สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การลดศักยภาพการแพร่ระบาดโรคไวรัสในแปลงปลูกพืชสลับของแตงกวาและถั่วฝักยาวภายหลังการทำนา

Decreasing Potential of Virus Disease Epidemic in Alternate Cucumber and Yard Long Bean Crop After Rice Growing Season

โดย

ผศ. ดร. นวลพรรณ งามยิ่สุ่น

RCH
SB
608
C88
H3325
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 70388
วัน,เดือน,ปี 12 มี.ค. 2550

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b 11914581
i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การลดศักยภาพการแพร่ระบาดโรคไวรัสในแปลงปลูกแตงกวาสลับกับถั่วฝักยาวภายหลังการทำนา ในเขตพื้นที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี ศึกษาโดยการสำรวจอาการของโรคไวรัสทั้งในถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืชและพืชข้างเคียง รวมทั้งสำรวจชนิดของแมลงในแปลงปลูกตลอดปี ลักษณะการถ่ายทอดเชื้อและการวินิจฉัยชนิดของเชื้อที่เข้าทำลายเพื่อผลในการควบคุมโรคไวรัสอย่างมีประสิทธิภาพ

การสำรวจอาการโรคไวรัสใน ถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืช และพืชข้างเคียง ในแปลงปลูกพืชสลับภายหลังการทำนา พบอาการของโรคไวรัสในถั่วฝักยาวแตกต่างกัน 7 อาการดังนี้ อาการที่ 1) เกิดอาการเขียวเข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อนแผลพอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง อาการที่ 2) ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้ม ใบพอง พื้นใบบางส่วนสีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ อาการที่ 3)แสดงอาการเส้นใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและเส้นใบ พื้นใบสีเขียวอ่อน อาการที่ 4)ใบ ด่างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วใบและเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้นแคระแกร็น อาการที่ 5)ใบเรียวเล็ก ผิดรูปร่าง อาการที่ 6)เกิดอาการด่างเขียวตามเส้นใบและขอบใบโค้งลง อาการที่ 7)ยอดแตกพุ่มแจ้ ในแตงกวาพบอาการของโรคไวรัส 3 ลักษณะอาการ ได้แก่ อาการที่ 1) เกิดอาการด่างเหลืองกระจายทั่วใบ อาการที่ 2) เส้นใบและพื้นใบเป็นสีเหลือง อาการที่ 3) เกิดจุดพองสีเขียวกระจายทั่วใบ พื้นใบมีสีเขียวอ่อน เชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดด้วยวิธี mechanical sap transmission จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวอาการที่ 1-6 และจากใบแตงกวาทั้ง 3 อาการ แต่อาการในแตงกวาที่ถูกถ่ายทอดมีอาการด่างเขียวแตกต่างกับอาการที่ได้จากการสำรวจ นอกจากนี้ยังถ่ายทอดสู่ *Chenopodium amaranticolor*

ส่วนวัชพืชและพืชข้างเคียงที่ทำการสำรวจพบอาการคล้ายโรคไวรัส ได้แก่ อุตพิษแสดงอาการด่างเขียวเป็นร่างแห ผักขมหนามแสดงอาการด่างเป็นจุดเหลืองอ่อน หญ้ายาง แสดงอาการด่างสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ผักเสี้ยนแสดงอาการด่างเหลืองอ่อนใบบิดเบี้ยว ผักแครดแสดงอาการด่างสีเขียวตามเส้นใบครอบจักรวาลแสดงอาการใบลีบเล็ก ในพืชข้างเคียง โหราพาและแมงลักแสดงอาการด่างเหลืองใบบิดเบี้ยว กระเพราแสดงอาการด่างเหลืองกระจายทั่วใบ มะเขือพวงแสดงอาการด่างเขียวอ่อนใบผิดรูปเล็กน้อย มะเขือเทศแสดงอาการด่างเขียวเข้มใบเป็นคลื่น พริกแสดงอาการด่างเขียวอ่อนใบมีขนาดเล็ก ใบผิดรูป

จากการสำรวจแมลงในแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกันและบริเวณรอบๆ แปลงปลูกในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบแมลงได้แก่ แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*)เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis gossypii*) เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ (*Myzus persicae*) เพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียว(*Ekmpoasca devastans* Distant) เพลี้ยกระโดด (*Nilaparvata lugens.* Stal.) ตั๊กแตน(*Cyrtacanthacris tatarica* (Linnaeus) ด้วงเต่า(*Micraspis* sp.)

การตรวจสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดพันธุ์โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวและแตงกวาที่มีจำหน่ายในตลาดอำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรีอย่างละ 5 พันธุ์ดังนี้ พันธุ์ถั่วฝักยาว ได้แก่ พันธุ์ขุนศึกNo.7 พันธุ์สมบูรณ์โชคNo.99 พันธุ์ไผ่ขวาง 005 พันธุ์ลำน้ำชี พันธุ์BIG 1 และพันธุ์แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มีชัย พันธุ์อเมซอน พันธุ์อะตอม พันธุ์อมตะ765 พันธุ์แทมมี่ พบว่าในระยะเวลา2 สัปดาห์ ถั่วฝักยาวเริ่มแสดงอาการของโรคไวรัส และในเวลา 4 สัปดาห์ อาการที่ปรากฏมีความแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4 ลักษณะอาการได้แก่ อาการใบด่างเป็นปื้นเล็กๆตามด้วยอาการเหลืองทั้งใบก่อนที่ใบจะหลุดร่วง อาการด่างเขียวเป็นร่างแหตามเส้นใบ อาการแผลจุดสีเขียวอ่อนกระจายบนใบ ซึ่งอาการทั้ง 3 ลักษณะนี้พบบนใบแท้คู่แรก ส่วนอาการจุดเหลืองบนใบ เส้นใบหดสู่ทำให้ใบบิดเบี้ยว พบปรากฏบนใบ trifoliate คู่แรกเท่านั้น พบเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้ออยู่ที่ 1-10.5 % ในขณะที่ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสบนแตงกวาพันธุ์ต่างๆ ไม่พบการถ่ายทอดเชื้อทางดิน

การตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัสสาเหตุโรคในถั่วฝักยาวและแตงกวาใช้วิธีทางเซรุ่มวิทยาโดยวิธี ELISA พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirus ใน แตงกวาทุกตัวอย่าง แต่ไม่พบในตัวอย่างถั่วฝักยาว การตรวจสอบเชื้อ Cucumber mosaic virus ในถั่วฝักยาวและแตงกวาที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลับที่ทำการเก็บตัวอย่างทุกฤดูตลอดทั้งปี พบว่ามีเชื้อ Cucumber mosaic virus ในทุกตัวอย่างของถั่วฝักยาวและแตงกวา ในขณะที่ผลการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบอนุภาคแบบ flexuous ขนาดประมาณ600- 650 นาโนเมตร และลักษณะอนุภาคแบบ isometric ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30.38 นาโนเมตร

การตรวจสอบเชื้อไวรัส โดยวิธีการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อ และการใช้วิธี RT – PCR และ realtime PCR พบว่าในเกือบทุกตัวอย่างที่ทำการสำรวจมีเชื้อ CMV เข้าทำลาย ทั้งตัวอย่างถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืช และพืชข้างเคียงยกเว้นผักแครด และพบไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup 3 ชนิด ในตัวอย่างถั่วฝักยาวโดยPCR product ที่ได้ band ที่ 1 มีขนาด 1182 bp band ที่ 2 มีขนาด 1219 bp band ที่ 3 มีขนาด 1259 bpและจากการเปรียบเทียบขนาดของ PCR product กับจำนวนและลำดับ nucleotide base ของสมาชิกในกลุ่ม potyvirusgroup และอาการบน *Chenopodium amaranticolor* ทำให้สรุปได้ว่าเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วฝักยาวในแปลงปลูกเป็นการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ 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 gemenivirusgroup

จากการศึกษาพบว่าเชื้อ CMV จัดเป็นเชื้อปัญหาหลักพบอยู่ในตัวอย่างใบพืชที่ตรวจสอบเกือบทุกชนิดและมีการติดมากับเมล็ดถั่วฝักยาวที่ใช้ทำพันธุ์ เชื้อนี้สามารถเข้าทำลายทั้งในลักษณะเชื้อเดี่ยวหรือเข้าทำลายร่วม ซึ่งในกรณีหลังทำให้อาการของโรครุนแรงขึ้นพบทั้งในแตงกวาที่เชื้อนี้เข้าทำลายร่วมกับเชื้อในกลุ่ม gemenivirusgroup และในถั่วฝักยาวในแปลงปลูกซึ่งเป็นการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ CMV และสมาชิกของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup คือเชื้อ BYMV และ BLCMV การสำรวจพบชนิดของเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด คือ *Aphis gossypii* และ *Myzus persicae* ซึ่งจัดเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อ CMV ในลักษณะ non - persistant และชนิดของวัชพืชและพืชข้างเคียง ซึ่งเป็นทั้งพืชอาหารของเพลี้ยอ่อนและพืชอาศัยของเชื้อ การแพร่ระบาดเชื้อ CMV โดยตรงในกรณีของถั่วฝักยาวมาจากการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด ส่วนการเข้าทำลายของเชื้อในช่วงปลูกจะอาศัยเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะหลัก โดยดูดกินอาหารจากวัชพืช และพืชข้างเคียง ซึ่งเป็นแหล่งสะสมเชื้อข้ามฤดูปลูกทำให้เชื้อ CMV สามารถแพร่ระบาด อย่างต่อเนื่องและรุนแรง ในขณะเดียวกันเพลี้ยอ่อน 2 ชนิดนี้ยังเป็นแมลงพาหะของเชื้อ BYMV และ BLCMV และแมลงหวี่ขาวพาหะของเชื้อไวรัสในกลุ่ม gemenivirusgroup ซึ่งเข้าทำลายได้ทั้งถั่วฝักยาวและแตงกวา ในแปลงปลูกพืชสลับของอำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรีที่มีพืชเหล่านี้ปลูกเหลื่อมเวลาตลอดปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The study of decreasing potential of viruses 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 viral 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 , while in cucumber only mosaic symptom on leaves was transferred. 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 with crinkling of leaf on *Lycopersicon esculuentum* and light green mosaic with leaf malformation on *Capsicum frutescencs*. In addition to, the insects found throughout the year were white fly (*Bemisia tabaci*), aphids (*Aphis gossypii* and *Myzus persicae*) , *Ekmpoasca devastans*, *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, SomboonChok No.99, Phai Kwang 005, Lum Num Chee ,Big 1 for yard long bean seeds and Mechai, Amazon, Atom, Amata 765, 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 viewed 2 types of virus particles. One was flexuous rods with 600-650 nm. in length and another was isometric with 30.38nm. in diameter.

Molecular study and nucleic acid analysis using dsRNA detection, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and realtime PCR with CMV primers, degenerate potyvirusgroup 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 nodiiflora.* Moreover , realtime PCR study of infected yard long bean leaves with degenerate poty-group primers , revealed 3 specific bands, suggesting the presence of 3 member of potyvirus. The PCR products 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-persistant manner, while infected weeds and adjacent plants were their hosts. 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 acted as disease reservoir. As a result of this, CMV could spread 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... i

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... iii

สารบัญ..... v

สารบัญตาราง..... vi

สารบัญภาพ..... vii

บทที่ 1 คำนำ..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

ขอบเขตของงานวิจัย..... 3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 18

บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 29

4.1 การสำรวจโรคไวรัสในแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกสลับในพื้นที่เดียวกัน..... 29

4.2 การสำรวจแมลงพาหะ วัชพืชและพืชใกล้เคียงที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส..... 34

4.3 การตรวจสอบด้วยวิธีการทาง เซรุ่มวิทยา..... 37

4.4 การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด(seed transmission)..... 37

4.5 การศึกษาการถ่ายทอดทางดิน (soil transmission)..... 40

4.6 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope)..... 40

4.7 การตรวจสอบกรดนิวคลิอิคสายคู่เชื้อไวรัส (dsRNA detection)..... 42

4.8 การตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยเครื่อง real time PCR..... 45

4.9 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ในการแพร่ระบาดเชื้อไวรัส ในแปลงปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาว..... 51

บทที่ 5 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..... 55

บรรณานุกรม..... 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 แสดงรายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลแตงโดยพาหะต่างๆและลักษณะในการถ่ายทอด 7

2.2 แสดงรายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลถั่วโดยพาหะต่างๆและลักษณะของการถ่ายทอด 13

