถ่ายทอดได้ด้วยน้ำคั้น ส่วนแตงกวาในทุกตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคไวรัสพบว่า สามารถถ่ายทอดด้วยวิธี Mechanical sap transmission ลงบนใบเลี้ยงคู่แรกของแตงกวาได้ โดย อาการที่ 1-3 ของแตงกวาเมื่อทำการถ่ายทอดเชื้อปรากฏอาการเหมือนกัน (ภาพที่ 4.2) ผลของความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้นใบ ถั่วฝักยาวที่เป็นโรคจึงนำเอา isolate ของถั่วฝักยาวจากตัวอย่างอาการที่ 1-6 และ isolate ของแตงกวาจาก 1 ตัวอย่าง มาทำการศึกษาชนิดของเชื้อในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบพืชอาศัยโดยการนำตัวอย่างของถั่วฝักยาวตัวอย่างที่ 1 - 6 มาทำการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ *Chenopodium amaranticolor* หลังจากนั้นประมาณ 2 สัปดาห์พบว่า *Chenopodium amaranticolor* ที่ทำการปลูกเชื้อไวรัสโดยตัวอย่างที่ 1 แสดงอาการ ค้างตามเส้นใบและอาการจุด

แปลแห่งคายนใบปลุกเชื้อ ตัวอย่างที่ 2 แสดงอาการ จุดเหลืองจากนั้นเปลี่ยนเป็นแดงบนใบที่ปลุกเชื้อ ตัวอย่างที่ 3 แสดงอาการค่างตามเส้นใบและอาการจุดแปลแห่งคายนใบปลุกเชื้อ ตัวอย่างที่ 4 แสดงอาการจุดแปลแห่งคายนขอบแปลสีแดงบนใบปลุกเชื้อ ตัวอย่างที่ 5 แสดงอาการจุดแปลแห่งคายนขอบแปลสีแดงบนใบปลุกเชื้อ ตัวอย่างที่ 6 แสดงอาการค่างตามเส้นใบและอาการจุดแปลแห่งคายนใบปลุกเชื้อ (ภาพที่ 4.3)



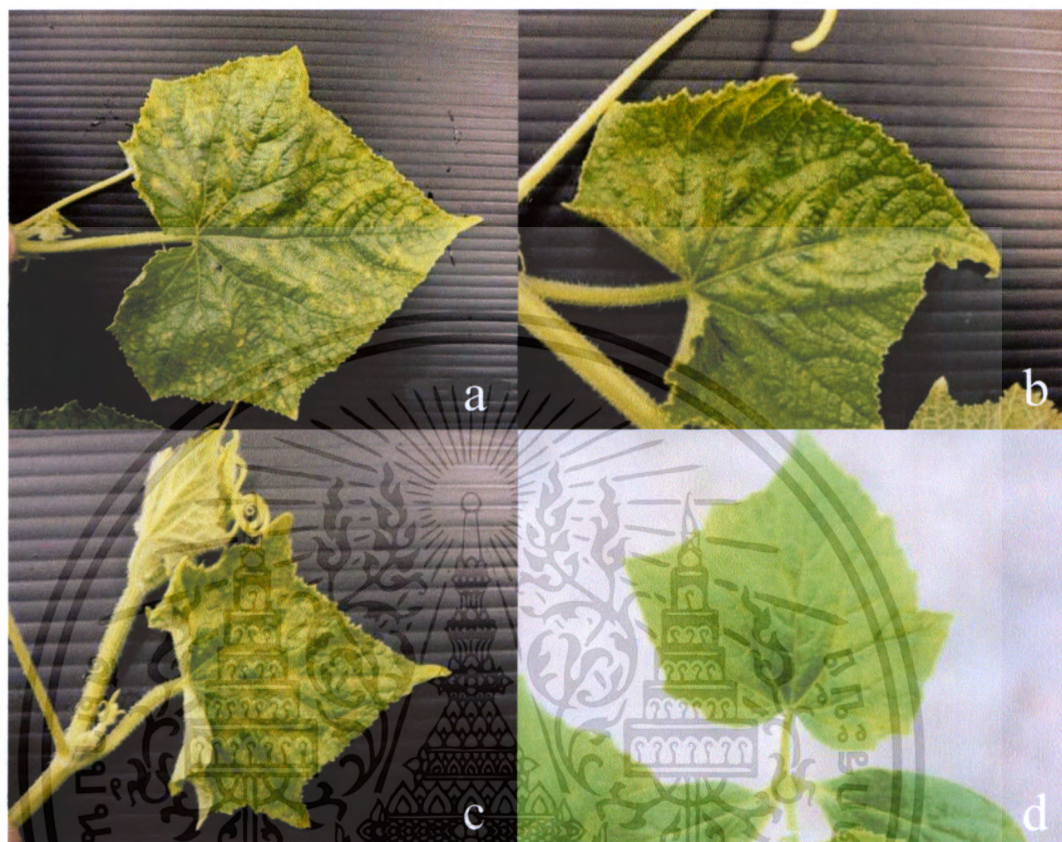
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 อาการ โรคไวรัสบนใบถั่วฝักยาวจากการสำรวจ

- a) อาการที่ 1 แสดงลักษณะอาการเขียวเข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อนแปลบอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง
- b) อาการที่ 2 แสดงลักษณะอาการใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้ม เกือบหมด ใบพอง พื้นใบบางส่วนสีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ
- c) อาการที่ 3 แสดง ลักษณะอาการเส้นใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและเส้นใบพื้นใบสีเขียวอ่อน
- d) อาการที่ 4 แสดงลักษณะอาการ ค่างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วใบและเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้นแคะแกร็น
- e) อาการที่ 5 แสดงลักษณะอาการ ใบเขียวเล็ก ผิดรูปร่าง
- f) อาการที่ 6 แสดงอาการค่างเขียวตามเส้นใบขอบใบโค้งลง
- g) อาการที่ 7 แสดงลักษณะอาการยอดแตกพุ่มแจ้

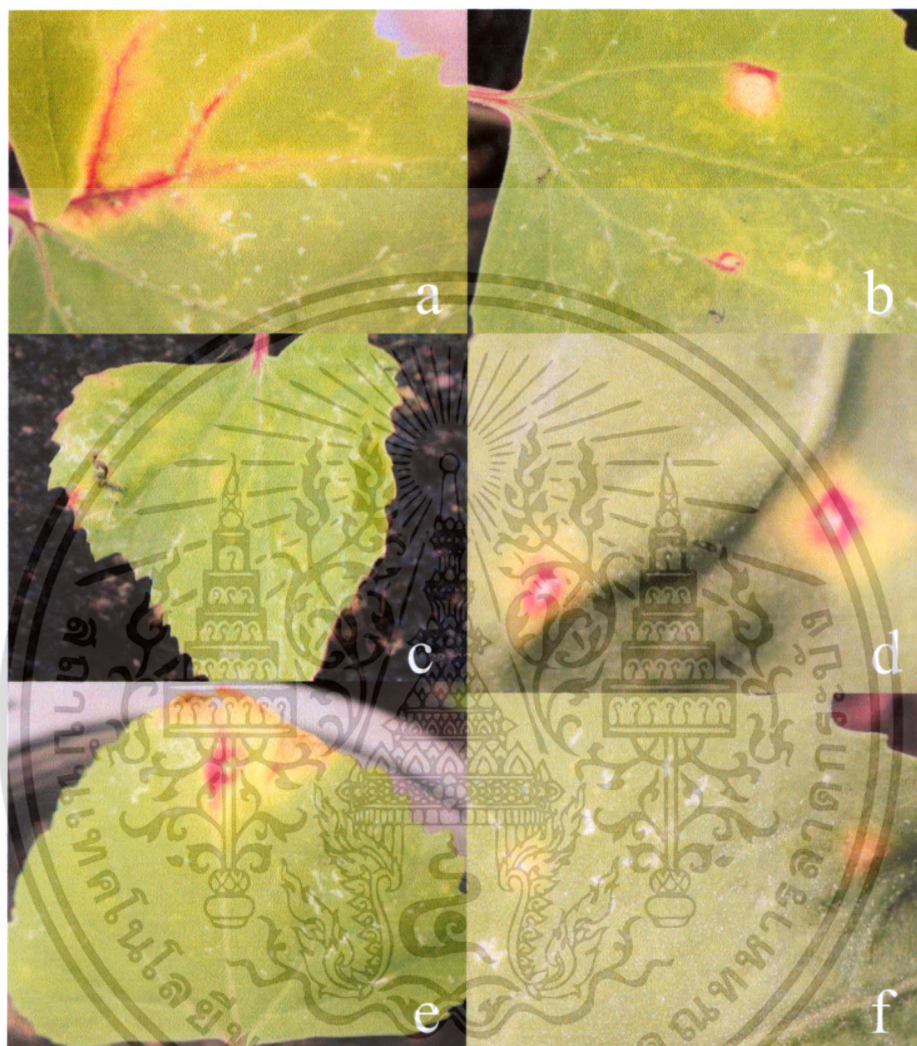
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 อาการโรคไวรัสบนใบแตงกวาจากการสำรวจและการถ่ายทอดเชื้อจากน้ำคั้น

- a) อาการที่ 1 แสดงลักษณะอาการ ค้างเหลืองกระจายทั่วใบ
- b) อาการที่ 2 แสดงอาการ ค้างเหลืองตามเส้นใบ พื้นใบสีเหลือง
- c) อาการที่ 3 แสดงลักษณะอาการ จุดพองสีเขียว กระจายทั่วใบ พื้นใบสีเหลืองอ่อน
- d) อาการใบต่างบนแตงกวาภายหลังการถ่ายทอดเชื้อจากน้ำคั้นจากใบแตงกวาที่เป็นโรค จากใบแตงกวาอาการที่ 1 - 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ผลการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวเป็น โรคสู่ต้น *Chenopodium amaranticolor*.

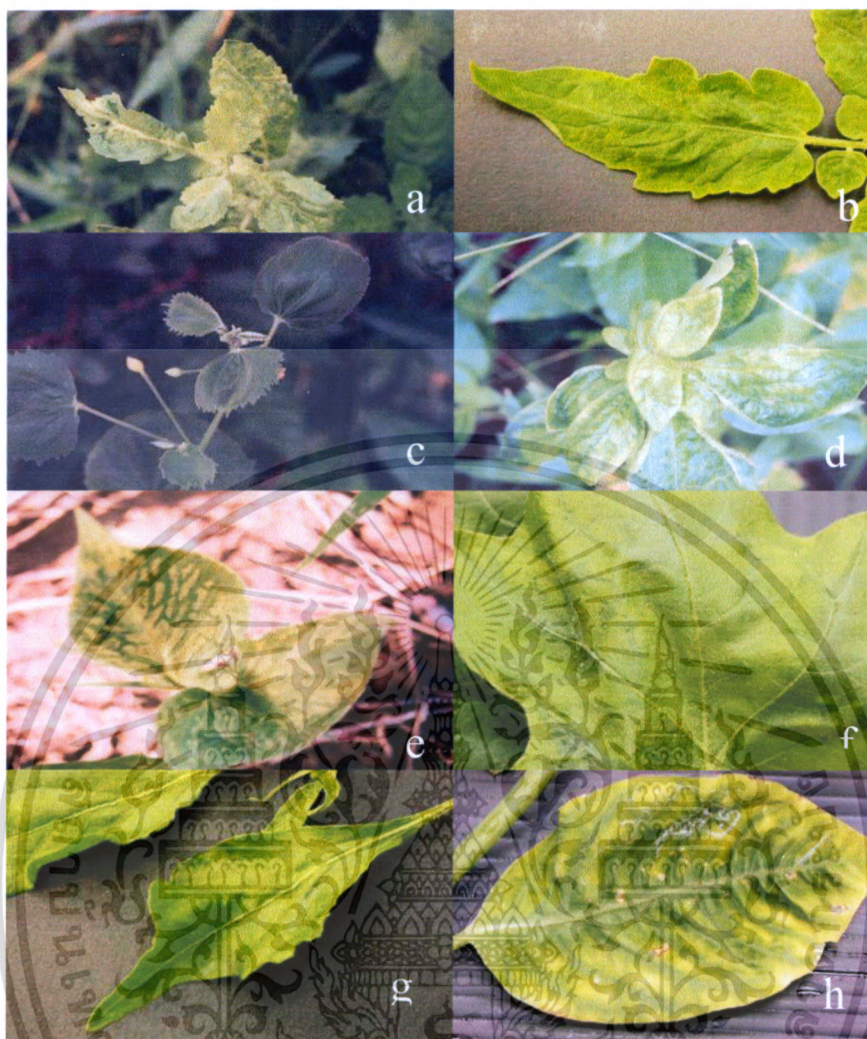
- a) และ b) เชื้อตัวอย่างที่ 1 ปรากฏอาการต่างตามเส้นใบและอาการจุดแผลแห้งตายบนใบปลูกเชื้อ
- c) เชื้อตัวอย่างที่ 2 ปรากฏอาการจุดเหลืองจากนั้นเปลี่ยนเป็นแดงบนใบที่ปลูกเชื้อ
- d) และ e) เชื้อตัวอย่างที่ 3 และ ตัวอย่างที่ 6 ปรากฏ อาการต่างตามเส้นใบและอาการจุดแผลแห้งตายบนใบปลูกเชื้อ
- f) เชื้อตัวอย่างที่ 4 และ ตัวอย่างที่ 5 อาการจุดแผลแห้งตายขอบแผลสีแดงบนใบปลูกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การสำรวจแมลงพาหะ วัชพืชและพืชใกล้เคียงที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างวัชพืชและพืชใกล้เคียงที่พบว่าแสดงอาการของโรคไวรัสใน ทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบวัชพืชและพืชข้างเคียง ได้แก่ อุดพิษ (*Typhonium trilobatum* Schott.) แสดงอาการค้างเขียวร่วงแห ผักขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.) แสดงอาการค้างเป็นจุด เหลืองอ่อน หญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* L.) แสดงอาการค้างสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ใบผิดรูป ผักเสี้ยน (*Cleome gynandra* L.) แสดงอาการค้างเหลืองอ่อนใบบิดเบี้ยว ผักแครด (*Synedrella nodiflora* L.) แสดงอาการค้างสีเขียวตามเส้นใบ โหระพา (*Ocimum basilicum*) แสดง อาการค้างเหลืองใบบิดเบี้ยว แมงลัก (*Ocimum canum* L.) แสดงอาการค้างเหลืองใบบิดเบี้ยว กะเพรา (*Ocimum sanctum*) แสดงอาการค้างเหลืองกระจายทั่วใบ ครอบจักรวาล (*Abutilon hirtum*) แสดงอาการใบลีบเล็ก มะเขือพวง (*Solanum torvum*) แสดงอาการค้างเขียวอ่อนใบผิดรูปเล็กน้อย มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) แสดงอาการค้างเขียวเข้มใบเป็นคลื่น พริก (*Capsicum frutescens* L.) แสดงอาการค้างเขียวอ่อนใบมีขนาดเล็ก ใบผิดรูป (ภาพที่ 4.4)

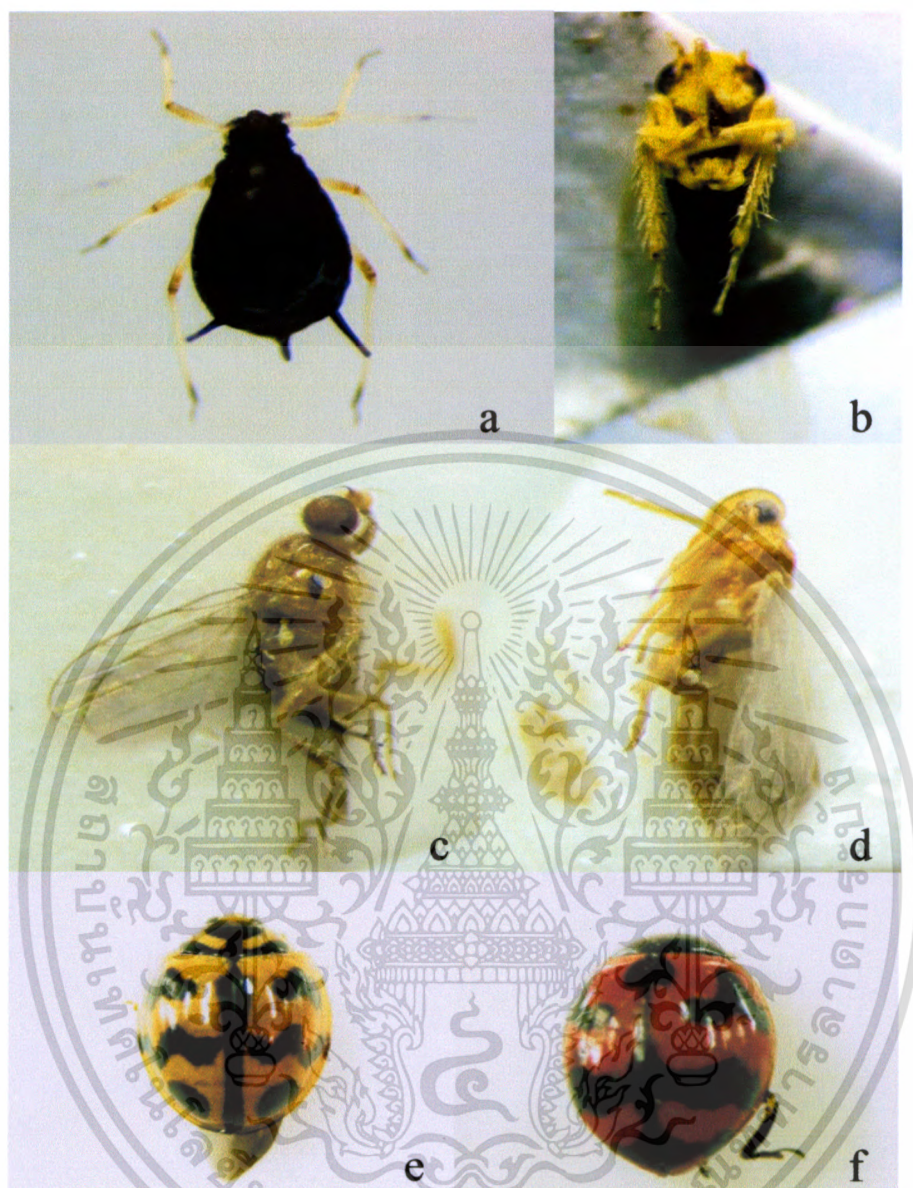
จากการสำรวจแมลงโนแปลงปลุกกล้วยฝักยาวและแดงกวาที่ปลุกสลักกันในพื้นที่เดียวกัน และบริเวณรอบๆ แปลงปลูกในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบแมลงได้แก่ แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis gossypii*) เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ (*Myzus persicae*) เพลี้ยจักจั่นสีเขียว (*Nephotettix virescens*) เพลี้ยกระโดด (*Nilaparvata lugens*) ตั๊กแตน (*Cyrtacanthacris tatarica*) ค้างคาว (*Micraspis* sp.) (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.4 อาการของโรคไวรัสบนวัชพืชและพืชข้างเคียง