2.3 พืชอาศัยของไวรัสแตงกวาและถั่วฝักยาว 15

2.3 (ต่อ) พืชอาศัยของไวรัสแตงกวาและถั่วฝักยาว 16

3.1 แสดงแผนผัง การตรวจ ELISA จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวและใบแตงกวาที่แสดงอาการโรคไวรัสที่เก็บมาจากแปลงปลูกเพื่อตรวจสอบหาเชื้อไวรัสกลุ่ม Gemininvirus เชื้อ TYLCV และCMV 21

4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดของถั่วฝักยาวและแตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ 38

4.2 การสำรวจแตงกวาและถั่วฝักยาวในแปลงปลูกและตรวจวินิจฉัยเชื้อไวรัส 51

4.3 การสำรวจและวินิจฉัยเชื้อ CMV ในวัชพืชและพืชข้างเคียง 52

4.4 ชนิดของแมลงที่พบในแปลงและคุณสมบัติในการถ่ายทอด 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 แสดง อุปกรณ์ชุดสกัด UltraClean ™ Plant RNA Isolation Kit	24
3.2 แสดงอุปกรณ์ในชุด Plant concert solution	26
4.1 แสดงอาการโรคไวรัสบนใบถั่วฝักยาวจากการสำรวจ	31
4.2 แสดงอาการโรคไวรัสบนใบแตงกวาจากการสำรวจและการถ่ายทอดเชื้อจากน้ำคั้น	32
4.3 แสดงผลการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวเป็นโรคสู่ต้น *Chenopodium amaranticolor*	33
4.4 แสดงอาการของโรคไวรัสบนวัชพืชและพืชข้างเคียง	35
4.5 แสดงชนิดของแมลงที่สำรวจพบในแปลงปลูก	36
4.6 แสดงอาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดถั่วฝักยาว	39
4.7 แสดงลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสจากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน	41
4.8 แสดง patterns ของ dsRNA จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บรวบรวมจากแปลงปลูก	43
4.9 แสดง patterns ของ dsRNA จากตัวอย่างใบพืชที่แสดงอาการของโรคไวรัส	44
4.10 แสดงผลของอุณหภูมิที่หมาะสมระหว่าง 38 – 50 องศาเซลเซียสสำหรับ degenerate primer pot 1 และ pot 2 ในเครื่อง real time PCR	46
4.11 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อในกลุ่ม potyvirusgroup ด้วย real time PCR	47
4.12 แสดงความแตกต่างของขนาด PCR product จากการตรวจสอบเชื้อใน potyvirusgroup	48
4.13 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ bean yellow mosaic virus 1209 bp	49
4.14 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ blackeye cowpea mosaic virus 12426 bp	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
คำนำ

พืชผักเศรษฐกิจในประเทศไทยมีหลายชนิด รวมทั้งแตงกวา และถั่วฝักยาวซึ่งเป็นพืชผักที่มีคุณค่าทางอาหารสูง นิยมรับประทานทั้งที่เป็นผักสด และสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารในรูปบรรจุกระป๋องและแช่แข็ง ปัจจุบันนี้นอกจากการปลูกเพื่อบริโภคภายในประเทศแล้วยังจัดเป็นพืชส่งออกที่ทำรายได้แก่ประเทศอีกด้วยทำให้ ความต้องการในการบริโภคและการแปรรูปเพิ่มมากขึ้นในแต่ละเดือน รายงานความต้องการแตงกวาเข้าสู่โรงงานในปี 2540 เป็นจำนวนถึง 960 ตันต่อเดือน (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2540)แหล่งปลูกแตงกวาที่สำคัญได้แก่ จังหวัด ลำปาง พิจิตร นครสวรรค์ นครราชสีมา บุรีรัมย์ ขอนแก่น ระยอง ปราจีนบุรีและชลบุรี ส่วนแหล่งปลูกถั่วฝักยาวได้แก่ จังหวัด ปทุมธานี นครปฐม ราชบุรี อ่างทอง สระบุรี นครนายก นครราชสีมา หนองคาย อุดรธานี บุรีรัมย์ มหาสารคาม ร้อยเอ็ด นครสวรรค์ เชียงใหม่ ลำปาง สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราชและตรัง

การปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวในประเทศไทยมักประสบปัญหาโรคและแมลงเสมอทำให้ผลผลิตและคุณภาพของผลและฝักลดลง สาเหตุโรคที่สำคัญได้แก่ เชื้อราแบคทีเรียและโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้พืชเกิดความเสียหายทั้งทางราก ลำต้น ใบ ดอกและผล ส่งผลให้ผลผลิตที่ได้ลดลง คุณภาพต่ำกว่าปกติ จึงไม่เป็นที่ต้องการของตลาด โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสซึ่งทำการป้องกันกำจัดได้ยากเพราะมีพาหะในการนำโรคหลายชนิด ต้นที่เป็นโรคแล้วรักษาไม่หาย ต้องกำจัดโดยการถอนทิ้งและนำไปเผาเมื่อตรวจพบเท่านั้น การควบคุมโรคอย่างมีประสิทธิภาพจึงต้องกำจัดพาหะของเชื้อ เช่น แมลง วัชพืชและพืชอื่นๆ ที่ปลูกในบริเวณนั้นด้วย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวสลับในพื้นที่เดียวกันนั้นอาจเกิดปัญหาจากโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อไวรัสได้เนื่องจาก เชื้อไวรัส หลายชนิดสามารถเข้าทำลายทั้งแตงกวาและถั่วฝักยาว เนื่องจากพืชในตระกูลแตง และตระกูลถั่วจัดเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสหลายชนิด เชื้อไวรัสส่วนใหญ่ สามารถถ่ายทอดได้ด้วยวิธีการสัมผัสและทางน้ำคั้นจากพืชเป็นโรค และทางแมลงพาหะพวกเพลี้ยอ่อน และแมลงอื่นๆ ในลักษณะ non persistent ซึ่งวิธีการถ่ายทอดโดยแมลงนี้จะมีความสำคัญมากเนื่องจากสามารถถ่ายทอดและแพร่กระจายเชื้อไวรัสได้รวดเร็วในระยะเวลาอันสั้น นอกจากนี้เชื้อสามารถอยู่ข้ามฤดูปลูกได้โดยการอาศัยพืชบริเวณข้างเคียงและวัชพืชรอบๆ แปลงปลูก ในกรณีนี้การปลูกพืชสลับอาจจะไม่เป็นการยับยั้งการระบาดของโรค แต่จะเป็นแหล่งสะสมเชื้อเป็นการเพิ่มปริมาณของเชื้อและการระบาดของโรคมากขึ้น

จากปัญหาดังกล่าวจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาชนิดของเชื้อไวรัส การถ่ายทอดเชื้อความสัมพันธ์ของเชื้อไวรัส ต่อแมลงพาหะ วัชพืช และ พืชบริเวณข้างเคียง พาหะของเชื้อไวรัสในดินในแปลงปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกต่อเนื่องกัน หลังจากการทำนาเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมมาควบคุมและป้องกันกำจัดให้ถูกวิธีเพื่อลดการเกิดและการระบาดของโรคไวรัส ลดปัญหาจากการใช้สารเคมีในการกำจัดแมลง ลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมโรค ทำให้ผลผลิตเพิ่มและมีคุณภาพดีเป็นที่ต้องการของตลาดเป็นการเพิ่มรายได้โดยตรงแก่เกษตรกรและยังช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นพิษเนื่องจากการใช้สารเคมีและยาฆ่าแมลง นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้ก็ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

วัตถุประสงค์

1.2.1 สำรวจโรคไวรัสในแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกหมุนเวียนในพื้นที่เดียวกัน

1.2.2 สำรวจแมลงพาหะของเชื้อไวรัส และสำรวจวัชพืชและพืชข้างเคียงที่มีอาการของเชื้อไวรัสเข้าทำลาย

1.2.3 ศึกษาความสัมพันธ์ของการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในแปลงปลูกพืชสลับของแตงกวาและถั่วฝักยาว

1.2.4 หาแนวทางในการลดปัญหาการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสโดยการตัดวงจรพืชอาศัยหรือพาหะของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มรายได้แก่เกษตรกร
2. เพื่อทราบชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกสลับในพื้นที่เดียวกันเพื่อเสนอข้อมูลในการป้องกันกำจัด
3. เพื่อลดปัญหาและป้องกันการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส
4. ลดการใช้สารเคมีและรักษาสภาพแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแตงกวาและถั่วฝักยาว

แตงกวาเป็นพืชที่มีชื่อสามัญว่า cucumber มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cucumis sativus* L. อยู่ในวงศ์ Cucurbitaceae แตงกวาเป็นพืชที่มีลำต้นเป็นเถาเลื้อยมีมือเกาะช่วยพยุงลำต้น ระบบรากเป็นรากแก้ว ใบเป็นใบเดี่ยวมี 3-5 แฉก ดอกตัวผู้และตัวเมียอยู่แยกกันแต่อยู่ในต้นเดียวกัน ดอกตัวผู้จะอยู่เป็นกลุ่ม กลุ่มละ 3-5 ดอก ดอกตัวเมียเกิดเดี่ยวๆ มีสีเหลือง มีการผสมข้ามตามธรรมชาติโดยอาศัยลมและแมลง (จานุ ลักษณ์ ขนบดี. 2535) เป็นพืชที่ปลูกง่าย ปลูกได้ตลอดปีในดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วนปนทราย pH ที่เหมาะสมคือ 5.5 - 6.8 ความชื้นพอเหมาะ ไม่ชอบน้ำขังแฉะ อากาศค่อนข้างแห้ง แสงแดดเต็มที่ อุณหภูมิช่วงที่เหมาะสม 18.3 – 24 องศาเซลเซียส ชื่ออื่นๆ ที่ใช้เรียกกัน ในภาคเหนือ ได้แก่ แตงขี้ไก่ แตงขี้ควาย แตงช้าง แตงร้าน แตงปี แตงยาง แตงเห็น และแตงอ้ม (เมืองทอง ทวนทวี. 2532)

ถั่วฝักยาวเป็นพืชที่มีชื่อสามัญว่า yard long bean มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Vigna sesquipedalis* Wight. จัดอยู่ในวงศ์ Leguminosae ถั่วฝักยาวมีลำต้นเลื้อย การเลื้อยของเถามีทิศทางการพันทวนเข็มนาฬิกา ลักษณะดอกแบบ raceme เกิดตามมุมใบหรือซอกใบ แต่ละช่อมี 1-6 ดอกย่อย เป็นดอกสมบูรณ์เพศ กลีบดอกมี 5 กลีบ มีการผสมตัวเองสูง เมล็ดพันธุ์มีขนาดใหญ่ ปลูกค่อนข้างง่าย โตเร็ว ปลูกได้ทุกฤดูกาล แต่ชอบอากาศค่อนข้างร้อน ฝนไม่ชุก ขึ้นได้ในดินแทบทุกชนิด แต่ชอบดินร่วน ปนทราย pH ที่เหมาะสม 5.6 – 6 ความชื้นพอเหมาะ แสงแดดเต็มที่ อุณหภูมิช่วงที่เหมาะสม 16 – 24 องศาเซลเซียส แต่ช่วงที่เจริญได้ดี 15 – 35 องศาเซลเซียส เจริญเติบโตช้าในสภาพอุณหภูมิต่ำ ชื่ออื่นๆ ที่ใช้เรียกกัน ในภาคเหนือ คือ ถั่วดอ ถั่วปี ถั่วสายเสื้อ ถั่วไส้หมู ถั่วหมาแน่า ถั่วหลา และถั่วพุงหมู ในปราจีนบุรี