- a) ใบด่างเหลือง ใบผิดรูปร่าง บนใบกะเพรา (*Ocimum sanctum*)
- b) ด่างเขียว ใบเป็นคลื่น บนใบมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*. Mill.)
- c) ใบเล็ก บนใบครอบจักรวาล (*Abutilon hirtum* (Lam.) Sweet)
- d) ด่างสีเขียวอ่อนสลับเข้มใบผิดรูป บนผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.)
- e) ด่างเขียวร่างแห บนใบอุตพิษ (*Typhonium trilobatum* Schott.)
- f) อาการด่างเขียวอ่อน กระจายทั่วใบ บนใบมะเขือพวง (*Solanum Torvum* Sw.)
- g) อาการด่างสีเขียวอ่อน ใบผิดรูปร่าง ใบเล็กลง บนใบพริก (*Capsicum frutescens* L.)
- h) อาการด่างเขียวเข้มตามเส้นใบ ใบมีลักษณะเป็นคลื่น ใบผิดรูป บนใบหญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* L.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ชนิดของแมลงที่สำรวจพบในแปลงปลูกตลอดปี

- a) เพลี้ยอ่อน (*Aphis gossypii*)
- b) เพลี้ยจักจั่นสีเขียว (*Nephotettix virescens*)
- c) แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*)
- d) เพลี้ยกระโดด (*Nilaparvata lugens*. Stal.)
- e) และ f) คีวงเต่า (*Micraspis* sp.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตรวจสอบด้วยวิธีการทาง เซรุ่มวิทยา

การตรวจสอบทาง Serology ด้วยวิธีการทาง ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) แบบ indirect โดยใช้เซรุ่มของเชื้อในกลุ่ม Geminivirus และ TYLCV ตรวจสอบเชื้อไวรัส พบว่าตัวอย่างถั่วฝักยาวทุกตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลัดที่ทำการสำรวจทุกฤดู ตลอดทั้งปี ไม่พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirus และ TYLCV แต่ในแตงกวาทุกตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลัดที่ทำการสำรวจทุกฤดูตลอดทั้งปี พบเชื้อไวรัสเป็นสมาชิกในกลุ่ม Geminivirus ทุกตัวอย่าง แต่ไม่ใช่เชื้อไวรัส TYLCV

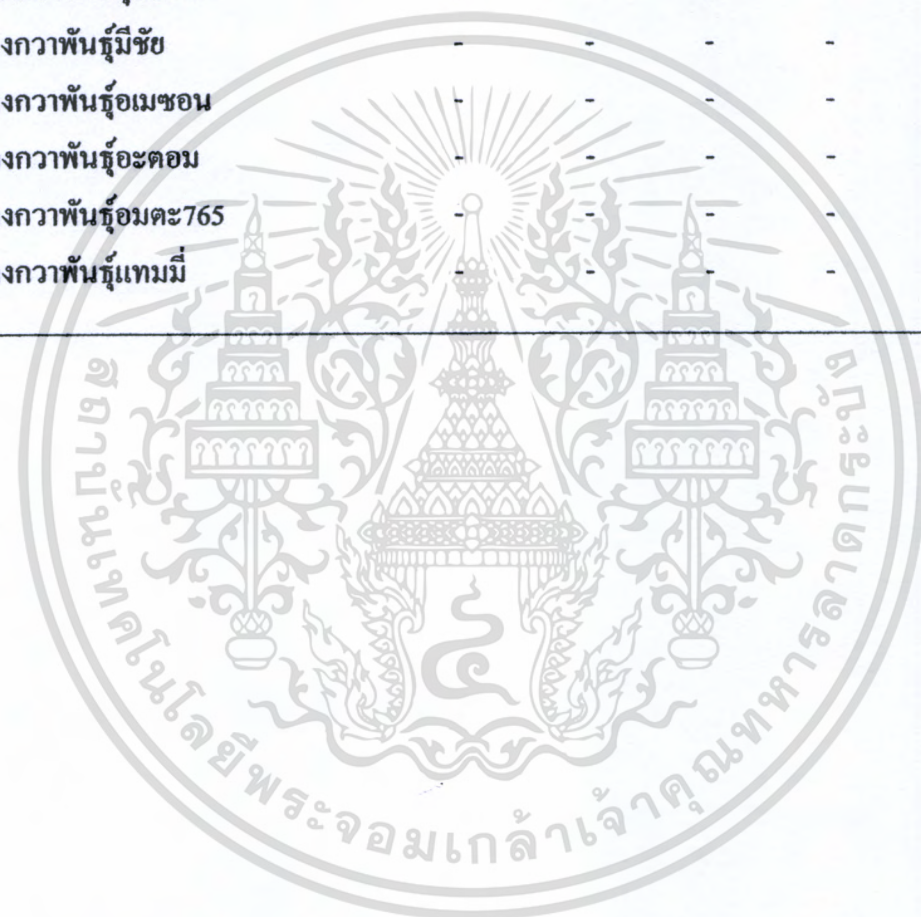
การตรวจสอบเชื้อ cucumber mosaic virus ในถั่วฝักยาวและแตงกวาที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลัด ที่ทำการเก็บตัวอย่างทุกฤดู ตลอดทั้งปี พบเชื้อ cucumber mosaic virus ในทุกตัวอย่างของถั่วฝักยาวและแตงกวา

4.4 การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด (seed transmission)

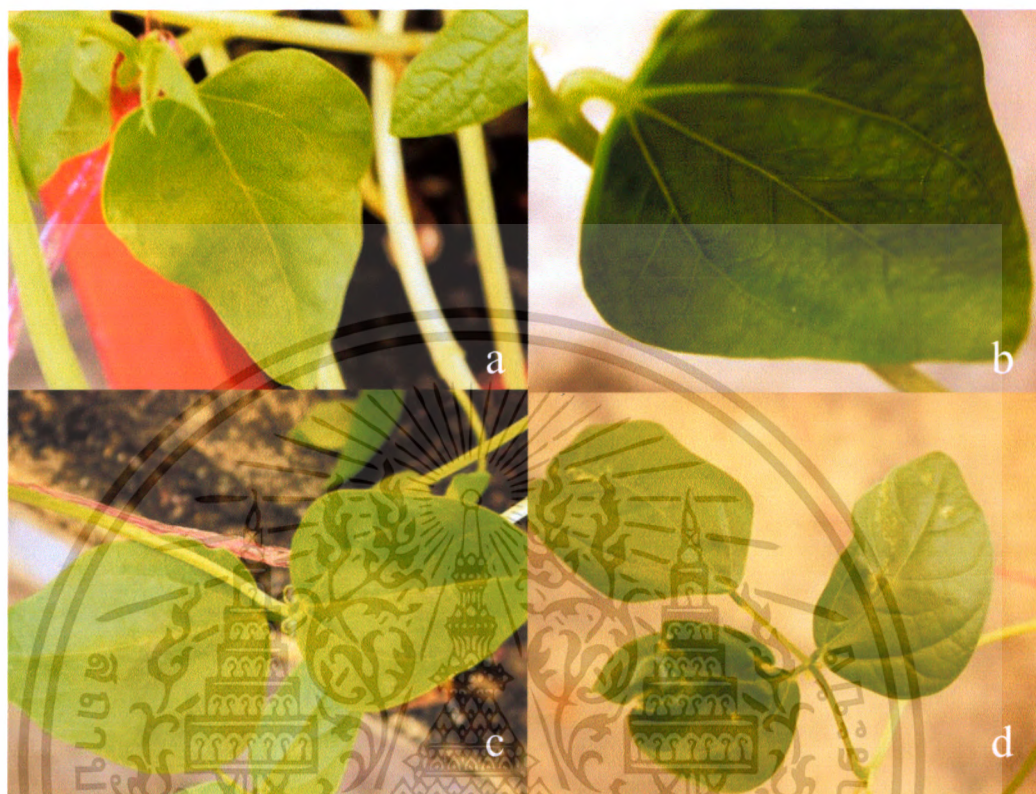
การตรวจสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวและแตงกวาที่มีจำหน่ายในท้องตลาด อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรีอย่างละ 5 พันธุ์ดังนี้ พันธุ์ถั่วฝักยาว ได้แก่ พันธุ์ขุนศึกNo.7 พันธุ์สมบุญมโหศNo.99 พันธุ์ไผ่ขวาง005 พันธุ์ถั่วน้ำชี พันธุ์BIG 1 และ พันธุ์แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มีชัย พันธุ์เมซอน พันธุ์อะคอม พันธุ์อมตะ765 พันธุ์แทมมี โดยการนำเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวพันธุ์ละ 200 เมล็ดมาปลูกในดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ และนำกระถางที่เพาะเมล็ดมาเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง รดน้ำเข้าเย็น สังเกตการงอกและการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ถั่วฝักยาวเริ่มแสดงอาการของโรคไวรัส และในเวลา 4 สัปดาห์ อาการที่ปรากฏมีความแตกต่างกัน 4 ลักษณะอาการ ได้แก่ อาการใบด่างเป็นปื้นเล็กๆตามด้วยอาการเหลืองทั้งใบก่อนที่จะหลุดร่วง อาการด่างเขียวเป็นร่างแหตามเส้นใบ อาการแผลจุดสีเขียวอ่อนกระจายบนใบ ซึ่งอาการทั้ง 3 ลักษณะนี้พบบนใบแก่คู่แรก และเมื่อต้นถั่วมีการเจริญเป็นใบ trifoliolate ก็ไม่ปรากฏอาการดังกล่าว ส่วนอาการจุดเหลืองบนใบเส้นใบห่อหุ้มทำให้ใบบิดเบี้ยว พบปรากฏบนใบ trifoliolate คู่แรกเท่านั้น (ภาพที่4.6) ในขณะที่ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสบนแตงกวาพันธุ์ต่างๆ เปอร์เซ็นต์ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทางเมล็ดพันธุ์ของถั่วฝักยาวและแตงกวาดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เปรอ์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดของถั่วฝักยาวและแตงกวา ทั้ง 5 พันธุ์

เมล็ดพันธุ์พืช	เมล็ดที่แสดงอาการโรคไวรัสคิดเป็น%				
	ใบค้าง	ใบลาย	ใบหยัก	แผลจุด	รวม
ถั่วฝักยาวพันธุ์ขุนศึกNo.7	10	0.5	-	-	10.5
ถั่วฝักยาวพันธุ์สมบูรณ์โชคNo.99	-	0.5	-	2	2.5
ถั่วฝักยาวพันธุ์ไข่ขวาง005	3.5	1	5	-	9.5
ถั่วฝักยาวพันธุ์ลำน้ำชี	0.5	-	-	0.5	1
ถั่วฝักยาวพันธุ์BIG 1	3	-	2	-	5
แตงกวาพันธุ์มีชัย	-	-	-	-	0
แตงกวาพันธุ์เมฆอน	-	-	-	-	0
แตงกวาพันธุ์อะดอม	-	-	-	-	0
แตงกวาพันธุ์อมตะ765	-	-	-	-	0
แตงกวาพันธุ์แทมมี	-	-	-	-	0



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 อาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดผ่านทางแมลงด้วงฝักยาว

- a) อาการใบด่างเขียวเป็นปื้น ก่อนที่จะทำให้ใบเหลืองทั้งใบและร่วง
- b) อาการด่างเขียวเป็นร่างแหตามเส้นใบ
- c) อาการแผลจุดสีเขียวอ่อนกระจายทั่วใบ
- d) อาการจุดเหลืองบนใบ เส้นใบหยุด ใบบิดเบี้ยว

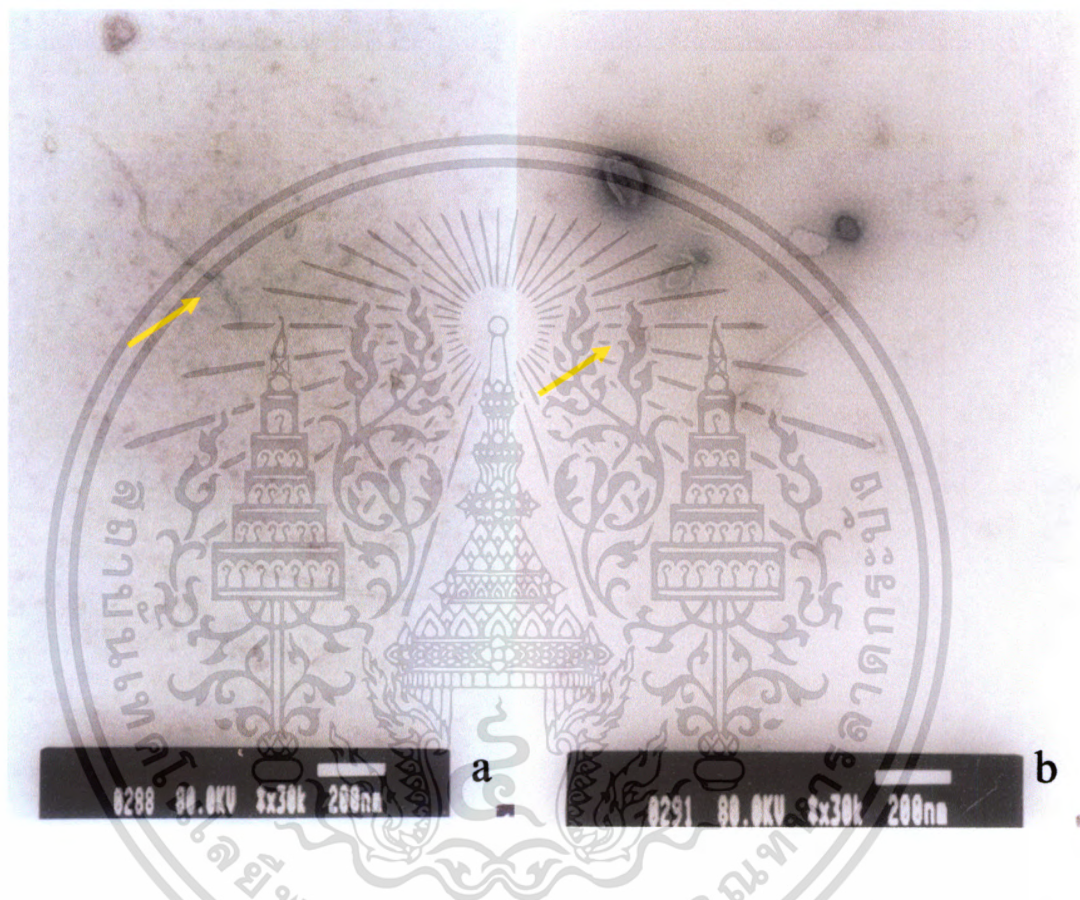
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การศึกษาการถ่ายทอดโดยไส้เดือนฝอย (nematode transmission)

การศึกษาการถ่ายทอดทางดิน โดยไส้เดือนฝอยทำโดยการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูก ถั่วฝักยาวและแตงกวา ที่แสดงอาการของเชื้อไวรัส โดยการสุ่มเก็บจากบริเวณรอบๆ โคนต้นของพืช ในแปลงที่แสดงอาการของโรคไวรัสที่ความลึกประมาณ 30 เซนติเมตร แปลงละ 30 จุด (พื้นที่ 1 ไร่) และนำดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกมาผสมรวมกันแล้วจึงมาใส่ในกระถางที่เตรียมไว้ ก่อนนำเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวพันธุ์ดำน้ำชี และแตงกวาพันธุ์อมตะ 765 อย่างละ 200 เมล็ด ต่อ ตัวอย่างดิน 1 กระถาง นำกระถางที่เพาะเมล็ดไปเก็บในโรงเรือนกันแมลงรศน้ำเข้าเย็น สังเกตการ งอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดอย่างต่อเนื่อง แล้วทำการตรวจสอบเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่า เมล็ดที่งอกขึ้นมาไม่แสดงอาการของโรคไวรัส และเพื่อยืนยันผลนี้จึงมีการทำ back test โดยนำ ใบถั่วฝักยาวและใบแตงกวาที่ไม่มีอาการของโรคไวรัสไปทำการปลูกเชื้อโดยวิธี mechanical sap transmission ผู้ต้นกล้าถั่วฝักยาวและแตงกวาและสังเกตอาการอีก 4 สัปดาห์ไม่ปรากฏอาการของ โรคไวรัสในพืชที่ทำการปลูกเชื้อเลย แสดงว่าเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในแปลงปลูกทั้งในถั่วฝักยาว และแตงกวาไม่ถ่ายทอดในดิน

4.6 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope)

การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ของอาการถั่วฝักยาว 4 อาการที่สำรวจพบ ได้แก่ อาการที่ 1 ลักษณะอาการเขียวเข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อน แผลพอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง ลักษณะอนุภาคที่ตรวจพบเป็นแบบ flexuous ขนาดประมาณ 648.51 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.7 a) อาการที่ 2 ลักษณะอาการใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้มเกือบหมด ใบพอง พื้นใบบางส่วน สีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ ลักษณะอนุภาคที่ตรวจพบเป็นแบบ flexuous ขนาดประมาณ 600.89 นาโนเมตร อาการที่ 3 ลักษณะอาการเส้นใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและเส้นใบพื้นใบสีเขียวอ่อน ลักษณะอนุภาคที่ตรวจพบเป็นแบบ flexuous และ diameter ขนาดประมาณ 297.25 นาโนเมตร และ 30.38 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.7 b) อาการที่ 4 ลักษณะอาการค้างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่ว ใบและเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้นแคระแกร็น ลักษณะอนุภาคที่ตรวจพบเป็นแบบ flexuous ขนาด ประมาณ 648.06 นาโนเมตร