2. โรคไวรัสที่เข้าทำลายและทำความเสียหายกับแตงกวาและถั่วฝักยาว

2.1 โรคไวรัสที่เข้าทำลายและทำความเสียหายกับแตงกวา

เนื่องจากแตงกวาและถั่วฝักยาวจัดเป็นพืชผักที่มีรายงานการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสหลายชนิด เพราะพืชทั้ง 2 จัดเป็นพืชอาศัยที่ดีของเชื้อและเชื้อไวรัสสาเหตุส่วนใหญ่สามารถถ่ายทอดได้ด้วยวิธีการสัมผัส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดเป็นพาหะ เช่น แมลง ไส้เดือนฝอย วัชพืช พืชที่ปลูกข้างเคียง เชื้อไวรัสที่พบบ่อย และก่อให้เกิดความเสียหายแก่พืชตระกูลแตงรวมถึงแตงกวาในทุกแหล่งปลูก คือเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ทำให้แตงกวา แสดงอาการลำต้นแคระแกร็นอย่างรุนแรง ใบมีอาการด่างเหลืองอย่างชัดเจน ตามด้วยลักษณะใบที่ผิดรูปร่าง ขนาดใบลดลง (Francki. *et al.* 1979) ปัญหาการเกิดโรคไวรัส ในแตงกวาในประเทศไทย มีการศึกษาอาการและเชื้อสาเหตุ โดยการสำรวจโรคไวรัสในแตงและพบว่าแตงทุกชนิดแสดงอาการใบด่างเนื่องจากเชื้อไวรัสเข้าทำลาย (ธีระ สูตะบุตร. 2535 ; เครือพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติปกรณ์. 2537) ในกรณีของเชื้อ watermelon mosaic virus (WMV) อาการที่พบบนแตงคือใบด่างสีเหลือง หรือเขียวอ่อนสลับสีเขียวเข้ม ใบขรุขระเป็นคลื่น ใบมีขนาดลดลงและเสียรูปทรง ในปี 2537 ศักดิ์ สุนทรสิงห์ รายงานโรคยอดหงิกของแตงร้านและแตงกวาเกิดจากเชื้อ leaf curl virus (LCV) ทำให้ต้น แคระแกร็นใบมีขนาดเล็กลง เส้นใบนูนหนาเด่นชัดขึ้น ใบหดสั้น มีสีเข้มกว่าปกติ ต้นหยุดการเจริญ ไม่ติดดอกออกผล เชื้อไวรัสมีเพลี้ยไฟเป็นแมลงพาหะ การรายงานการแพร่ระบาด และการถ่ายทอดเชื้อโดย ศักดิ์ สุนทรสิงห์ (2537) รายงานว่าโรคใบด่างลาย cucumber mosaic virus (CMV) สามารถระบาดโดยทางน้ำคั้น โดยมีแมลงต่างๆหลายชนิดเป็นพาหะ แต่ที่สำคัญที่สุด คือ เพลี้ยอ่อน ชนิดต่างๆ ได้แก่ *Aphis gossypii, Aulacorthum circumfexum, A. solani, Myzus persicae, Mueroslplum euphorbiae, Phorodon humuli* และ *P. canabis* การถ่ายทอดโรคมีด้วยกันหลายทางคือ ทางเมล็ดพันธุ์ที่วางขายทั่วไปตามท้องตลาด เชื้อจะติดไปกับเมล็ด ถ่ายทอดโดยวิธีการสัมผัสจากมนุษย์และเครื่องมือทางการเกษตร ทางวัชพืชและพืชปลูกที่อยู่บริเวณใกล้เคียงโดยผ่านทางเต่าทอง ตั๊กแตนและเพลี้ยอ่อนหลายชนิด เช่น *M. persicae, A. fabae, A.medicagenis, A. gossypii* และ *Macrosiphum euphorbiae* (พิบูลย์ มงคลสุข. 2530) อนงค์ จันทร์ศรีกุล (2542) ศึกษาอาการของแตงที่ถูกเชื้อไวรัสเข้าทำลายพบว่า โรคใบด่าง อาการสีเขียวสลับเหลือง เนื้อใบนูนพองบริเวณที่มีสีเขียว เนื้อใบขรุขระ หงิกไม่สม่ำเสมอ ขอบใบม้วนงอ ต้นแคระแกร็นเป็นพุ่ม ใบที่ยอดมีสีเหลืองผิวเป็นคลื่นเล็กน้อยการเจริญของยอดอ่อนหยุดชะงัก

นอกจากนี้ในต่างประเทศพบรายงานการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในพืชตระกูลแตงโดย Green and kim (1991) รายงานว่าเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) สามารถเข้าทำลายพืชได้มากกว่า 770 ชนิด ทำให้เกิดอาการ ใบด่างมีสีเหลืองซีด ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ใบเล็กเรียวยาวเป็นแผลแห้งตายและ Atiri and Mih. (1992) รายงานว่าเชื้อ CMV จำนวน 5 isolate ที่รวบรวมในสวนผัก ผลไม้ที่ Agricultural college ในประเทศอินเดียสามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้นได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ใน *Chenopodium amaranticolor, Cucummis sativus, Gomphrena globosa, Nicotiana glutinosa, N. tabacum, Physalis floridana, Vigna unguiculata* และ *Zinnia degans* และวัชพืช 3 ชนิด ได้แก่ *Amaranthus virids, 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 เช่นประเทศออสเตรเลีย ได้หวันและประเทศทางตอนใต้ของแถบเมดิเตอร์เรเนียน อาการที่พบเส้นใบด่างสีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนเริ่มปรากฏที่ใบแท้ใบแรก ขอบใบย่น โค้งงอ Thomas *et al.* (1996) พบว่าแตงส่วนใหญ่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ papaya ring spot –W (PRSV –W)โดยใบจะแสดงอาการเด่นชัด มีอาการแคระแกร็นรุนแรง ใบด่างเขียว บิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ใบเล็กแหลมเรียวยาว นอกจากนี้ Zitikaite (2002) รายงานลักษณะอาการโรคไวรัสของแตงกวาว่ามีอาการเส้นใบด่างและโปร่งแสง (vein clearing mosaic and mottling) ใบผิดรูปร่าง และการเจริญเติบโตช้า และ Sevik and Sokmer (2003)ทำการสำรวจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โรคไวรัส ในพื้นที่ปลูกแตง 45 แปลงในประเทศ ตุรกี ระหว่างเดือน มิถุนายนถึงตุลาคม ในปี 1999 - 2000 และตรวจสอบเชื้อด้วยวิธีการ enzyme – linked immunosorbent assay พบการเข้าทำลายของเชื้อ watermelon mosaic virus (WMV), zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) และ cucumber moasic virus (CMV) คิดเป็น 53.9, 38.38 และ 20.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลแตงมีสิ่งมีชีวิตเป็นพาหะหลายชนิด (ตารางที่ 2.1)