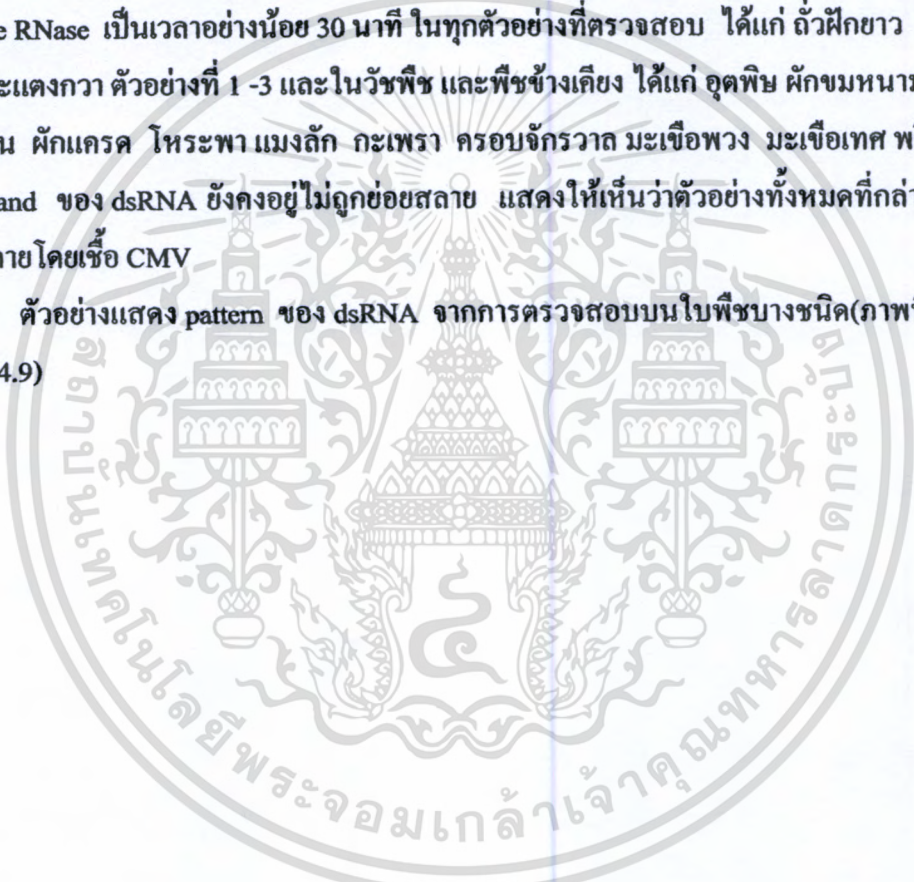
ภาพที่ 4.7 ลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเทคนิค leaf dip technique a) ลักษณะของอนุภาคของเชื้อไวรัสแบบ flexuous ที่ตรวจพบจาก อาการที่ 1 b) ลักษณะของอนุภาคของเชื้อไวรัสแบบ flexuous และ isometric ที่ตรวจพบจากอาการที่ 3

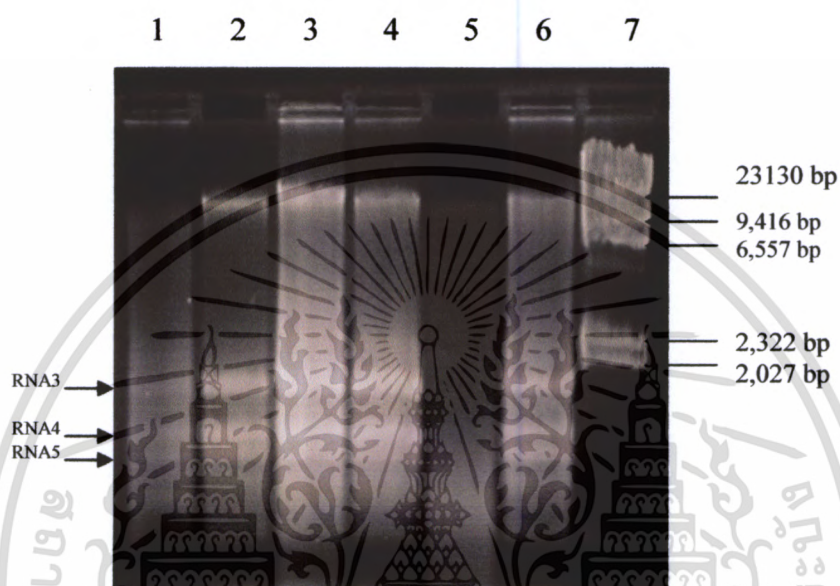
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.7 การตรวจสอบกรดนิวคลีอิกสายคู่เชื้อไวรัส (dsRNA detection)

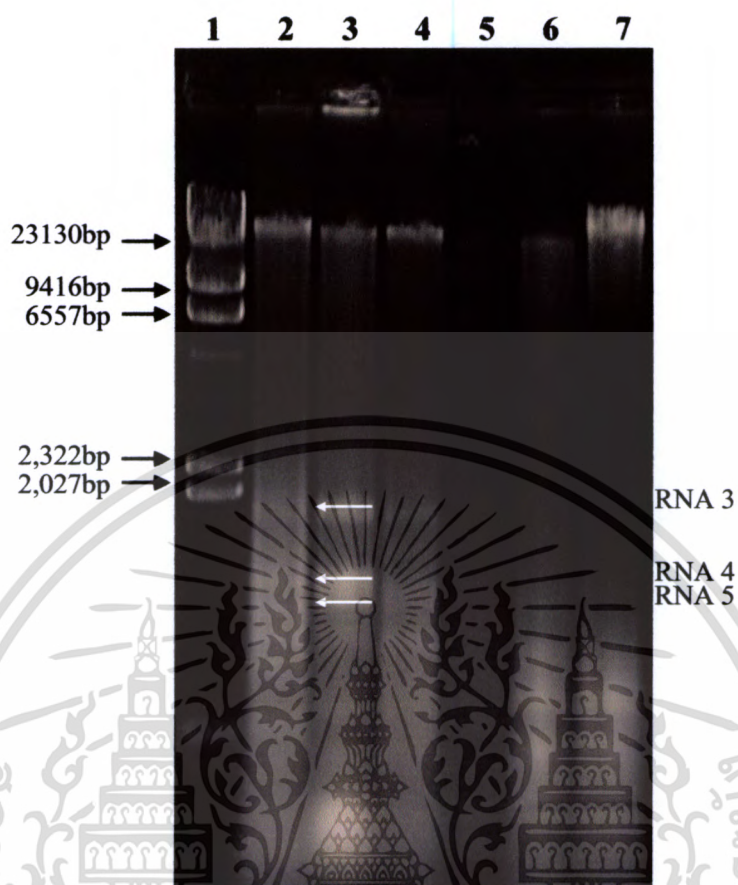
การตรวจสอบตัวอย่างของถั่วฝักยาวและแตงกวา พืชข้างเคียงและวัชพืช ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลัดที่ทำการเก็บตัวอย่างทุกฤดู ตลอดทั้งปี นำมาสกัดแยก dsRNA และแยกด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ผลโดยดูภายใต้กล้อง U.V. ผลการตรวจสอบพบว่า การแยกสกัด dsRNA ของทุกตัวอย่าง ทั้งถั่วฝักยาว แตงกวา พืชข้างเคียง และวัชพืช พบ band ซึ่งมีลักษณะและการเคลื่อนที่เหมือน band ของ dsRNA ของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) และเมื่อทำการตรวจสอบเพื่อยืนยันคุณสมบัติของ RNA สายคู่ (double stranded RNA ; dsRNA) โดยการ digest ด้วยการแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15 M ที่มี enzyme RNase เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที ในทุกตัวอย่างที่ตรวจสอบ ได้แก่ ถั่วฝักยาว ตัวอย่างที่ 1-6 และแตงกวา ตัวอย่างที่ 1 -3 และในวัชพืช และพืชข้างเคียง ได้แก่ อุดพืช ผักขมหนาม กระเม็ง ผักเสี้ยน ผักแครด โหระพา แมงลัก กะเพรา ครอบจักรวาล มะเขือพวง มะเขือเทศ พริก พบว่า แถบ band ของ dsRNA ยังคงอยู่ไม่ถูกย่อยสลาย แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้งหมดที่กล่าวมา มีการเข้าทำลายโดยเชื้อ CMV

ตัวอย่างแสดง pattern ของ dsRNA จากการตรวจสอบบนใบพืชบางชนิด(ภาพที่ 4.8 และ ภาพที่ 4.9)





ภาพที่ 4.8 patterns ของ dsRNA จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บรวบรวมจากแปลงปลูกตัวอย่างที่ 1-6 ภายหลังจาก digest โดยนำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15 M ที่มี enzyme RNase เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที Lane 1 – 6 = ถั่วฝักยาว จากแปลงปลูกตัวอย่างที่ 1-6 Lane 7 = lambda DNA Hind III double digest



ภาพที่ 4.9 pattern ของ dsRNA จากตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการของโรคไวรัสจากการเก็บรวบรวมในแปลงปลูก Lane 1 = lambda DNA Hind III double digest Lane 2 = ใบถั่วฝักยาว Lane = 3 ใบแตงกวา Lane = 4 มะเขือเทศ Lane 5 = ใบครอบครัววาล Lane 6 = ใบอุตพิษ lane 7 = พริก

4.8 การตรวจสอบด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

4.8.1 การตรวจสอบเชื้อ CMV ในตัวอย่างอ้วฝักยาว แดงกวา พืชข้างเคียง และวัชพืช

การตรวจสอบเชื้อ CMV ในตัวอย่างใบอ้วฝักยาว แดงกวา พืชข้างเคียง และวัชพืช โดยใช้ specific primer ของเชื้อ CMV ;

primer CMV 1 (reverse) (5'TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG3')

primer CMV 2 (forward) (5'GCCGTAAGCTGGATGGACAA3') มีขนาด PCR product 499 - 502 bp สำหรับ CMV subgroup II และขนาด 486-488 bp สำหรับ CMV subgroup I

4.8.1.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ primer ในปฏิกิริยา PCR โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 57 62 และ 67 องศาเซลเซียสพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 62 องศาเซลเซียสโดยที่อุณหภูมิดังกล่าวทำให้เกิด PCR product ขนาด 502 bp. (ภาพที่ 4.10)

4.8.1.2 จากผลการทดลองในหัวข้อ 4.8.1.1 จึงใช้อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียสในการตรวจสอบเชื้อ CMV ในตัวอย่างใบอ้วฝักยาว แดงกวา พืชข้างเคียง วัชพืช และอาการของเชื้อไวรัสที่ปรากฏบนต้นกล้าอ้วฝักยาวที่ทำการทดสอบการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดโดยใช้ specific primer ของเชื้อ CMV พบตัวอย่างที่ตรวจสอบส่วนใหญ่ให้ผลเป็นบวก (positive) แสดงว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ CMV ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2 และ ขนาดของ PCR product ที่ได้จากตัวอย่างส่วนใหญ่มีขนาด 502 bp. (ภาพที่ 4.11) อย่างไรก็ตามในบางตัวอย่าง PCR product ของเชื้อ CMV มีขนาดที่แตกต่างไป (ภาพที่ 4.12) และการคำนวณหาขนาดที่แน่นอนโดยใช้ Gel Photodoum system (ภาพที่ 4.13) พบว่า PCR product ที่คำนวณได้มีขนาดอยู่ระหว่าง 521bp - 596 bp จึงมีการศึกษา subgroup ของเชื้อ

4.8.1.3 การศึกษา subgroup ของเชื้อ CMV โดยการย่อย PCR product ของเชื้อ CMV ด้วย enzyme EcoRI และ MspI ก่อนนำไปทำ electrophoresis เพื่อสังเกตลักษณะของ band ที่เกิด พบว่า การใช้ enzyme EcoRI ในการ digests ไม่มีการย่อยเกิดขึ้นในทุกตัวอย่างได้แก่ ตัวอย่างอ้วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูกและตัวอย่างจากเมล็ดพันธุ์ (ภาพที่ 4.14) ส่วนการใช้ enzyme MspI ในการย่อยพบว่าการย่อยเป็น PCR product ของเชื้อ CMV เป็น 3 band (ภาพที่ 4.15) มีขนาดดังต่อไปนี้ 410 bp 235 bp และ 194 bp

4.8.2 การตรวจสอบเชื้อไวรัสสมาชิกในกลุ่ม potyvirusgroup

ในใบอ้วฝักยาวที่เป็นโรคทั้ง 6 ตัวอย่างด้วย degenerate primer ใช้ primer pot1 (5'ATTBTCDATRCACCA3') primer pot2 (5' TGYGAYGCBGATGGYTC3') พร้อมทั้งการศึกษา gradient temperature ที่อุณหภูมิ 45 - 65 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่อง Programmable

DNA Thermal cycle รุ่นที่สามารถตั้งอุณหภูมิขณะการทำปฏิกิริยา PCR เป็นแบบ gradient ได้ ในการตรวจสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมของ primer pot1 และ pot 2 โดยทำที่อุณหภูมิที่ 45 51.5 56.2 60.9 และ 65 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่ 60.9 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยา PCR ของเชื้อ ไวรัส กลุ่ม Potyvirus โดยพบแถบ band ในทุกตัวอย่างของ ถั่วฝักยาว ขนาดของ band อยู่ประมาณ 1200-1300 bp ซึ่งเป็นขนาดของสมาชิกในกลุ่ม potyvirus ที่คาดว่าจะได้จาก PCR product ของ degenerate primer ชุดนี้ นอกจากนี้ยังปรากฏ non specific band ขนาดใหญ่กว่า 1500 bp. (ภาพที่ 4.16)

4.8.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัส cowpea aphid-borne virus

จากตัวอย่างในถั่วฝักยาวทั้ง 6 ตัวอย่าง โดยใช้ primer 2 ชุดดังนี้

ชุดที่ 1 primer cow:pea – aphid borne1 (5' CCTCAAGGATGAGGTCTGAAGAA 3')
primer cowpea – aphid borne2 (5' GGAAGTACGCTACCGTACTT 3') ขนาด PCR product คือ 700 bp

ชุดที่ 2 primer cowpea – aphid borne3 (5' CGCTCAAACCCATTGTAGAA 3')
primer cowpea – aphid borne4 (5' TATTGCTCCCTTGCTCTTTC 3') ขนาด PCR product คือ 200 bp

พร้อมทั้งการศึกษา gradient temperature ที่อุณหภูมิ 45 - 65 องศาเซลเซียส โดยใช้เครื่อง Programable DNA Thermal cycle รุ่นที่สามารถตั้งอุณหภูมิขณะการทำปฏิกิริยา PCR เป็นแบบ gradient ได้ปรากฏว่าไม่พบ band ที่คาดว่าจะจะเป็นขนาดเดียวหรือใกล้เคียงกับ PCR product ของ primer ทั้ง 2 ชุดนี้

4.9 การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเครื่อง real time PCR

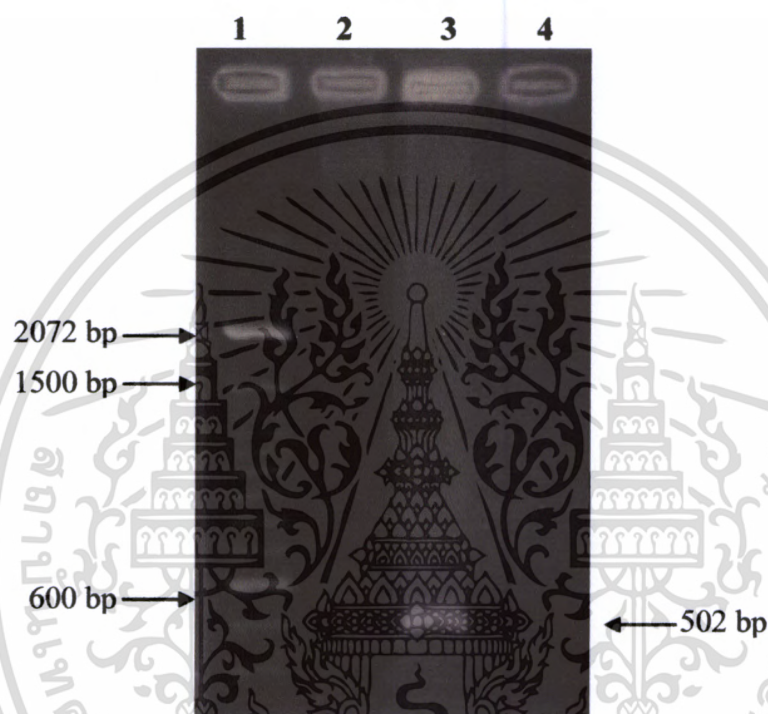
การตรวจสอบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วฝักยาวทั้ง 6 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่อง CHROMO 4 Real-Time พร้อมทั้งใช้น้ำยา Quantitect SYBR[®] Green PCR Kit และ degenerate primer potyvirusgroup พร้อมทั้งศึกษา gradient temperature ที่อุณหภูมิ 38 42 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมได้แก่ 50 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.17) และพบแถบ band ขนาด 1200-1300 bp. โดยไม่ปรากฏ non – specific band ในขณะที่อุณหภูมิอื่นพบทั้ง PCR product band และ band ของ non specific ที่ขนาดประมาณ 500 bp. (ภาพที่ 4.17) และจากผลการทดลอง จึงใช้อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสจากใบถั่วฝักยาวที่พบในแปลงปลูกและ ใบถั่วฝักยาวจากอาการที่ได้จากการถ่ายทอดผ่านเมล็ด พบว่า ในตัวอย่างของถั่วฝักยาวที่เก็บ ตัวอย่างมาจากแปลงปลูก ทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างจากเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวในการปลูกทดสอบ การถ่ายทอดทางเมล็ด มี band ที่มีขนาดเดียวกับ band ของสมาชิกในกลุ่ม potyvirusgroup มากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 band แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูกมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus มากกว่า 1 ชนิด (ภาพที่ 4. 18) จากการคำนวณโดยการเปรียบเทียบกับขนาดตัวมาตรฐานในเครื่อง Gel Photodocumentation System ได้ขนาด ของแต่ละ band คือ band ที่ 1 น้ำหนัก 1182 bp band ที่ 2 น้ำหนัก 1219 bp band ที่ 3 น้ำหนัก 1259 bp และตัวอย่างถั่วฝักยาวที่พบ band ในการตรวจสอบ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งเมื่อนำมาตรวจสอบลำดับเบสจากข้อมูล gene bank พบว่า band ที่ 2 มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของเชื้อ Bean yellow mosaic virus (BYMV) 1209 bp (Nakamura *et al.* 1996) และ band ที่ 3 มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของเชื้อ blackeye cowpea mosaic virus (BLCMV) 1242 bp (Wang and Fang 2004) (ภาพที่ 4.19)