2.2 โรคไวรัสที่เข้าทำลายและทำความเสียหายกับถั่วฝักยาว

ปัญหาโรคไวรัสที่เกิดกับถั่วฝักยาวมีรายงานในประเทศไทยโดย ธีระ สูตะบุตร (2535) รายงานโรคไวรัสใบด่างเหลืองถั่วฝักยาวซึ่งเกิดจาก cowpea aphid - borne mosaic virus (CAMV) ทำความเสียหายแพร่ระบาดกว้างขวางในเขตที่มีการปลูกถั่วฝักยาว ทำให้เกิดอาการใบด่างสีเหลือง อาการชัดเจนในใบแก่ บนใบอ่อนที่มีอาการรุนแรงใบจะมีสีเหลือง ใบม้วนงอและผลผลิตลดลงกว่าปกติโดยเชื้อสาเหตุสามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ด เมื่อนำไปปลูกอาการจะปรากฏที่ใบเลี้ยงหรือใบจริงคู่แรก โดยใบมีอาการด่างสีเหลืองสลับเขียวอ่อนหรือขาวซีด ต้นกล้าแคระแกร็นใบม้วนงอ เชื้อนี้ยังสามารถถ่ายทอดด้วยเพลี้ยอ่อน จุมพล สาระนาค และอรพรรณ วิเศษสังข์ (2537) รายงานว่าโรคใบด่างของถั่วฝักยาวเกิดจากเชื้อไวรัสโดย มีแมลงปากดูดเป็นพาหะ อาการคือใบด่างสีเหลืองสลับเขียวอ่อนและข เวซีด เชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านเมล็ดได้ โดยพบว่า เชื้อ cowpea chlorotic mottle virus (CCMV) ทำให้เกิดอาการใบด่างซึ่งเชื้อสามารถถ่ายทอดผ่านทางน้ำค้นโดยมีแมลง bean leaf bettle (*Cerotoma trifurcate*) และ spotted cucumber bettle (*Diabrotica undecimpunctata* howard) เป็นพาหะที่สำคัญ (Walters and Dodd. 1969) อนงค์ จันทร์ศรีกุล(2542) ทำการสำรวจอาการของถั่วฝักยาวที่เกิดจากเชื้อไวรัสเข้าทำลายพบว่าใบถั่วฝักยาวแสดงอาการต่างกันดังนี้ ใบด่าง อาการใบเป็นลายสีเหลืองอ่อนและเขียว สีของใบไม่สม่ำเสมอและใบม้วนงอ โรคใบหยักเป็นคลื่น อาการ ใบอ่อนโค้งงอเนื้อใบเป็นคลื่น ยอดหงิกชะงักการเจริญ ยอดแห้งและดอกร่วง โรคใบด่างลายวงกลมสีเหลือง ใบสีเหลืองซ้อนกันหลายชั้น ใบเหลืองและร่วงก่อนกำหนด นอกจากนี้ Thomas *et al.* (1996) รายงานรายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลแตงโดยพาหะต่างๆและลักษณะในการถ่ายทอด ดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 รายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลแตงโดยพาหะต่างๆและลักษณะในการถ่ายทอด 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 necrossis	Tombusvirus	M
	Melon necrotic spot	Carnovirus	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	...[b]	M
	Cucurbit yellow stunting disordder	Closterovirus	...
	Lettuce infectious yellows	Closterovirus	...
	Squash leaf curl	Geminivirus	M
	Watermelon chlorotic stunt	Geminivirus	...

[a] M = mechanical transmission , S = seed transmission

[b] The 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 นอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อทั้งสองนี้ รวมถึงเชื้อ 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 ถั่วแสดงอาการใบเหลืองอย่างรุนแรงโดยเฉพาะใบอ่อนในขณะที่ฝักมีลักษณะบิดเบี้ยว ขนาดลดลง โดยคาดว่าเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายคือเชื้อ cowpea golden mosaic virus ในปี 1990 –1991 จากรายงานใน Proceeding of International Workshop TARI พบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชตระกูลถั่ว รวมถึงถั่วฝักยาวในประเทศไต้หวัน 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) จากการสำรวจโรคไวรัสที่ติดมากับเมล็ดถั่วต่างๆที่ใช้ในการบริโภคในประเทศศรีลังกา พบเชื้อ blackeye cowpea mosaic (BLCMV), bean common mosaic (BCMV) และเชื้อ cucumber mosaic virus ในถั่วฝักยาวและถั่วเขียว Patil and Gupta (1992 a) วินิจฉัยเชื้อไวรัสสาเหตุโรคเมล็ดด่างบนถั่วฝักยาว ในประเทศอินเดียโดยการศึกษาลักษณะการถ่ายทอดเชื้อ อาการบนพืชอาศัย คุณสมบัติทางชีววิทยาและฟิสิกส์ของน้ำคั้นพืชเป็นโรค สัณฐานวิทยาของเชื้อ 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 (CMeV), เชื้อ cowpea mosaic comovirus (CPMV), เชื้อ southern bean mosaic sobemovirus (SBMV), เชื้อ cowpea mild mottle carlvirus (CMMV) และเชื้อ cowpea strain of tobacco mosaic tobamovirus (TMV-CS) พบว่าการเข้าทำลายของเชื้อ CPMV มากที่สุดและยังพบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสเหล่านี้มากกว่า 1 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อดังกล่าวก่อให้เกิดโรคในพืชป่าต่างๆเช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบเชื้อ 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 และเมือง North-West Frontier ในประเทศปากีสถาน ในช่วงฤดูร้อนระหว่างปี 1990-1991 โดยวิธี direct antigen coating หรือ DAS-ELISA พบชนิดของเชื้อต่างๆและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคดังนี้ 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 ตามลำดับNdiaye *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) โดยเชื้อเหล่านี้สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้Nain *et al.* (1994 b) ศึกษาชนิดของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดอาการด่างที่แตกต่างกันบนถั่วฝักยาวที่พบในเขตตอนเหนือของประเทศอินเดียโดยการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา 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) พบว่าในประเทศซิมบัคเว (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 ในถั่วฝักยาวในเขตพื้นที่ตะวันออกของเกาะชวา ประเทศอินโดนีเซีย

Kline and Anderson (1994) พบว่าเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) เป็น 1 ในเชื้อไวรัสที่มีรายงานการเข้าทำลายถั่ว (cowpea) ทั้งในทวีปแอฟริกา เอเชีย และทวีปยุโรป แต่พบรายงานของเชื้อนี้เข้าทำลายงา (sesame ; *Sesamum indicum* L.) ในแปลงปลูกใกล้เคียงกับแปลงที่นำถั่วเข้ามาปลูกเป็นครั้งแรก ในรัฐจอร์เจีย (Georgia) เมื่อปี 1997 และตรวจพบเปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านทางเมล็ดของเชื้อนี้ถึง 28 เปอร์เซ็นต์ จากการนำเมล็ดถั่วพันธุ์ Chinese Red ที่เก็บเกี่ยวจากแหล่งปลูกทางใต้ของรัฐเท็กซัส (Texas) มาปลูกโดยต้นถั่วที่เป็นโรคแสดงอาการด่างอย่างชัดเจนบนใบ primary และ trifoliate 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 นอกจากนี้ตรวจพบเชื้อในส่วนต่างๆของดอกจากต้นที่เป็นโรคและในส่วนของ embryonic axis และ cotyledon ของเมล็ด