ตัวอย่างลำดับและจำนวนของ nucleotide base ที่ถูกจับจำเพาะกับ degenerate primer ใน ส่วนของ coat protein ของเชื้อทั้งสองดังแสดงใน ภาพที่ 4.20 และภาพที่ 4. 21





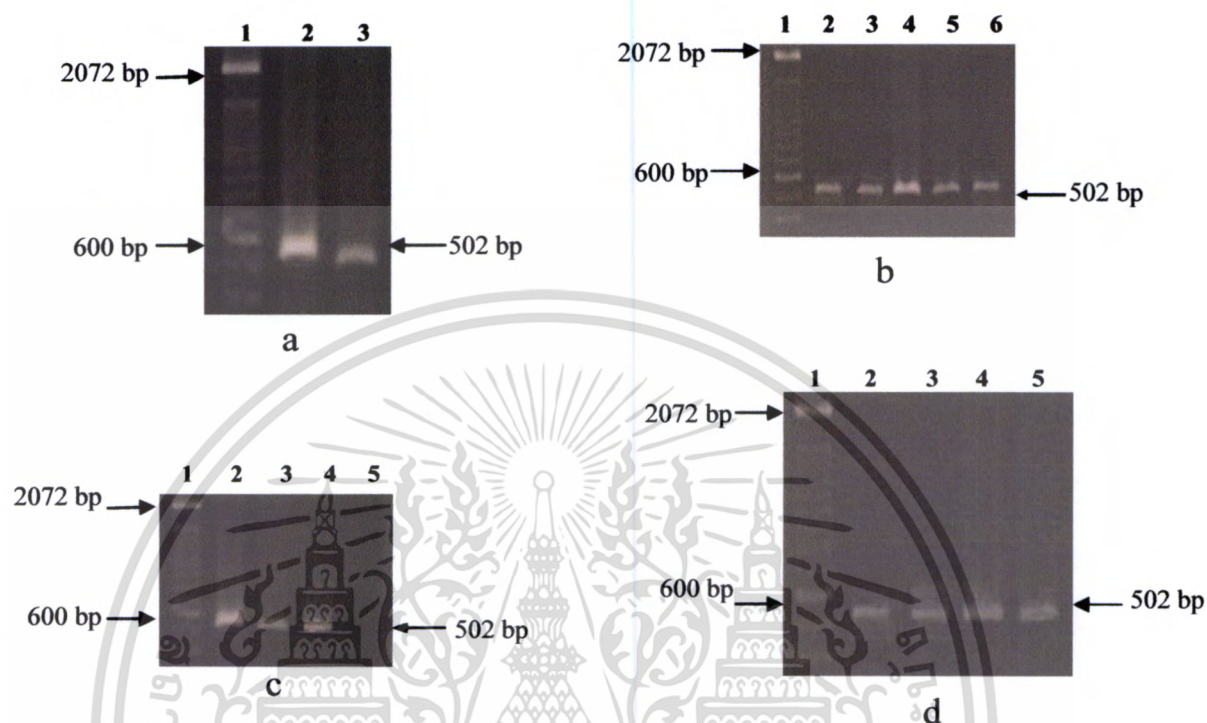
ภาพที่ 4.10 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมของ Primer CMV1 และ Primer CMV2 โดยใช้
 อุณหภูมิ 57 62 67 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 62 องศาเซลเซียส
 Lane1 = 57 องศาเซลเซียส Lane 2 = 62 องศาเซลเซียส Lane 3 = 67
 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการตรวจเชื้อ cucumber mosaic virus โดยวิธีการ PCR

ชื่อพืชทดสอบ	ผลการตรวจ cucumber mosaic virus
ถั่วฝักยาวอาการที่ 1	positive
ถั่วฝักยาวอาการที่ 2	positive
ถั่วฝักยาวอาการที่ 3	positive
ถั่วฝักยาวอาการที่ 4	positive
ถั่วฝักยาวอาการที่ 5	positive
ถั่วฝักยาวอาการที่ 6	positive
ถั่วฝักยาวอาการที่ 7	positive
เมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาว	positive
แตงกวาอาการที่ 1	positive
แตงกวาอาการที่ 2	positive
แตงกวาอาการที่ 3	positive
อุตุพิษ	positive
ผักขมหนาม	positive
หญ้ายาง	positive
ผักเสี้ยน	positive
ผักแคระด	negative
โหราพา	positive
แมงลัก	positive
กระเพรา	positive
ครอบจักรวาล	positive
มะเขือพวง	positive
มะเขือเทศ	positive
พริก	positive
ข่า	negative
ถั่วพู	negative
ถั่วลิสง	negative

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

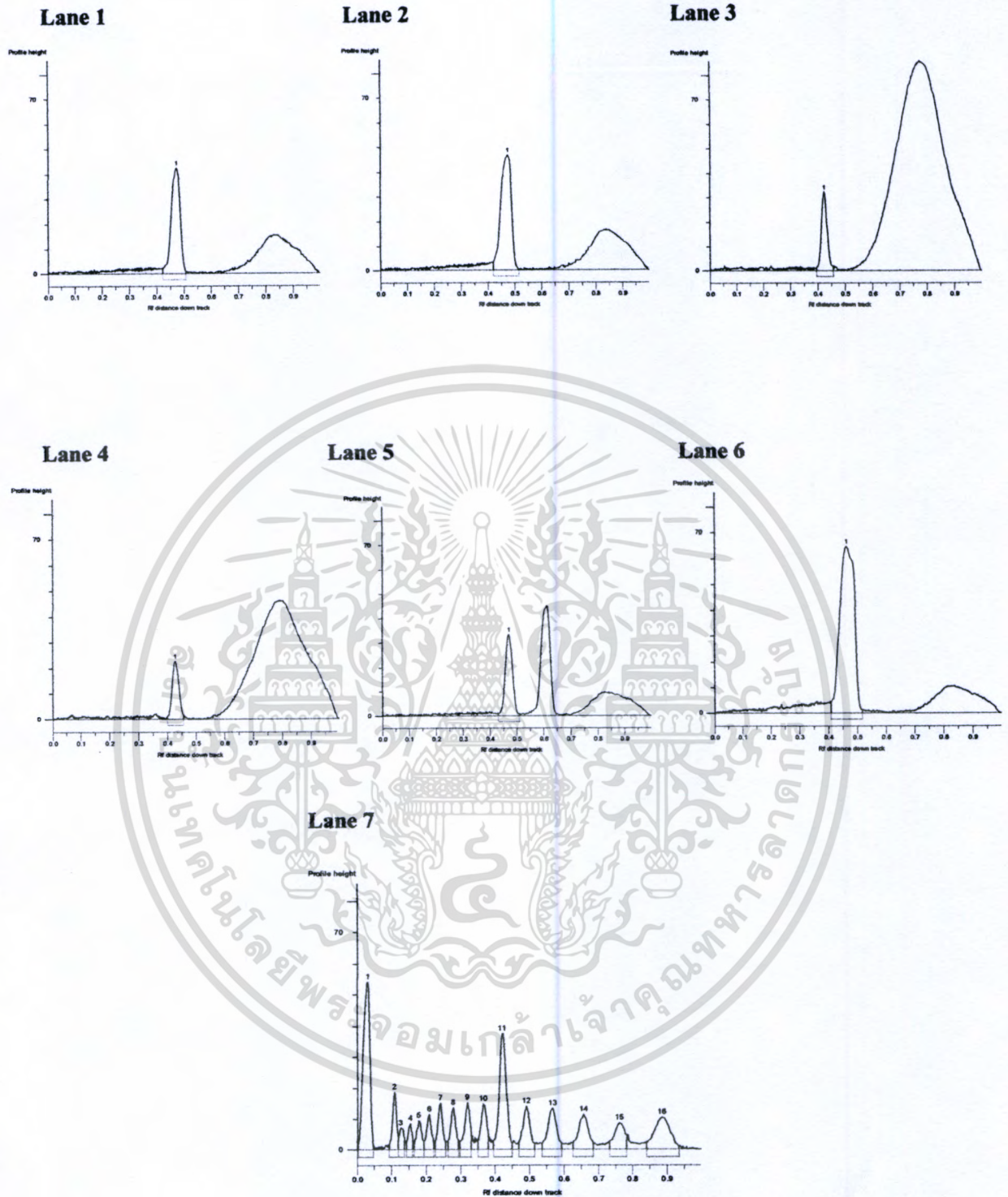


ภาพที่ 4.11 Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR) ของ CMV จากใบ ตัวอย่าง (a) Lane 1 = DNA ladder 100 bp Lane 2 – 3 = ใบถั่วฝักยาวจากการ ถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ (b) Lane 1 = DNA ladder 100 bp. Lane 2 – 5 = ตัวอย่าง ถั่วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูก Lane 6 = ตัวอย่างแตงกวาที่เก็บจากแปลงปลูก (c) Lane 1 = DNA ladder 100 bp Lane 2 = CMV จาก passion fruit Lane 3 = *A.indicum* Lane 4 = *T.trilobatum* Lane 5 = *S. nodiflora* (d) Lane 1 = DNA ladder 100 bp. Lane 2 = *O. sanctum* Lane 3 = *O. basilicum* Lane 4 = *L. esculentum* Lane 5 = *Capsicum* sp.



ภาพที่ 4.12 ความแตกต่างของขนาด PCR product จากการตรวจสอบเชื้อ CMV ตัวอย่างถั่วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูกและเมล็ดพันธุ์ Lane 1 – 5 = ตัวอย่างถั่วฝักยาวจากแปลงปลูก Lane 6 = ตัวอย่างจากเมล็ดพันธุ์ Lane 7 = DNA ladder 100 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

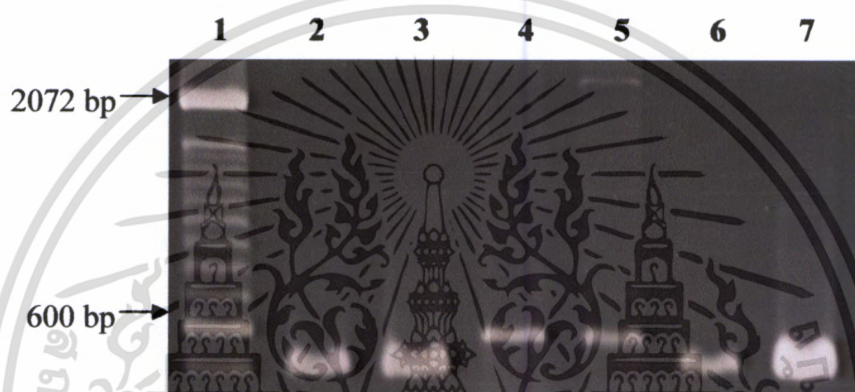


ภาพที่ 4.13 กราฟอ่านน้ำหนัก โมเลกุลของตัวอย่างถั่วฝักยาวจากแปลงปลูกและเมล็ดพันธุ์

Lane1 = 524.91 bp Lane 2 = 521.73 bp Lane3 = 596.36 bp Lane 4 = 589.16 bp

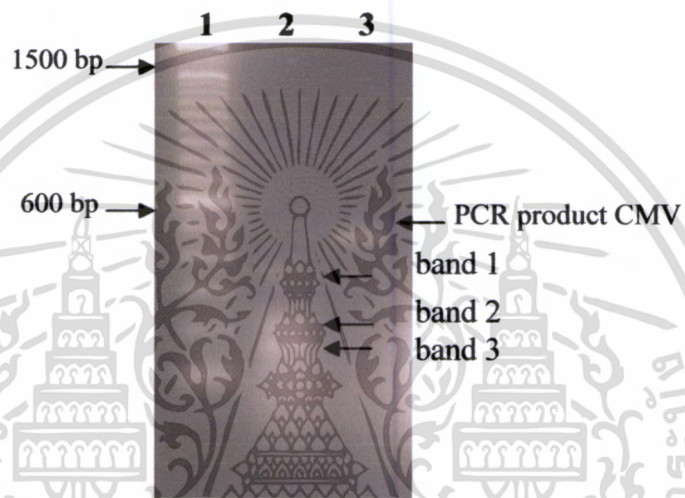
Lane 5 = 524.91 bp Lane 6 = 537.83 bp Lane 7 = DNA ladder 100 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

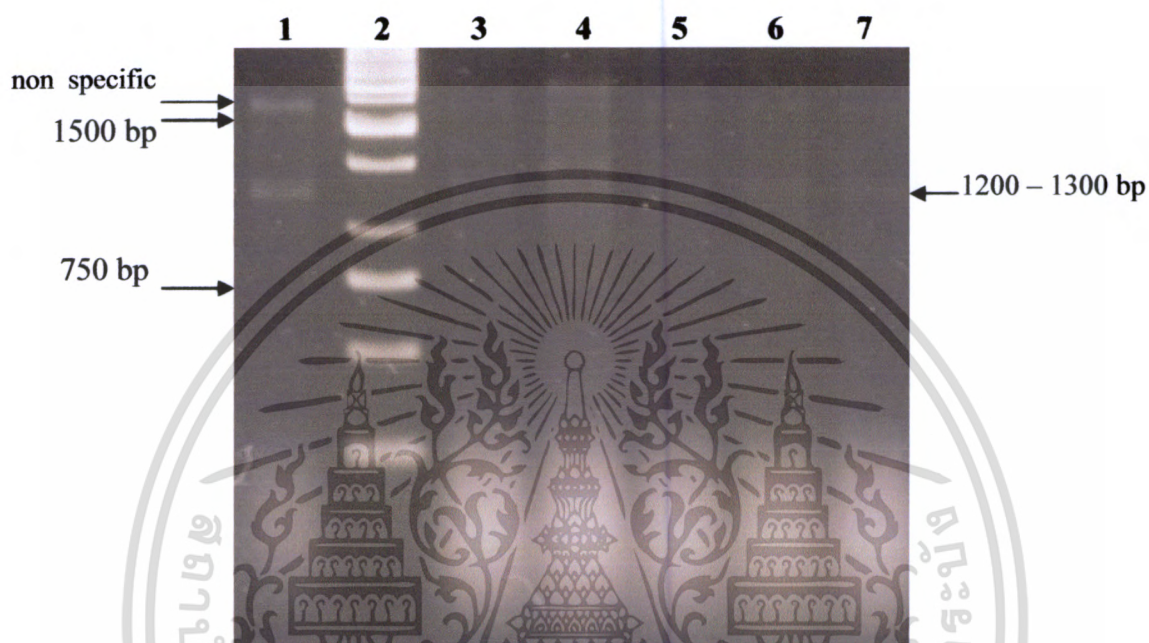


ภาพที่ 4.14 ผลภายหลังจากย่อย PCR product ของเชื้อ CMV ด้วย enzyme EcoR1 ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลง Lane 1 = DNA ladder 100 bp Lane 2 - 6 = ตัวอย่างใบถั่วฝักยาว Lane 7 = ตัวอย่างเมสเสจพันธุ

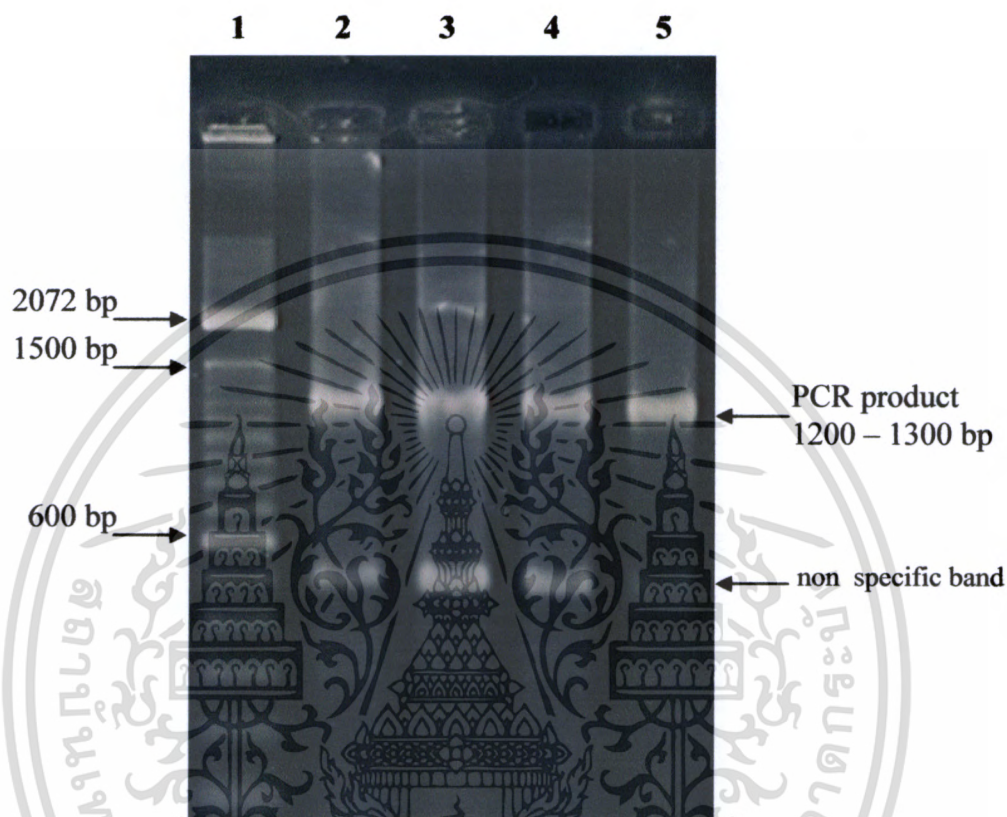
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



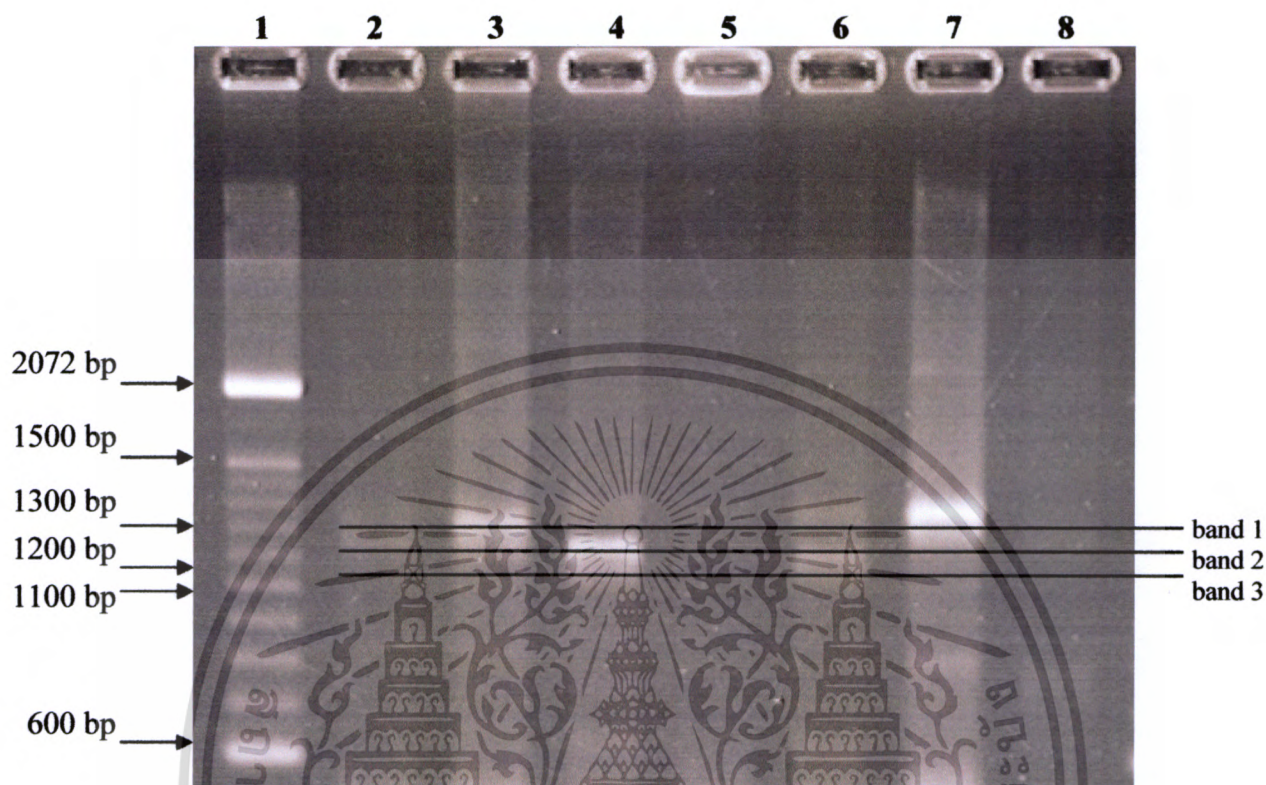
ภาพที่ 4.15 ผลภายหลังการย่อย PCR product ของเชื้อ CMV ด้วย enzyme MspI เกิดเป็น band ย่อย 3 band มีขนาด 410 bp 235 bp และ 194 bp Lane 1 = DNA ladder 100 bp Lane 2 = ตัวอย่าง CMV ของ ถั่วฝักยาวที่ digest ด้วย MspI Lane 3 = ตัวอย่าง CMV ของ ถั่วฝักยาวที่ไม่ถูกย่อย



ภาพที่ 4.16 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 45 – 65 องศาเซลเซียสสำหรับ degenerate primer pot 1 และ pot2 เพื่อตรวจเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup จากตัวอย่างถั่วฝักยาว อาการใบเหลือง (ตัวอย่างอาการที่ 1) โดย Lane 1 = positive control Lane 2 = DNA ladder 1k bp Lane 3 = 45 Lane 4 = 51.5 Lane 5 = 56.2 Lane 6 = 60.9 และ Lane 7 = 65 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.17 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 38 – 50 องศาเซลเซียสสำหรับ degenerate primer pot 1 และ pot 2 ในเครื่อง real time PCR เพื่อตรวจเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup จากตัวอย่างใบกล้วยที่แสดงอาการใบเหลือง(ตัวอย่างที่ 1) โดย Lane 1 DNA ladder 100 bp Lane2 = 38 Lane 3 = 42 Lane 4 = 45 และ Lane 5 = 50 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.18 ผลการตรวจสอบเชื้อในกลุ่ม potyvirusgroup ด้วย real time PCR โดยการใช้ยา Quantitect SYBR[®] Green และใช้ primer pot1 และ pot2 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส lane 1 = DNA ladder 100 bp. Lane 2 – 7 = ตัวอย่างกล้วยจากแปลงปลูก (ตัวอย่างที่ 1 – 6) Lane 8 = ตัวอย่างอาการจากการทดสอบการถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ดพันธุ์



ภาพที่ 4.19 ความแตกต่างของขนาด PCR product จากการตรวจสอบเชื้อใน potyvirus group ตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูกและเมล็ดพันธุ์ Lane 1 – 6 = ตัวอย่างถั่วฝักยาวจากแปลงปลูก Lane 7 = ตัวอย่างจากเมล็ดพันธุ์ Lane 8 = DNA ladder 100 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจสอบขนาด PCR product จากการตรวจสอบเชื้อใน potyvirus group
ตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูกและเมล็ดพันธุ์

ตัวอย่างพืช	band ที่พบ		
	band 1	band 2	band 3
ถั่วฝักยาวอาการที่ 1	-	+	-
ถั่วฝักยาวอาการที่ 2	+	+	-
ถั่วฝักยาวอาการที่ 3	-	+	-
ถั่วฝักยาวอาการที่ 4	-	-	-
ถั่วฝักยาวอาการที่ 5	+	+	+
ถั่วฝักยาวอาการที่ 6	-	-	+
จากเมล็ดพันธุ์	-	-	-

หมายเหตุ

+ คือ พบ band ของเชื้อไวรัส

- คือ ไม่พบ band ของเชื้อไวรัส

7681tcggctgctcaattctttaccagatggatgggtgactgcatgctgatgggtcccaatftgacagctcaactcactccataccttt
tgaatgctgctcttgagatgcggttgagacttatggaagaatgggattgggtgaacagatgftgaaaaatctttatacagaaattgt
gtacacaccatattgacaccagatggaacgggtgtcaagaagftaaaggggaataacagtggaacagccatccacagtgggtgaca
acacgctcatggttattatggcagtttattatgcagcggaaaagcttggtatcaaggggaatctcgaagatacactgftttctttgcca
acggggatgacctgctaattgccattaaaccagagtgtgaatcgtaccttgataaattgagggctgftttagtgaactgggattaaa
gtatgattcagtagcagaacgaagaacaaaggtgacttgggttatgtcacacagaggaattcaaatagatgggatggtgattcc
taaattggaagaggagcgcctgttcaattctggagtgaggacagagctatcaaccagaacatagacttgaggcaatagcgcag
caatgattgaagcatggggctatccaactctattaaccacataaggaagtctactttgggtcttagggcaagcaccatatagtca
attgagtctgagggcaaggcaccatacttcagaagtcgctcaagcaactatacactgaggagagatcacaccagccgaat
tggaaaggtatagcattgtaategactgftttgagtcgagagtgatgaggtgctgtgtgctgtttcaatcagatcaagagata
ttcaatgcaggtgagacgaagaaggataaagcgggaagaatgaagaaaatcctgataagaactctgaggggcagagtagcag
gcaaatagtccagacagagatgtgaatgcaggaactgttggaaactgttcagttcctaggctcaagaaaatagcaggaaagctaa
atattctaggttgggtgaaagatagttctcaatctagaccacctgctggaatataacceaccacaagatgacattcaaatgtata
gcaacacaagcagttgaagcatggttacaatggtgtcaacaagcatagaggttgaagatcacagatgggaattattctgaat
ggccttatggtgtggtgcatagagaatggcacatcaggaga8881

ภาพที่ 4.21 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ bean yellow mosaic virus 1209 bp ส่วนของดีเอ็นเอที่แรงเงา
สีน้ำเงินตามลำดับ (NCBI : NC 003492)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8041cctgatggatggattcacgccacgcagatgggtctcagtttgatagttcattaacaccacttctactcaattcagtgcttggaaat
 cagaagattctcatggaggatgggggggtgggaagagatgcttgagaatttgatgctgagataggtacacacccatattggca
 cctgatggaaacagtggttaaaaagtaagaggaaataatagtggaacacctccacagtcgtggacaacacactcatggttgaatg
 tcagtctattatcatgccacaaggtcggatggagtgatgatgacatacaagagcgtctggttttcttgcaaatggagatgatatcat
 actctccatacaagaggcagatctttgggttcttgacacattcgtctgcatcgtttagggagctgggattgaaactacaacttggatgaga
 ggacaaggaagagagaagacctggttcctgctgcactgtgctatcgaagtggtggaatctacattccaaagctagaaccagag
 cgtggtggttcaattctagatggggacaggagtaaggaaatgatgcacagaactgaggcaatttgcgcagctatgattgaagcatgg
 ggatatcctgaactgctcaagagatcaggaagtttatctatggctgcttgagagggatgaaactgaaagagattgcagctagtggga
 ggagcccccatacatagcagagtcagcactgaaaactctttacactaatagggaaaacaagattgaagagttagcaaagtatctgga
 agtgcctgactttgactatgatgtaggatgggagaatctgtgcacctacaatcaggaactgggcagccgcaaccaccaatagtggga
 tgcctgggtggatgctggaaggacaagagagagagaagcaatagaggaaaagacctgaaaggcagggagggtcagtaaac
 acaacctgggtgcaggggattcaacaatgagagacaaggatgtgaacgcaggtctccaaaggaaaagttgctccggcgttcaaaa
 gatcacaaaaaggatgaactgcccattggtgaaagggaatgtattttaaatctagatcatctgttggattacaagccagaacaaac
 tgatcttttaacacaaggaacaaagatgcagttgaaatgtggtacaatgctgtgaaggccgagatgaaatagatgatgcaca
 gatgtcaattgtaatgaatggcttcatggttgggtgattgacaat**9300**

ภาพที่ 4.22 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ blackeye cowpea mosaic virus 12426 bp ส่วนของ
 ดีเอ็นเอที่แรงาสีน้ำเงินตามลำดับ (NCBI : AY575773)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.10 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ในการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในแปลงปลูก แตงกวาและถั่วฝักยาว

จากการสำรวจแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกัน โดยการปลูกแตงกวากับถั่วฝักยาวจะเริ่มปลูกหลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวเสร็จเรียบร้อยแล้ว โดยทำการปลูกแตงกวาหรือถั่วฝักยาวชนิดใดชนิดหนึ่งในแปลงปลูกและจะมีการปลูกหมุนเวียนเปลี่ยนไป การสำรวจทำทุกช่วงฤดูตลอดทั้งปี พบอาการของโรคไวรัสที่สามารถถ่ายทอดผ่านทางน้ำคั้นได้จากถั่วฝักยาว 6 ตัวอย่าง และจากแตงกวา 3 ตัวอย่าง โดยพบว่ามีเชื้อไวรัสเข้าทำลายมากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ เชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) เชื้อไวรัสสมาชิกของ Geminivirusgroup และเชื้อไวรัสสมาชิกของ Potyvirusgroup ได้แก่ เชื้อ BYMV, BLCMV และเชื้อไวรัสที่ยังวินิจฉัยไม่ได้อีก 1 ชนิด (unknown) ดังตารางที่ 4.4 รวมถึงพบอาการของโรคไวรัสในวัชพืชและพืชข้างเคียงโดยพบ การเข้าทำลายของเชื้อ CMV ยกเว้นผักแคระด ข้า ถั่วพู ถั่วลิสง ดังตารางที่ 4.5 ซึ่งพบว่าวัชพืชและพืชข้างเคียงถูกเชื้อ CMV เข้าทำลายถึง 73 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่สำรวจพบ

ตารางที่ 4.4 การสำรวจแตงกวาและถั่วฝักยาวในแปลงปลูกและการตรวจสอบวินิจฉัยเชื้อไวรัส

พืชที่ทำการสำรวจ	เชื้อไวรัสที่ตรวจพบ		
	CMV	Geminivirusgroup	potyvirusgroup
ถั่วฝักยาวอาการที่ 1	+	-	+
ถั่วฝักยาวอาการที่ 2	+	-	+
ถั่วฝักยาวอาการที่ 3	+	-	+
ถั่วฝักยาวอาการที่ 4	+	-	+
ถั่วฝักยาวอาการที่ 5	+	-	+
ถั่วฝักยาวอาการที่ 6	+	-	+
แตงกวาอาการที่ 1	+	+	-
แตงกวาอาการที่ 2	+	+	-
แตงกวาอาการที่ 3	+	+	-

หมายเหตุ + คือ พบเชื้อไวรัส
- คือ ไม่พบเชื้อไวรัส

ตารางที่ 4.5 การสำรวจ และวินิจฉัยเชื้อ CMV ในวัชพืชและพืชข้างเคียงที่แสดงอาการ
ของโรคไวรัสและไม่แสดงอาการของโรคไวรัส

วัชพืชและพืชข้างเคียง	แสดงอาการของ โรคไวรัส	ไม่แสดงอาการ ของโรคไวรัส	ตรวจสอบ CMV
อูตพีย	+	-	+
ผักขมหนาม	+	-	+
หญ้ายาง	+	-	+
ผักเสี้ยน	+	-	+
ผักแครด	+	-	-
โหราพา	+	-	+
แมงลัก	+	-	+
กระเพรา	+	-	+
ครอบจักรวาล	+	-	+
มะเขือพวง	+	-	+
มะเขือเทศ	+	-	+
พริก	+	-	+
ข่า	-	+	+
ถั่วพู	-	+	+
ถั่วลิสง	-	+	-
รวมเป็นเปอร์เซ็นต์	80	20	73

หมายเหตุ + คือ ตัวอย่างที่แสดงอาการและตรวจพบเชื้อไวรัส
- คือ ตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการและตรวจพบเชื้อไวรัส

การสำรวจพบแมลงหลายชนิดที่เป็นพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ ดังตารางที่ 4.6 โดยเฉพาะเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด คือ *A. gossypii* และ *M. persicae* ซึ่งจัดเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อ CMV และเชื้อไวรัสอื่นหลายชนิดรวมถึงเชื้อในกลุ่ม Potyvirusgroup เช่นเชื้อ BYMV และ BLCMV ในลักษณะ non - persistent นอกจากนี้ชนิดของวัชพืชและพืชข้างเคียงในแปลงปลูกยังเป็นทั้งพืชอาหารของเพลี้ยอ่อนและพืชอาศัยของเชื้อไวรัส ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการแพร่ระบาดของเชื้อ CMV จัดเป็นเชื้อปัญหาหลักในแปลงปลูกตลอดปี โดยการแพร่ระบาดโดยตรงในกรณีของถั่วฝักยาวมาจากการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด จากตารางที่ 4.1 ส่วนการเข้าทำลายของเชื้อในช่วงปลูกจะอาศัยเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะหลัก โดยดูดกินอาหารจากวัชพืช และพืชข้างเคียงที่ถูกเชื้อ CMV เข้าทำลายจึงเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นแหล่งสะสมเชื้อข้ามฤดูปลูกทำให้เชื้อ CMV สามารถแพร่ระบาด อย่างต่อเนื่องและรุนแรง ส่วนแมลงหีขาวเป็นพาหะของเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirusgroup ซึ่งเข้าทำลายได้ทั้งถั่วฝักยาว และแตงกวาดังแม้ว่าในการสำรวจครั้งนี้จะไม่พบเชื้อในถั่วฝักยาวแต่มีความเป็นไปได้อย่างมากในการเข้าทำลายในพืชในรุ่นต่อไป

ตารางที่ 4.6 ชนิดของแมลงที่พบในแปลงและคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

ชนิดของแมลงที่สำรวจพบ	คุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส		
	CMV	Geminivirusgroup	potyvirusgroup
แมลงหีขาว	-	+	+
เพลี้ยอ่อนถั่ว	+	-	+
เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ	+	-	+
เพลี้ยจักจั่นสีเขียว	+	+	+
เพลี้ยกระโดด	+	+	+
คิกแคน	+	-	+
ด้วงเต่า	+	-	+

หมายเหตุ + คือ มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

- คือ ไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

จากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นปัญหาการสูญเสียผลผลิตเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในแปลงปลูกพืชสลับของอำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี ยังคงพบอย่างต่อเนื่องและอาจรุนแรงขึ้น หากเกษตรกรยังคงใช้วิธีปลูกพืชสลับโดยเหลื่อมเวลาซึ่งเป็นผลให้แหล่งของเชื้อและแมลงพาหะมีอยู่ในพื้นที่โดยตลอด โดยในแตงกวาพบว่าแมลงพาหะ วัชพืช และแปลงปลูกพืชข้างเคียงที่มีเชื้อไวรัสอาศัยอยู่จะเป็นแหล่งของเชื้อไวรัสที่จะเข้ามาทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกแตงกวา และในส่วนของถั่วฝักยาวพบว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ปลอดเชื้อ แมลงพาหะ วัชพืช และแปลงปลูกพืชข้างเคียงที่มีเชื้อไวรัสอาศัยอยู่จะเป็นแหล่งของเชื้อไวรัสที่จะเข้ามาทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกถั่วฝักยาว และการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสจะเกิดจากแมลงพาหะทำให้เชื้อแพร่กระจายจากแปลงปลูกหนึ่งสู่อีกแปลงปลูกหนึ่งและไปยังวัชพืชซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสทำให้สามารถอยู่ข้ามฤดูปลูกได้และกลับมาทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวอีกในฤดูต่อไป