Nagaraju and Murthy (1994) รายงานเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) เชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการใบด่าง (mosaic) และเส้นใบด่างเป็นปื้น (vein banding) โดยเชื้อสามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้นและทางเมล็ด มีเพลี้ยอ่อน *A. craccivora* และ *M. persicae* เป็นแมลงพาหะคุณสมบัติของน้ำคั้นพืชเป็นโรคมี 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 การศึกษาอาการบนพืชอาศัยพบว่าเชื้อก่อให้เกิดอาการแผลจุดเหลืองและเส้นใบหนาบน *Cucurbita moschata* และ *Luffa acutangula* และยังทำให้เกิดอาการใบด่างแบบ systemic บน pigeon pea guar *Phaseolus aureus* และ *P. vulgaris* ในขณะที่บน *C. amaranticolor* และ *C. quinoa* พบอาการแผลจุดเหลืองบนใบที่ปลูกเชื้อ Dahal and Albrechtsen (1996) รายงานเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วฝักยาวในประเทศเนปาลทำให้เกิดอาการใบด่างและเส้นใบด่างเป็นปื้นๆอย่างชัดเจน เชื้อถ่ายทอดโดยน้ำคั้นและเพลี้ยอ่อน อนุภาคมีลักษณะขดงอเป็นเกลียวเชือก (flexuous rod) ขนาด 770 นาโนเมตร และทำปฏิกิริยาทางเซรุ่มวิทยากับ antiserum ของเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus เมื่อตรวจสอบด้วยวิธี immunosorbent electron microscopy (ISEM)

Patil and Gupta (1992 b) ศึกษาผลกระทบของเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวที่มีอาการด่างเนื่อง จากการติดเชื้อ bean common mosaic ต่อการเจริญเติบโตและผลผลิต พบว่าในต้นถั่วที่เป็นโรคความสูงของต้นลดลง จำนวนฝักต่อต้นลดลงแต่จำนวนเมล็ดต่อฝักไม่แตกต่างจากต้นปกติ ผลผลิตโดยรวมของถั่วฝักยาวพันธุ์ Pusa-4 ลดลงถึง 42.4 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาทดสอบในสภาพแปลงปลูก Aftab *et al.* (1993) ศึกษาผลกระทบต่อผลผลิตและการเจริญเติบโตของถั่วฝักยาวเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อ mungbean yellow mosaic virus bigeminivirus ในแหล่งปลูกในเมือง Islamabad ประเทศปากีสถาน โดยถั่วฝักยาวแสดงอาการแผลจุดสีเหลืองหรือแผลจุดสีซีดขาวบนใบ แมลงพาหะของเชื้อคือแมลงหวี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขาว (*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 พืชบางกลุ่มแสดงอาการของโรคช้าและไม่รุนแรงในขณะที่บางกลุ่มแสดงอาการด่างอย่างรุนแรงถึงแม้ว่าจากการตรวจสอบปริมาณความเข้มข้นของเชื้อโดยวิธี ELISA พบความเข้มข้นอยู่ในระดับเดียวกัน และเมื่อศึกษาการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ blackeye cowpea mosaic และ cucumber mosaic virus โดยการตรวจสอบด้วยวิธีเดียวกันพบว่าระดับความเข้มข้นของเชื้อ CMV ลดลงเมื่อพืชมีอายุมากขึ้นแต่การเข้าทำลายร่วมของเชื้อทั้งสองทำให้พืชแสดงอาการใบด่างและแคระแกร็นอย่างรุนแรง

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 ungniculata* 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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) สาเหตุโรคใบด่างรุนแรงในถั่วฝักยาวพันธุ์ 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 เดิมโดยความรุนแรงของอาการไม่เกี่ยวกับ satellite RNA และ strain ดังกล่าวยังเป็นสมาชิกของ Subgroup I ของ CMV strains โดยการวิเคราะห์ด้วย nucleic acid hybridization assays

Nagaraju and Murthy (1994) รายงานการศึกษาโรคด่างของ Cowpea (*Vigna unguiculata* L) ที่มีอาการด่าง สีเขียวเข้มสลับเขียวอ่อนทั่วทั้งต้น และเส้นใบด่างสีเขียวเข้ม เชื้อสามารถถ่ายทอดได้โดยแมลงพาหะได้แก่ เพลี้ยอ่อน *A. craccivora* และ *M. perisicae* และทางวิธีน้ำคั้น Thottappilly and Rossel (1992) พบว่าในประเทศแอฟริกา มีรายงานแมลงพาหะของเชื้อไวรัส ได้แก่ 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 แมลงหวี่ขาว 2 ชนิด ถ่ายทอดเชื้อ cowpea golden mosaic virus และ cowpea mild mottle virus ส่วนใหญ่พบในเขตตะวันออกและทางใต้ของประเทศ Nagaraju and Murthy (1997) รายงานการถ่ายทอดเชื้อ cowpea mosaic comovirus โดยเพลี้ยอ่อน *M. persicae* แบบ non-persistent

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสเข้าทำลายถั่วฝักยาวโดย มีแมลงเป็นพาหะต่อไปนี้ (ตารางที่ 2.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 รายชื่อและกลุ่มของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชในตระกูลถั่วโดยพาหะต่างๆ และลักษณะ ของการถ่ายทอด

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

[a]M = mechanical transmission , S = seed transmission , G = grafting

[b]The 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 กิโลกรัมต่อเฮคเตอ ในขณะที่แปลง controlได้ 540 กิโลกรัมต่อเฮคเตอ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 พืชอาศัยของไวรัสแตงกวาและถั่วฝักยาว ที่มา : (ธีระ สูตะบุตร. 2535. ; อุดม ฟ้ารุ่งสาง. 2527)