ดังนั้นการกำจัดวัชพืช พืชอาศัยที่เป็นแหล่งของเชื้อไวรัสและแมลง รวมถึงการกำจัดแมลงพาหะ การคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่ปลอดโรค และการวางแผนในการปลูกพืช จะทำให้สามารถ

ตัดวงจรแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส จะช่วยลดปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การสำรวจอาการ โรคไวรัสใน ถั่วฝักยาว แดงกวา วัชพืช และพืชข้างเคียง ในแปลงปลูกพืช สลับภายหลังการทำนาเขตพื้นที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี พบอาการของโรคไวรัสในถั่วฝักยาว แดงต่างกัน 7 อาการดังนี้ 1) สีเขียวเข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อนแผลพอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง 2) ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้ม ใบพอง พื้นใบบางส่วนมีสีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ 3) เส้น ใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและเส้นใบ พื้นใบสีเขียวอ่อน 4) ใบค่างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วไป และสีเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำคั้นแคระแกร็น 5) ใบเรียวยาว ผิดรูปร่าง 6) เกิดอาการค่างเขียวตามเส้น ใบและขอบใบโค้งลง 7) ยอดแตกพุ่มแจ้ ในแดงกวาพบอาการของโรคไวรัส 3 ลักษณะ ได้แก่ 1) ค่างเหลืองกระจายทั่วไป 2) เส้นใบและพื้นใบเป็นสีเหลือง 3) จุดพองสีเขียวกระจายทั่วไป พื้นใบมี สีเขียวอ่อน

ซึ่งเมื่อนำใบพืชที่แสดงอาการเหล่านี้มาทำการถ่ายทอดโดยวิธี Mechanical sap transmission ผู้ค้นคว้าถั่วฝักยาวและแดงกวาพบว่าในถั่วฝักยาวที่แสดงอาการที่ 1- อาการที่ 6 สามารถถ่ายทอดได้โดยเมื่อสังเกตอาการอย่างต่อเนื่องพบว่าอาการบนต้นที่ถูกปลูกเชื้อปรากฏอาการ เช่นเดียวกับอาการของตัวอย่างใบเป็นโรคที่เก็บมาจากแปลงปลูก ส่วนอาการแตกพุ่มแจ้ไม่สามารถ ถ่ายทอดได้นี้คั้น ในขณะที่การถ่ายทอดเชื้อจากตัวอย่างใบแดงกวาที่เป็นโรคทั้ง 3 อาการพบเพียง อาการใบค่าง ปรากฏบนแดงกวาที่ได้รับการปลูกเชื้อซึ่งเมื่อสังเกตอาการอย่างต่อเนื่องก็ไม่ปรากฏ อาการเช่นเดียวกับที่พบในแปลง จากผลที่ได้ดังกล่าวทำให้ทราบว่าเชื้อไวรัสส่วนใหญ่ที่เข้าทำลาย ถั่วฝักยาวทำให้เกิดอาการแตกต่างกันมีคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อได้น้ำคั้นซึ่งเป็นคุณสมบัติของ เชื้อไวรัสสาเหตุโรคหลายชนิด (Walkey 1985) และความแตกต่างของอาการที่พบในแปลงน่าจะเกิด จากการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด ดังเช่นที่พบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสใน ถั่วฝักยาวในรายงานของ Gumedzoe *et al.* (1990) ในประเทศ โทโก (Togo) พบการเข้าทำลายของ เชื้อ cowpea yellow mosaic virus และเชื้อ cowpea mottle virus นอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลาย ร่วมของเชื้อทั้งสองนี้รวมถึงเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus เชื้อ cowpea mild mottle virus และเชื้อ southern bean mosaic virus และจากรายงานใน Proceeding of International Workshop TARI (1990 -1991) พบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วฝักยาวในประเทศได้หวั่น ได้แก่เชื้อ bean common mosaic virus (BCMV), black eye cowpea mosaic virus (BICMV), cowpea mosaic virus (CMV), cowpea aphid - borne mosaic virus (CAMV), cucumber mosaic virus (CMV), peanut mottle virus (PMV) และ peanut stripe virus (PSV) Gumedzoe (1993) ศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ ไวรัสในถั่วฝักยาวในพื้นที่ปลูกต่างๆของประเทศโทโก (Togo) โดยการใช้ antiserum ของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

cowpea aphid-borne mosaic virus (BCMV), เชื้อ cowpea mottle virus (CMeV), เชื้อ cowpea mosaic comovirus (CPMV), เชื้อ southern bean mosaic sobemovirus (SBMV), เชื้อ cowpea mild mottle carlavirus (CMMV) และเชื้อ cowpea strain of tobacco mosaic tobamovirus (TMV-CS) พบการเข้าทำลายของเชื้อ CPMV มากที่สุดและยังพบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสเหล่านี้มากกว่า 1 ชนิด นอกจากนี้ Vale *et al.* (1994) ศึกษาผลของการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสในถั่วฝักยาว พบว่าเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) + cowpea severe mosaic comovirus (CpSMV) และ blackeye cowpea mosaic potyvirus (BCpMV) + CpSMV ช่วยเสริมการเข้าทำลายกันในถั่วพันธุ์ Pitiuba และพันธุ์ Setentao ในขณะที่เชื้อไวรัส 3 ชนิดคือ CMV + BCpMV + CpSMV เสริมการเข้าทำลายทำให้ถั่วแสดงอาการ necrosis และคั้นตาย Anderson *et al.* (1996) ศึกษาการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ blackeye cowpea mosaic และ cucumber mosaic โดยการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าระดับความเข้มข้นของเชื้อ CMV ลดลงเมื่อพืชมีอายุมากขึ้นแต่การเข้าทำลายร่วมของเชื้อทั้งสองทำให้พืชแสดงอาการใบค่างและแฉะแฉกรุนแรง เช่นเดียวกับรายงานของ Gillaspie *et al.* (1998) ส่วนอาการแตกพุ่มแฉบนถั่วฝักยาว (อาการที่ 7) อาจเกิดจากความผิดปกติของยอคยอนต่อสารเคมีที่ใช้ฉีดพ่นในแปลงหรือเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อบางชนิด เช่น ไวรอยด์ซึ่งพบทำให้เกิดอาการดังกล่าว อย่างไรก็ตามเนื่องจากเชื้อนี้ไม่สามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้นจึงไม่มีการศึกษาต่อเนื่อง ในกรณีของแตงกวาซึ่งสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นโดยอาการที่ปรากฏเป็นอาการของโรคไวรัสที่ต่างจากอาการในแปลงเป็นผลเนื่องมาจากการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัส

ในบางเชื้ออาจมีอุปสรรคในการถ่ายทอดเพราะคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อไวรัสบางชนิด เช่น เชื้อในกลุ่ม luteovirusgroup หรือ geminivirusgroup เช่นเชื้อ bean golden yellow mosaic virus type 1 ไม่สามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้นแต่ถ่ายทอดโดยแมลงหิวข้าวเท่านั้น ส่วน bean golden yellow mosaic virus type 2 สามารถถ่ายทอดได้ทั้ง 2 ลักษณะ (Garrido-Ramirez *et al.* 2000) ในประเทศไทยมีรายงานเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแตงกวาเช่นเชื้อ watermelon mosaic virus (WMV) โดยเชื้อพันธุ์ กิตติปกรณ (2537) และ เชื้อ leaf roll virus (ศักดิ์ สุนทรสิงห์ 2537) Blancard *et al.* (1994) รายงานว่า squash mosaic virus (SqMV) ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับแตงในหลายประเทศ เช่นประเทศ ออสเตรเลีย ใต้หวันและประเทศทางตอนใต้ของแถบเมดิเตอร์เรเนียน Thomas *et al.* (1996) พบว่าแตงส่วนใหญ่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ papaya ring spot -W (PRSV -W) Zitikait (2002) พบการเข้าทำลายแตงโดยไวรัสเชื้อสาเหตุ 3 ชนิดคือ cucumber mosaic virus (CMV) กับ tomato ringspot virus (ToRSV) ซึ่งมีอนุภาคแบบ isometric และ cucumber green mottle mosaic virus (CGMMV) ซึ่งมีอนุภาคแบบ rod-shaped

การสำรวจและเก็บตัวอย่างวัชพืชและพืชใกล้เคียงที่พบว่าแสดงอาการของโรคไวรัสในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบวัชพืช ได้แก่ อุดพิช (*Typhonium trilobatum* Schott.) แสดงอาการต่างเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วงแห ผักขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.) แสดงอาการค่างเป็นจุดเหลืองอ่อน หญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* L.) แสดงอาการค่างสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ผักเสี้ยน (*Cleome gynandra* L.) แสดงอาการค่างเหลืองอ่อนใบบิดเบี้ยว ผักแครด (*Synedrella nodiflora* L.) แสดงอาการค่างสีเขียวตามเส้นใบ ครอบจักรวาล (*Abutilon hirtum*) แสดงอาการใบลิบเล็ก ส่วนพืชใกล้เคียงได้แก่ โหระพา (*Ocinum basilicum*) และแมงลัก (*Ocinum canum* L.) แสดงอาการค่างเหลืองใบบิดเบี้ยว กระเพรา (*Ocinum sanctum*) แสดงอาการค่างเหลืองกระจายทั่วใบ มะเขือพวง (*Solanum Torvum*) แสดงอาการค่างเขียวอ่อนใบผิดปกติเล็กน้อย มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) แสดงอาการค่างเขียวเข้มใบเป็นคลื่น พริก (*Capsicum frutescens* L.) แสดงอาการค่างเขียวอ่อนใบมีขนาดเล็ก ใบผิดปกติ

จากการสำรวจแมลงในแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกันและบริเวณรอบๆ แปลงปลูกในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบแมลงได้แก่ แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*) เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis gossypii*) เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ (*Myzus persicae*) เพลี้ยจักจั่นสีเขียว (*Nephotettix virescens*) เพลี้ยกระโดด (*Nilaparvata lugens*) ตั๊กแตน (*Cyrtacanthacris tatarica* L.) ค้างคาว (*Micraspis* sp.) ผลการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาโดยวิธี ELISA ด้วย antiserum เฉพาะของไวรัสในกลุ่ม Geminivirus และ antiserum ของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirus ในแตงกวาทั้ง 3 ตัวอย่าง แต่ไม่พบในตัวอย่างถั่วฝักยาวทั้ง 7 อาการ การตรวจสอบเชื้อ CMV ในถั่วฝักยาวและแตงกวาที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลับที่ทำการเก็บตัวอย่างทุกฤดู ตลอดทั้งปี พบว่ามีเชื้อ CMV ในทุกตัวอย่างของถั่วฝักยาวและแตงกวา นอกจากนี้ผลการตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสในตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เป็นโรค โดย leaf dip technique ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคแบบ flexuous rod ขนาดเฉลี่ยประมาณ 600-650 นาโนเมตรในตัวอย่างอาการส่วนใหญ่ และขนาด 297 นาโนเมตรและยังพบ ลักษณะอนุภาคแบบ isometric particle ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30.38 นาโนเมตร ซึ่งจากผลการศึกษาชั้นชั้นชนิดของเชื้อไวรัส CMV เป็นหนึ่งในเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายร่วม โดยเชื้อนี้มีอนุภาคแบบ isometric particle ขนาด 28-30 นาโนเมตร (Walkey 1985) ในขณะที่อนุภาคของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus group มีลักษณะ flexuous rod ขนาด 600-850 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับขนาด โดยเฉลี่ยของอนุภาคที่ตรวจพบในใบถั่วฝักยาวส่วนใหญ่

การตรวจสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวและแตงกวาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดอำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรีอย่างละ 5 พันธุ์ดังนี้ พันธุ์ถั่วฝักยาว ได้แก่ พันธุ์ขุนศึก No.7 พันธุ์สมบูรณ ไชค No. 99 พันธุ์ไม่ขวาง 005 พันธุ์ล้านน้ำชี และพันธุ์ BIG 1 และพันธุ์แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มีชัย พันธุ์เมซอน พันธุ์อะตอม พันธุ์อมตะ 765 และ พันธุ์แทมมี โดยการนำเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวพันธุ์ละ 200 เมล็ดมาปลูกและสังเกตอาการของโรคเมื่อพืชเจริญเติบโต พบว่าใน 2 สัปดาห์ ถั่วฝักยาวเริ่มแสดงอาการของโรคไวรัส และใน 4 สัปดาห์ อาการที่ปรากฏมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความแตกต่างกัน 4 ลักษณะอาการ ได้แก่ อาการใบค่างเป็นปื้นเล็กๆตามด้วยอาการเหลืองทั้งใบ ก่อนที่ใบจะหลุดร่วง อาการค่างเขียวเป็นร่างแหตามเส้นใบ อาการแผลจุดสีเขียวอ่อนกระจายบน ใบ ซึ่งอาการทั้ง 3 ลักษณะนี้พบบนใบแก่คู่แรก และเมื่อต้นถั่วมีการเจริญเป็นใบ trifoliolate ก็ไม่ ปรากฏอาการดังกล่าว ส่วนอาการจุดเหลืองบนใบ เส้นใบหดยู่ทำให้ใบบิดเบี้ยว พบปรากฏบนใบ trifoliolate คู่แรกเท่านั้น ในขณะที่ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสบนแตงกวาพันธุ์ต่างๆ เปอร์เซ็นต์ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทางเมล็ดพันธุ์ของถั่วฝักยาวรวมทุกอาการอยู่ระหว่าง 1-10.5 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาการถ่ายทอดทางดินโดยใช้เดือนฝอยทำโดยการเก็บตัวอย่างดินจากแปลง ปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวา ที่แสดงอาการของเชื้อไวรัส โดยการสุ่มเก็บดินจากบริเวณรอบๆ โคนคั่น ของพืชในแปลงที่แสดงอาการของโรคไวรัส และนำดินตัวอย่างมาเพาะเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาว พันธุ์ลำ น้ำสี และแตงกวา พันธุ์อมตะ อย่างละ 200 เมล็ด ทำการตรวจสอบเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าต้น อ่อนที่เจริญขึ้นมาไม่แสดงอาการของโรคไวรัส และเมื่อนำใบที่ไม่แสดงอาการโรคไวรัสไปทำการ back test ผู้ต้นกล้าทั้งถั่วฝักยาวและแตงกวาก็ไม่ปรากฏอาการของโรคไวรัส แสดงว่าเชื้อไวรัสที่ ตรวจพบในแปลงปลูกทั้งในถั่วฝักยาวและแตงกวาไม่ถ่ายทอดในดิน จากการตรวจสอบโดยแยก สกัด dsRNA ของเชื้อในใบถั่วฝักยาวที่เป็นโรคจากการถ่ายทอดผ่านเมล็ดพบว่าเชื้อสาเหตุของทั้ง 4 อาการที่ปรากฏคือเชื้อ CMV ซึ่ง ความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อ CMV ผ่านเมล็ดถั่วฝักยาวมี รายงานของ Hampton *et al.* (1992) ว่าเชื้อ CMV เป็นเชื้อหนึ่งในจำนวนเชื้อไวรัสที่ถ่ายทอดผ่าน ทางเมล็ดถั่วฝักยาว โดยอัตราการถ่ายทอดจะขึ้นอยู่กับ strain ของเชื้อและความแตกต่างทางสายพันธุ์ ของเมล็ด Gillaspie *et al.* (1998) รายงานการถ่ายทอดเชื้อ CMV ในถั่วฝักยาวพันธุ์ Early Ramshorn ที่ 1.5 – 37 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Meiners *et al.* (1977) รายงานอัตราการถ่ายทอดที่ 30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การถ่ายทอด 4 – 28 เปอร์เซ็นต์ รายงานโดย (Anderson, 1957) และ 2 เปอร์เซ็นต์ (Bashir and Hampton 1996) ส่วนอาการที่แสดงบนใบถั่วฝักยาวที่แตกต่างกันเกิดขึ้นจากพันธุ์ถั่วฝักยาวที่ใช้ ทดสอบและอาจมีความแตกต่างในเรื่อง strain ของเชื้อ CMV ที่เข้าทำลายรวมถึงอายุของพืชขณะที่ ถูกเชื้อเข้าทำลาย (Gillaspie *et al.* 1998) นอกจากนี้มีรายงานการถ่ายทอดเชื้ออื่นผ่านทางเมล็ด ถั่วฝักยาว เช่น Jeyanandarajah (1992) รายงานการเข้าทำลายของเชื้อ blackeye cowpea mosaic virus, bean common mosaic virus, cucumber mosaic virus โดยถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดใน ประเทศศรีลังกา Patil and Gupta (1992) รายงานว่าเชื้อ bean common mosaic virus ถ่ายทอด ผ่านเมล็ดได้ 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยเชื้ออยู่ที่ testa ของเมล็ด Puttaraju *et al.* (2003) พบว่าเชื้อ blackeye cowpea mosaic virus ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด 7 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณความเข้มข้นของ เชื้อ ยิ่งสูงทำให้เกิดการบิดเบี้ยวของใบ (distortion symptom) มากขึ้น

การตรวจสอบเชื้อโดยการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างใบพืชต่อไปนี้คือ ถั่วฝักยาว ตัวอย่างที่ 1- 6 และแตงกวา ตัวอย่างที่ 1- 3 และในวัชพืช และพืชข้างเคียง ได้แก่ อุดพืช ผักขมหนาม หญ้าขาง ผักเสี้ยน หญ้าขาง ผักแครด โหระพาแมงลัก กระเพรา ครอบจักรวาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะเขือพวง มะเขือเทศ พริก พบ pattern ของ dsRNA ของเชื้อ CMV ในเกือบทุกตัวอย่างยกเว้นในผักแครด โดย pattern ของ dsRNA ของเชื้อ CMV แยกตัว อย่างชัดเจนโดยเฉพาะ RNA3 RNA4 RNA 5 และ ในบางพืชพบ satellite RNA ของเชื้อด้วย นอกจากนี้การตรวจสอบผลโดย reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยการใช้ CMV primer ที่มี PCR product 502 bp. เพื่อยืนยันการเข้าทำลายของเชื้อ CMV ให้ผลเป็นบวก (positive) แสดงว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ CMV เช่นกัน เป็นที่น่าสังเกตว่า ขนาดของ PCR product ที่ได้จากตัวอย่างส่วนใหญ่มีขนาด 502 bp. แต่อย่างไรก็ตามในบางตัวอย่าง เช่นตัวอย่างจากเมล็ดพันธุ์ และ ตัวอย่างใบถั่วฝักยาวจากแปลงปลูกบางตัวอย่าง มี PCR product ของเชื้อ CMV ขนาดที่แตกต่างไป และการคำนวณหาขนาดที่แน่นอนโดยใช้ Gel Photodocumentation system พบว่า PCR product ที่คำนวณได้มีขนาดอยู่ระหว่าง 521bp - 596 bp. จึงมีการศึกษา subgroup ของเชื้อ โดยการใช้ PCR product ของเชื้อ CMV ด้วย enzyme EcoRI และ MspI ก่อนนำไปทำ electrophoresis เพื่อสังเกตลักษณะของ band ที่เกิด พบว่า การใช้ enzyme EcoRI ในการย่อย ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น ส่วนการใช้ enzyme MspI ในการย่อยพบว่าการย่อยเป็น PCR product ของเชื้อ CMV เป็น fragment ของ PCR product 3 band ขนาด 410 bp 235 bp และ 194 bp ซึ่งผลดังกล่าวแตกต่างจากการรายงานของ Singh *et al.* (1995) ว่า PCR product ของ CMV subgroup I เมื่อย่อยด้วย enzyme EcoRI ไม่พบการเปลี่ยนแปลงแต่เมื่อย่อยด้วย enzyme MspI จะได้ fragment ของ PCR product 2 ขนาดคือ 335 - 337 bp. และ 151-152 bp. ส่วน PCR product ของ CMV subgroup II เมื่อย่อยด้วย enzyme EcoRI ได้ fragment ของ PCR product 2 ขนาดคือ 329-332 bp. และ 170 bp. และเมื่อย่อยด้วย enzyme MspI ได้ fragment ของ PCR product 3 ขนาดคือ 197 bp. 151 bp. และ 126 bp. แต่อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้สูงที่ความแตกต่างของ fragment ของ PCR product ที่ได้นั้นแตกต่างกันเนื่องจาก strain ที่แตกต่างกันของเชื้อ CMV (Takeshita *et al.* 2004)

ผลการตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยวิธี RT-PCR และ realtime PCR ในใบถั่วฝักยาวตัวอย่างที่ 1-6 และ ใบถั่วฝักยาวที่มีอาการของโรคไวรัสจากการทดสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ โดยการใช้ degenerate primers ของ potyvirusgroup และ cowpea aphid-borne mosaic virus primers พบว่าในตัวอย่างของถั่วฝักยาวที่เก็บตัวอย่างมาจากแปลงปลูกทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างจากเมล็ดพันธุ์ ถั่วฝักยาวในการปลูกทดสอบการถ่ายทอดทางเมล็ด มี band ที่มีขนาดเดียวกับ band ของสมาชิกในกลุ่ม potyvirusgroup มากกว่า 1 band แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูกมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus มากกว่า 1 ชนิด จากการคำนวณโดยการเปรียบเทียบกับขนาดตัวมาตรฐานในเครื่อง Gel Photodocumentation System ได้ขนาด ของแต่ละ band คือ band ที่ 1 มีขนาด 1182 bp band ที่ 2 มีขนาด 1219 bp และ band ที่ 3 มีขนาด 1259 bp ซึ่งเมื่อนำมาตรวจสอบคู่ลำดับเบสจากข้อมูล gene bank พบว่า band ที่ 2 มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของเชื้อ Bean yellow mosaic virus (BYMV) 1209 bp (Nakamura *et al.* 1996) และ band ที่ 3 มีขนาด

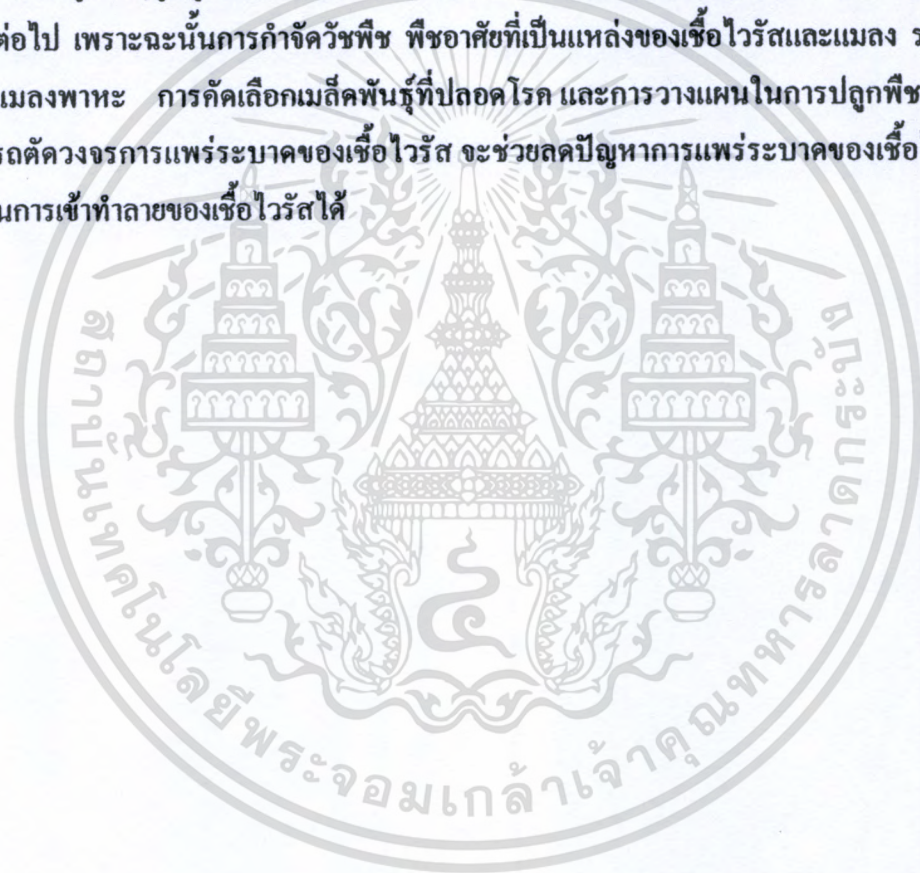
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใกล้เคียงกับขนาดของเชื้อ blackeye cowpea mosaic virus (BLCMV) 1242 bp (Wang and Fang 2004) ส่วนใน band ที่ 1 ยังไม่สามารถตรวจสอบได้ในขณะนี้ ผลจากการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับในตอนต้นเกี่ยวกับการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสหลายชนิดในถั่วฝักยาว ซึ่งรวมถึงชนิดของเชื้อทั้งสองที่วินิจฉัยได้จากการศึกษานี้ นอกจากนี้การใช้ degenerate primers ของ potyvirusgroup มีรายงานการใช้ตรวจสอบเชื้อไวรัส ในกลุ่ม potyvirusgroup ในมันเทศ (sweet potato) โดย Colinet *et al.* (1998) และพบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ 3 ชนิดคือ sweet potato feathery mottle virus, sweet potato latent virus และ sweet potato virus G โดยผลของ PCR product ที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน 3 ขนาด ส่วนผลการตรวจสอบเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus ด้วยวิธี RT-PCR ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อในตัวอย่างที่ทำการสำรวจ

ผลการสำรวจแมลงในแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกันและบริเวณรอบๆ แปลงปลูกในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบ แมลงหมีขาว (*B. tabaci*) เพลี้ยอ่อนถั่ว (*A. gossypii*) เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ (*M. persicae*) เพลี้ยจักจั่นสีเขียว (*N. virescens*) เพลี้ยกระโดด (*N. lugens*) ตั๊กแตน (*C. tatarica* L.) ค้างค่อม (*Micraspis* sp.) การสำรวจพบชนิดของเพลี้ยอ่อน 2 ชนิดคือ *A. gossypii* และ *M. persicae* ซึ่งจัดเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อ CMV ในลักษณะ non-persistent (Palukaitis *et al.* 1992) และยังเป็นพาหะของเชื้อไวรัสหลายชนิดรวมถึงเชื้อ bean yellow mosaic virus และ blackeye cowpea mosaic virus ส่วนแมลงหมีขาวก็จัดเป็นแมลงพาหะที่ดีของเชื้อไวรัสในกลุ่ม geminivirusgroup ซึ่งสามารถเข้าทำลายได้ทั้งแตงกวาและถั่วฝักยาว นอกจากนี้เพลี้ยจักจั่นสีเขียวและเพลี้ยกระโดดซึ่งโดยทั่วไปพบในนาข้าว เป็นแมลงพาหะเชื้อไวรัสในลักษณะ persistent (Walkey 1985) จากการศึกษาทำให้ทราบว่าเชื้อ CMV จัดเป็นเชื้อไวรัสหลักที่สำคัญในการเข้าทำลายถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกับพื้นที่ที่ใช้ปลูกข้าว ในเขตอำเภอ บ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี โดยมีเพลี้ยอ่อนทั้งสองชนิดเป็นพาหะ โดยเชื้อเข้าทำลายพืชในลักษณะการเข้าทำลายร่วมทำให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรงและมีความแตกต่างกัน แหล่งของเชื้อ CMV โดยตรงในกรณีของถั่วฝักยาวมาจากเมล็ดที่เป็นโรค ส่วนการเข้าทำลายของเชื้อในช่วงฤดูปลูกอาศัยเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะหลักโดยดูดกินอาหารจากวัชพืช ได้แก่ ครอบจักรวาล อุดพืช หญ้าหาง ผักเสี้ยน ผักขม และพืชข้างเคียงคือ กระเพรา โหระพา แมงลัก พริก มะเขือพวง และมะเขือเทศ ซึ่งเป็นแหล่งสะสมเชื้อข้ามฤดูปลูกทำให้เชื้อ CMV สามารถแพร่ระบาดอย่างต่อเนื่องและรุนแรง ส่วนแหล่งของเชื้อ bean yellow mosaic virus และ blackeye cowpea mosaic virus อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถถูกถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวที่ปลูกหลั้วมเวลากัน และกรณีเช่นเดียวกันนี้อาจเกิดกับแตงกวาที่ถูกเชื้อ CMV และเชื้อไวรัสในกลุ่ม geminivirusgroup เข้าทำลาย โดยมีแมลงหมีขาวเป็นพาหะ

ดังนั้นจากการศึกษาปัญหาการปลูกแตงกวาสลับกับถั่วฝักยาวภายหลังการทำนาในพื้นที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี นี้ชี้ให้เห็นปัญหาการสูญเสียผลผลิตเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อ

ไวรัสในแปลงปลูกพืชสลับว่ายังคงมีอย่างต่อเนื่องและอาจรุนแรงขึ้น หากเกษตรกรยังคงใช้วิธีปลูกพืชสลับโดยเหลื่อมเวลาซึ่งเป็นผลให้เชื้อไวรัสและแมลงพาหะสะสมอยู่ในพื้นที่โดยตลอด โดยในแปลงพบว่าแมลงพาหะ วัชพืช และแปลงปลูกพืชข้างเคียงที่มีเชื้อไวรัสอาศัยอยู่ เป็นแหล่งสะสมของเชื้อไวรัสที่จะกลับเข้ามาทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกแปลงถัดไป และในส่วนของถั่วฝักยาวพบว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ปลอดเชื้อ แมลงพาหะ วัชพืช และแปลงปลูกพืชข้างเคียงที่มีเชื้อไวรัสอาศัยอยู่ จะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อไวรัส และจะทำให้เชื้อไวรัสกลับเข้ามาทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกถั่วฝักยาวได้อีก นอกจากนี้การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสจะเกิดจากแมลงพาหะทำให้เชื้อไวรัสแพร่กระจายจากแปลงปลูกหนึ่งสู่อีกแปลงปลูกหนึ่งและไปยังวัชพืชซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสทำให้สามารถอยู่ข้ามฤดูปลูกได้และกลับมาทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกแปลงถัดไปและถั่วฝักยาวอีกในฤดูต่อไป เพราะฉะนั้นการกำจัดวัชพืช พืชอาศัยที่เป็นแหล่งของเชื้อไวรัสและแมลง รวมถึงการกำจัดแมลงพาหะ การคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่ปลอดโรค และการวางแผนในการปลูกพืช จะทำให้สามารถตัดวงจรการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส จะช่วยลดปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสได้



บรรณานุกรม

- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2540. ความต้องการวัตถุดิบของโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร ปี 2540. ฝ่ายอุตสาหกรรมเกษตร กองส่งเสริมธุรกิจเกษตร.
- นवलพรรณ งามยี่สุ่น และกิริติกุล ชีกว้าง 2546. “การวินิจฉัยเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายมะลิโดยวิธีการวิเคราะห์ dsRNA และวิธีการถ่ายทอดเชื้อ”. วารสารโรคพืช. 17 (1-2): 12-22.
- นवलพรรณ งามยี่สุ่น และคมสร แสงจินดา. 2548. “การตรวจหาเชื้อไวรัส CMV เชื้อไวรัสหลักในการเข้าทำลายถั่วฝักยาวและแตงกวาในแปลงปลูกพืชสลัดภายหลังการทำ”. ในการประชุมวิชาการ พืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5. ชลบุรี : โรงแรมเวลดัมจอมเทียนบีช.
- เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ พัน อินทร์จันทร์ นวลจันทร์ สีมา และ ลักษณ์า วรณภีร์. 2537. การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาวิธีป้องกันกำจัดโรคไวรัสของพริก และแสดงอย่างมีประสิทธิภาพในสภาพไร่. การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 32 ระหว่าง 3-5 ก.พ. หน้า 223-232.
- จานุทัศน์ ขนบดี. 2532. การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก. โอ. เอส. พรินติ้ง เฮ้าส์ กรุงเทพฯ. 183 หน้า.
- จุมพล สารนาถ และ อรพรรณ วิเศษสังข์. กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร. 2537. โรคถั่วฝักยาว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย สักดี สุนทรสิงห์. 2537. โรคของผักและการป้องกันกำจัด. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 หน้า.
- ธีระ สุตบุตร. 2535. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. โรงพิมพ์ หจก. ฟีนีქซ์พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 310 หน้า
- นवलพรรณ งามยี่สุ่น. 2540. “การตรวจสอบเชื้อไวรัสพืชโดยการแยกสกัดและวิเคราะห์กรดนิวคลีอิกแบบ RNA สายคู่”. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 13(12) : 32-37.
- เมืองทอง ทวนทวี. 2532. ผักบ้านเราสวนผัก 2. หน้า 162-205.
- พิบูลย์ มงคลสุข. 2530. โรคพืชวิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 308 หน้า.
- อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2542. โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันกำจัด. ไทยวัฒนาพานิช จำกัด. 141 หน้า.
- อุคม ฟาร์รูงสา. 2527. “การตรวจสอบเชื้อไวรัสในเมล็ดถั่วฝักยาว และการรับรองสุขภาพเมล็ดพันธุ์ที่ปราศจากโรค”. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- Aftab, M., Asad, S., Khokhar, K. M., Ayub, M. A., Butt, T. B. 1993. “Effect of mungbean yellow mosaic virus on the yield and growth components of asparagus bean.” *Pakistan Journal of Phytopathology*. 5 (1-2) : 58-61.

- Anderson, C.W. 1957. Seed transmission of three viruses in cowpea. **Phytopathology**. 47 : 515.
- Anderson, E.J. Kline, A.S. Morelock, T.E. and Mcnew, R.W. 1996. "Tolerance to blackeye cowpea mosaic potyvirus not correlated with decreased virus accumulation or protection from cowpea stunt disease." **Plant Disease**. 80 (8) : 847 – 852.
- Atiri G.I. and Mih A.M. 1992. "Effect of timing and sequence of inoculation of cowpea aphid – borne and cucumber mosaic on the performance of four cowpea lines." **Fitopatologia Brasileira**. 17 (1) : 53 – 56.
- Bashir, M.; Hampton, R. O. 1993. "Natural occurrence of five seedborne cowpea viruses in Pakistan." **Plant Disease**. 77 (9) : 948-951.
- Bashir, M., and R.O., Hampton. 1996. "Detection and identification of seed – borne viruses from cowpea (*Vigna unguiculata*) germplasm." **Plant Pathol**. 45 : 54 – 58.
- Blancard, D., H. Lecog and M. Pitrat. 1994. A Colour Atlas of Cucurbit Diseases. 297 p.
- Boonham, N., Smith, P., Walsh, K., Tame, J., Morris, J., Spence, N., Benison, J. and Barker, I. 2002. "The detection of tomato spotted wilt virus (TSWV) in individual thrips vectors using real time fluorescent RT – PCR (TaqMan)." **Journal Virol. Meth**. 101 : 37 – 48.
- Chang, C.A. Yang, T.T. Tsan, T.M. and Chen, C.C. 1994. "Production and application of virus free seed to control virus diseases of asparagus beans." **Plant Protection Bulletin Taipei**. 36 (4) : 313 - 325.
- Chen-Hsu, Y.L. and Wang, H.L. 2001. "Analysis of the sequence of coat protein gene of lackeye cowpea mosaic virus in Taiwan" **Plant Pathology Bulletin**. 10 (4) : 165 – 172.
- Choi J., Kim H., Yoon J., Park S., Kim D. and Lee S. 1998. "Detection of virus in fruit and seed of vegetables using RT – PCR." **Korean Journal of Plant Pathology**. 24 (14) : 630 – 635.
- Cigdem, U and Filiz, E. 2005. "Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) status in Turkey and sensitive detection using advanced techniques." **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. 29 : 251-257.
- Colinet, D.; Kummert, J.; Lepoivre, P. and Semal, J. 1994. "Identification of distinct potyviruses in mixedly - infected sweetpotato by the polymerase chain reaction with degenerate primers." **Phytopathology**. 84 (1) : 65-69.
- Colinet, D., Nguyen, M., Kummert, J., Lepoivre, P., and Xia, F.Z. 1998. "Differentiation among potyviruses infecting sweet potato based on genus and virus – specific reverse transcription polymerase chain reaction." **Plant Disease**. 82 : 223 – 229.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Dahal, G. and Albrechtsen, S. E. 1996. "Some studies on cowpea aphid-borne mosaic and pea seed-borne mosaic potyviruses in Nepal." **International Journal of Pest Management**. 42 (4) : 337 - 344.
- Dodds, J.A. and Bar – Joseph, M., 1983. "Double – stranded RAN from plant infected with closteroviruses." **Phytopathology**. 73 : 419 – 423.
- Fald, B. W., Morris, T.L. and Duffus, J.E. 1979. "Unstable infectivity and sedimentable dsRNA Associated with lettuce speckles mottle virus." **Virology**. 96 : 239 – 248.
- Faten, G., Hatem, F., Colette, T., Mohamed, M and Marrakchi, M. 1999. Some biological and molecular properties of pepper veinal mottle virus isolates occurring in Tunisia. **Plant Molecular Biology Repoeter**. 17: 149-158.
- Francki, R. I. B., Mossop, D. W., and Hatta, T. 1979. Cucumber mosaic virus. Description of plant Virus, no. 213 (no. 1 rev) Commonwealth Mycological Institute and Association of Applied Biologists, Kew, England.
- Friess, N. and Maillet, J. 1997. "Influence of cucumber mosaic virus infection on the competitive ability and reproduction of chickweed (*Stellaria media*)." **New Phytologist**. 135 (4) : 667-674.
- Garrido-Ramirez, E. R., Sudarshana, M. R. and Gilbertson, R.L. 2000. "Bean golden yellow mosaic virus from Chiapas, Mexico : Characterization, pseudorecombination with other bean infecting geminiviruses and germ plasm screening." **Phytopathology** .90 : 1224 – 1232.
- Gildow, F.E., Ballinger, M.E. and Rochow, W.F., 1983. "Identification of double stranded RNAs Associated with barley yellow dwarf virus infection in oats." **Phytopathology**. 73 : 1507 – 1572.
- Gillaspie, A.G. Jr. Hopkins, MS. and Pinnow, D.L. 1993. " Relationship of cowpea seed part infection and transmission of blackeye cowpea mosaic potyvirus in cowpea." **Plant Disease**. 77 (9) : 875 – 877.
- Gillaspie, A.G., Jr., Hajimorad, M. R., and Ghabrial, S.A. 1998. "Characterization of a seedborne strain of cucumber mosaic cucumovirus from cowpea." **Plant Disease**. 82 : 419 – 422.
- Gillaspie, A. G., Mitchell. S.E., Stuart. G.W. and Bozarth. R.F. 1999. "RT – PCR method for ectecting cowpea mottle carmovirus in Vigna germ plasm." **Plant Disease**. 83 (7) : 639 – 643.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

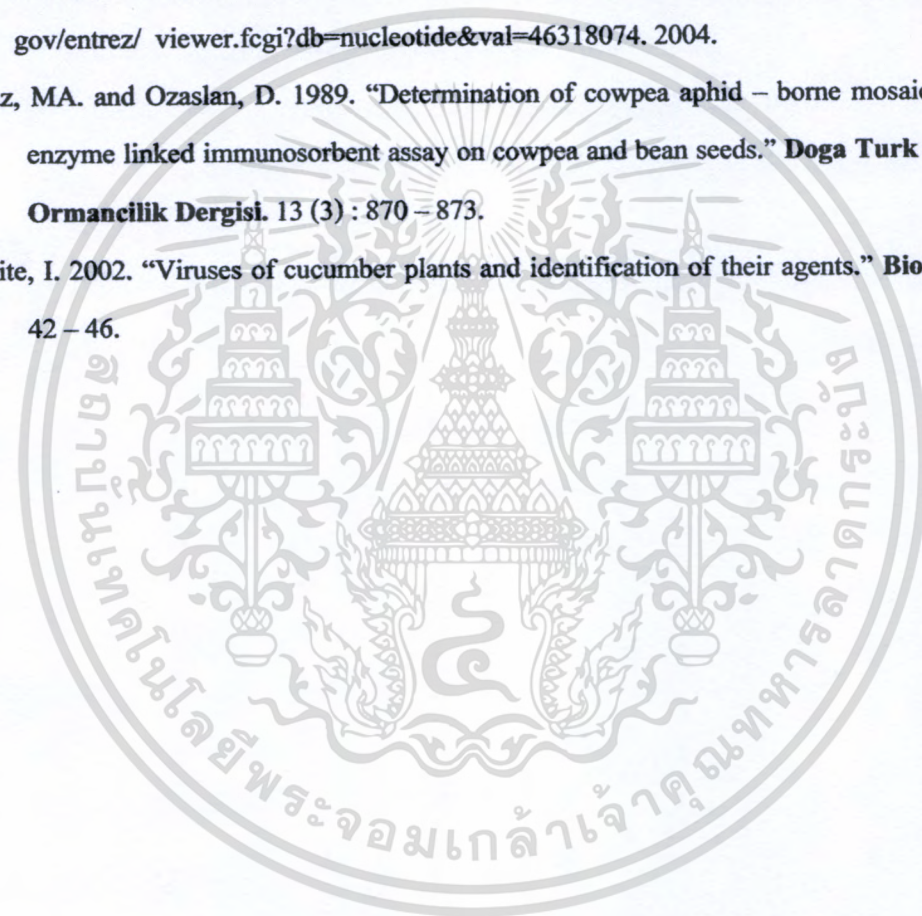
- Gillaspie, A.G., Pio – Ribeiro G., Andrade G.P. and Pappu H.R. 2001. “RT – PCR detection of seedborne Cowpea aphid – borne mosaic virus in peanut.” **Plant Disease**. 85 (7) : 1181 – 1182.
- Green, S.K., and J. S. Kim. 1991. “Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers : A Literature Review.” **Asiar Vegetable Research and Development Center**. 18 :19.
- Grieco F., Saponari M., Alkowni R., Savino V., Martellu G.P., and Garau R., 2000. “Advances in diagnosis of olive viruses.” **Informatore Fitopatologico**. 50 (11) : 49 – 52
- Gubb A. 1994. “Identification of cowpea virus in Zimbabwe.” **Zimbabwe Journal of Agricultural**. 32 (2) : 149 – 155.
- Gumedzoe, M. Y.; Sunu, D. Y.; Thottappilly, G.; Asselin, A. 1990. “Importance of cowpea mottle virus and cowpea yellow mosaic virus in Togo.” **Phytoprotection**. 71 (2) : 85 - 91.
- Gumedzoe, M.Y.D. 1993. “Major virus of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) in Togo.” **Cahiers – Agricultures**. 2 (5) : 352 – 355.
- Gusmini, M., Bacchi, A., Fini, P., Panena, G., Perucca, M., Amade, A. S. and Vicchi, V. 2000. “The role of wild plants and weeds in the epidemiology of CMV on tomato in Lombardia.” GF.2000. **Atti Giornate Fitopatologiche Perugia**. 16-20 aprile. 55-60.
- Hampton, R. O., Albrechtsen, S. E., and Mathur, S. B. 1992. “Seed health (viruses) of *Vigna unguiculata* selections from developing countries.” **Seed Sci. Technol**. 20 : 23 – 38.
- Hadiastono, T. 1996. “A mosaic virus on blackeye cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.)” **Agrivita**. 19 (3) : 118 – 120.
- Hick, R.G.T., Ngamyeesoon, N. and Perkins, C.J. 1988. “Double – stranded RNA analysis as a Method for detecting viruses in woody ornamentals.” **Acta – Hort**. 226(2). 47 – 56.
- Ikegami, M. and Fraenkel – Conrat, H. 1979. “Characterization of double – stranded ribonucleic acid in tobacco leaves, Proc. Natl.” **Acad. Sci. U&A**. 76 : 3637 – 3640.
- Integrated Control of Plant Virus Disease. Proceedings of the International Workshop TARI, Taichung, Taiwan, April 9 – 14 , 1990.
- Jeyanandarajah, P. 1992. “Seed borne viruses infecting three important leguminous food crops in Sri Lanka.” **Seed Science and Technology**. 20 (3) : 629 - 641.
- Jordan, R.L., Ohr, H.D. and Zentmyer, G.A. 1983. “Avocado blackstreak disease. A newly Recognized major disease of avocado in California.” **Phytopathology**. 73 : 970.

- Kundu, J. K., Svoboda, J and Polak, J. 2003. Detection of apple stem grooving virus in different tissues of apple trees throughout the year. **Plant Protection Science**. 39(3): 93-96.
- Kannan, NR. Sabitha, Doraiswamy. Doraiswamy, S. 1993." Management of cowpea aphid brone mosaic virus (CAMV) using plant products." **Madras Agricultural Journal**. 80 (7) : 393 – 395.
- Karki, P.B., Tiwari, K.R. and Bharati, M.P. 1990. "Survey of virus like diseases of cowpea in chitwan and Nawalparasi Districts of Nepal." **Journal of the Institute of Agriculture and Animal Science**. 1990. 11 : 125 – 126.
- Kline, A. S. and Anderson, E. J. 1997. "First Report of Cowpea Aphid – Borne Mosaic Potyvirus from Cowpeas Grown Commercially in the U.S." **Plant Disease**. 81 : (8) 959.
- Korimbocus, J., Danks, C., Barker, I., Coates, D. and Boonham N. 2002. "Improved detection of sugarcane yellow leaf virus using a real – time fluorescent (TaqMan[®]) RT – PCR assay." **Jounal Virol. Meth.** 103 : 109 – 120.
- Mali VR., Mundhe GE. and Shaikh WR. 1989. "Sero – diagnosis of six cowpea seedborne virus in India." **Indian Journal of Virology**. 5 (1 - 2) : 45 – 55.
- Marinho, V. L. A., Daniels, J., Kummert, J., Chandelier, A and Lepoivre, A. 2003. "RT-PCR-ELISA for deection of apple stem grooving virus in apple trees." **Fitopatologia Brasileira**. 28 : 374-379.
- Martelli G.P., Sabanadzovic S., Savino V., abu Zurayk A.R., and Masannat M., 1995. "Vriua – like disease and viruses of olive in Jordan." **Phytopathologia – Mediterranea**. 34 (2) : 133 – 136.
- Meiners, J.P., H.E. Waterworth., F.F. Smith., R. Alconero. And R.H. Lawson. 1977. "A seed transmitted strain of cucumber mosaic virus isolated from bean. **J. Agric Univ. Puerto Rico**. 61 : 137 – 147
- Mirolawa, C. 2004. "Detection of strawberry mottle virus (SMoV) using RT-PCR comparison of two RNA extraction methods." **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**. 12 : 17 - 22.
- Morris, T.J. and Dodds, J.A. 1979. "Isolation and Analysis of Double – Syranded RNA from Virus Infected Plant and Fungal Tissue." **Phytopathology**. 69 : 854 – 858.

- Mumford, R.A., Walsh, K., Barker, I. and Boonham, N. 2000. "Detection of potato mop top virus and tobacco rattle virus using a multiplex real – time fluorescent reverse transcription polymerase chain reaction assay." **Phytopathology**. 90 : 448 – 453.
- Mumfrd, R.A., Skelton, A., Metcalfe, E., Walsh, K. and Boonham, N. 2004. "The reliable detection of barley yellow and mild mosaic virus using real – time PCR (TaqMan)." **Jounal Virol. Meth.** 117 : 153 – 159.
- Nagaraju, N. and K.V. Keshava Murthy. 1994. "Studies on a sap transmissible virus associated with mosaic diseases of cowpea." **Indian Phytoath.** 47(1) : 23 – 26.
- Nagaraju, N. and Murthy, KVK. 1997. "Studies on the relationship between cowpea mosaic virus and its vector *Myzus persicae* Sulz." **Mysore Journal of Agricultural Sciences**. 31(2) : 170 - 174.
- Ngamyeesoon, N. and Hicks,R.G.T. 1998. "Some properties of virus isolated from *Cassia corymbosa* with a mosaic disease." **Acta – Hort.** 234 : 45 – 52.
- Ngo. Bich. Hao. Albrechtsen, SE. and Nicolaisen, M. 2003. "Detection and identification of the Blackeye cowpea mosaic strain of Bean common mosaic virus." **Australasian Plant Pathology**. 32 (4) : 505 – 509.
- Nain, P.S., Narayan, R., Bishnoi, S.S. and Rishi, N. 1994a. "Growth stages of cowpea (*vigna unguiculata*) vis – a – vis seed transmission of viruses." **Indian Journal of Virology**. 10 (1) : 33 – 37.
- Nain, P.S., Rishi, N. Bishnoi, S.S. 1994b. " Profile of viral diseases of cowpea (*Vigna unguiculata*) in northern India." **Indian Journal of Virology**. 10 (2) : 128 – 136.
- Nakamura,S., Honkura,R., Ugaki,M., Ohshima,M. and Ohashi,Y. "Nucleotide sequence of the 3' terminal region of bean yellow mosaic virus RNA and resistance to viral infection in transgenic *Nicotiana benthamiana* expressing its coat protein gene" [Online]. Available : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=19881394>. 1996.
- Ndiaye, M. Bashir, M. Keller, KE. and Hampton, RO. 1993. " Cowpea viruses in Senegal, West Africa : identification, distribution, seed transmission and sources of genetic resistance." **Plant Disease**. 77(10) : 999 – 1003.
- Palukaitis, P., M.J., Roosinck, R.G., Dietzgen, and R.I.B., Francki, 1992. **Cucumber mosaic virus**. **Adv. Virus Res.** 41 : 281 – 345.

- Patil, M.D. and Gupta, B.M. 1992a. "Identification of a seedborne mosaic virus on cowpea." **Indian Journal of Virology**. 8 (2) : 97 – 100.
- Patil, M.D. and Gupta, B.M. 1992b. "Effect of seedborne mosaic virus on growth and yield of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)" **Indian Journal of Virology**. 8 (2) : 101 – 105.
- Puttaraju, H.R., Prakash, H.S. and Shetty, H.S. 2003. "Detection of blackeye cowpea mosaic Potyvirus (BLCMV) in leaves and seeds of cowpea." **Indian Journal of Microbiology**. 43 (1) : 45 – 48.
- Premala, J., Brunt, A.A. and Jeyanandarajah, P. 1996. "Blackeye cowpea mosaic potyvirus, the cause of a severe disease of vegetable cowpea (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) cv. Polonmae in Sri Lanka." **Tropical Science**. 36 (3) : 129 – 137.
- Ratti, C., Budge, G., Ward, L., Clover, G., Rubies – Autonell, C., and Henry, C. 2004. "Detection and quantitation of soil – borne cereal mosaic virus and polomyxa graminis in winter wheat using real – time PCR (TaqMan)." **Journal virol. Meth.** 122 : 95 – 103.
- Sevik, M.A. and Sokmen. 2003. "Virus Infecting Cucurbits in Samsun Turkey." **Plant Disease**. 87 : 341 – 344.
- Shuju, L., HuiZhe, W., ZhenRong, H. and JinAn, P. 2004. "Detection of main causal virus in cucumber by RT – PCR." **Acta Agriculturae Boreali – Sinica**. 19(3) : 100 – 102.
- Singh, Z., Jones R.A.C., Jones M.G.K. 1995. "Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT – PCR." **Plant Disease**. 79 : 713 – 716.
- Sinclair J.B. and P.A. Backman. 1993. **Compendium of soybean diseases**. p 106.
- Takeshita, M., Shigemune, N., Kikuhara, K., Furuya, N., Takanami, Y. 2004. "Spatial analysis for exclusive interactions between subgroups I and II of Cucumber mosaic virus in cowpea." **Virology**. 328 : 45 – 51.
- Thomas, A. Z., Donald, L. H. and Claude, E. T. 1996. **Compendium of Cucurbit Diseases**. Harris Moran Seed Company Petoseed Co., Inc. : 37 – 40.
- Thottappilly, G. and Rossel, H.W. 1992. "Virus disease of cowpea in tropical Africa." **Tropical Pest Management**. 38 (4) : 337 – 348.
- Tzeng H.L.C., Chen M.J., and Tzeng D.D.S. 1996. "An improved method for isolating closteroviral dsRNAs from leafroll affected grapevines." **Plant Pathology Bulletin**. 5 (1) : 47 – 54.

- Vale, CC. do. Lima, JA. De A. and Do, Vale. CC. 1994. "Effects of isolated and mixed infections by viruses from distinct groups in cowpea." **Fitopatologia Brasileira**. 19 (2) : 193 – 197.
- Walkey, D.G.A. 1985. **Applied plant Virology**. 329.
- Walters, H. J., and Dodd, N. L. 1969. "Identification and beetle transmission of an isolate of cowpea chlorotic mottle virus from *Desmodium*(Abstr)." **Phytopathology**. 59 : 1055.
- Wang,H.L. and Fang,C.C."Molecular sequencing and analysis of the viral genomic regions of **Blackeye cowpea mosaic virus Taiwan strain**." Available :<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=46318074>. 2004.
- Yilmaz, MA. and Ozaslan, D. 1989. "Determination of cowpea aphid – borne mosaic virus by enzyme linked immunosorbent assay on cowpea and bean seeds." **Doga Turk Tarim ve Ormancilik Dergisi**. 13 (3) : 870 – 873.
- Zitikaite, I. 2002. "Viruses of cucumber plants and identification of their agents." **Biologija**. 2 : 42 – 46.



ประวัติผู้เขียน

นายคมศร แสงจินดา เกิดเมื่อวันที่ 20 มกราคม พ.ศ. 2521 เป็นคนจังหวัดเพชรบุรี เข้าศึกษา คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปี พ.ศ. 2540 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2544 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท คณะเทคโนโลยีการเกษตร สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2549



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้