ชนิดของพืชอาศัยของเชื้อไวรัส	
ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ
Family Leguminosae	
Arachis hypogaea L.	ถั่วลิสง
Cassia occidentalis L.	ขี้เหล็กเทศ
Cssia tora L.	ชุมเห็ดไทย
Crotalaria juncea L.	ปอเทือง
Lupinus albus L.	-
Phaseolus aureus L.	ถั่วเขียว
P. vulgaris L.	ถั่วแขก
Pisum sativum L.	ถั่วลันเตา
Stizolobium deeringianum Bort.	ถั่วพร้า
Vicia faba L.	ถั่วปากอ้า
Vigna sesquipedalis Wight.	ถั่วฝักยาว
V. sinensis Savi ex Hassk.	ถั่วพุ่ม
Sesamun orientale L.	งา
Family Solanaceae	
Capsicum frutescens L.	พริก
C. minimum Roxb.	พริกขี้หนู
Dutura stramonium L.	ลำโพง
Lycopersicon esculentum Mill	มะเขือเทศ
Petunia hybrida Vilm.	พีทูเนีย
Solanum melongena L.	มะเขือยาว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) พืชอาศัยของไวรัสแตงกวาและถั่วฝักยาว

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

3. การตรวจสอบเชื้อไวรัสโดยเทคนิคทาง molecular biology

3.1 การตรวจสอบโดยการแยกสกัด dsRNA

การนำเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลิอิคแบบ 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

นวลพรรณ งามยิ่สุ่น (2540) รายงานว่าเทคนิคในการสกัด dsRNA ของเชื้อไวรัสเพื่อการตรวจสอบและวินิจฉัยชนิดของเชื้อแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน

1. การแยกสกัด dsRNA (dsRNA extraction)

2. การใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก dsRNA ของเชื้อ (electrophoresis) โดยอาศัยหลักการที่ว่าโมเลกุลของสารจะเคลื่อนที่ไปในสนามไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 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 โดยใช้กล่องแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 260-302 นาโนเมตร.

วิธีนี้นำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสและกลุ่มของเชื้อไวรัสหลายชนิด เช่น การตรวจสอบเชื้อไวรัสยาสูบ (Ikegami and Fraendel-Conrat. 1979)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) ไวรัสใบด่างของ *Cassia corymbosa* (Ngamyeesoon and Hick. 1998) และไวรัสในไม้ประดับเนื้อแข็ง (Hicks *et al.* 1988) และMartelli *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 สาเหตุของโรคใบหงิกขององุ่นโดยใช้เนื้อเยื่อส่วน cortical พบว่าการใช้สารละลายนี้ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ปริมาณของ dsRNA เพิ่มขึ้น Grieco *et al.*(2000) รายงานว่าวิธีการตรวจสอบขั้นพื้นฐานโดย mechanical transmission สู่พืชทดสอบในพืชบางชนิดยังประสบปัญหาจึงนำเทคนิคทางด้าน molecular detection ได้แก่ dsRNA extraction และ molecular hybridization มาตรวจสอบเชื้อไวรัสในต้น olive ในประเทศอิตาลี พบเชื้อไวรัสจากตัวอย่างจำนวน 210 จากตัวอย่างทั้งหมด 286 ตัวอย่าง และพบว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ผลิมีปริมาณของ dsRNA สูงกว่าตัวอย่างที่เก็บในฤดูใบไม้ร่วง นอกจากนี้จากการศึกษาของ (นวลพรรณ งามยิ่สุ่น และกีรติกุล ชีกว้าง. 2546) รายงานว่าการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อจากใบมะลิที่แสดงอาการเป็นโรคจากสภาพธรรมชาติ และมะลิที่แสดงอาการใบด่างจากการถ่ายทอดเชื้อโดย *M. persicae* โดยใช้ Rneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) พบการเข้าทำลายของเชื้อ Cucumber mosaic virus (CMV) นวลพรรณ งามยิ่สุ่น และ คมศร แสงจินดา (2548) รายงานการตรวจเชื้อ CMV ในถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกับการทำนารวมทั้งการตรวจวัชพืชและพืชข้างเคียงด้วยวิธี dsRNA extraction

70388

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การสำรวจโรคไวรัสในแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกสลับในพื้นที่เดียวกันและการถ่ายทอดโรคด้วยวิธีการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้น (Mechanical sap transmission)

ทำการเก็บตัวอย่างใบแตงกวาและใบถั่วฝักยาวที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัสในแปลงปลูกของเกษตรกรในท้องที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี ซึ่งเป็นหนึ่งในพื้นที่ที่ทำการปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวหลังจากการทำนา โดยทำการสำรวจตลอดทั้งปีสลับแปลงปลูกหมุนเวียนไป และทำการบันทึกลักษณะอาการก่อนเก็บใบที่แสดงอาการใส่ในถุงพลาสติกโดยแยกใส่ถุงในแต่ละอาการต่างๆกันแล้วใส่ในกล่องน้ำแข็งเพื่อนำกลับมายังห้องปฏิบัติการ ทำการถ่ายรูปเพื่อบันทึกลักษณะอาการต่างๆทั้งจากใบแตงกวาและถั่วฝักยาว ก่อนแบ่งใบพืชเป็นโรคออกเป็น 2 ส่วนโดยส่วนหนึ่งนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นช่องแช่เข็งที่ (-4 องศาเซลเซียส) อีกส่วนนำมาทำการถ่ายทอดเชื้อโดยการนำตัวอย่างใบที่แสดงอาการมาทำการปลูกเชื้อไวรัสในแตงกวาและถั่วฝักยาวด้วยวิธีการ Mechanical sap transmission โดยก่อนปลูกเชื้อทำการคลุมต้นกล้าแตงกวาและถั่วฝักยาวอายุ 7-10 วันด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ 24 ชั่วโมง เพื่อให้พืชมีสภาพอ่อนแอเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ การปลูกเชื้อคือนำใบพืชที่แสดงอาการของโรคไวรัสที่ชัดเจนและคาดว่ามีปริมาณความเข้มข้นของเชื้ออยู่สูงโดยเฉพาะใบอ่อน บดกับสารละลาย 0.05 M Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 M pH 7.2 ในโกร่งที่แช่เย็น ใช้อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อสารละลาย buffer 2-4 มิลลิลิตร และใส่ผง celite เล็กน้อยเพื่อไปทำให้พืชเกิดบาดแผลเพื่อให้เชื้อสามารถผ่านเข้าสู่พืชได้ง่าย หลังจากนั้นใช้นิ้วมือที่สะอาดทาน้ำคั้นเบาเบาไปยังใบเลี้ยง (cotyledon) ของต้นกล้าแตงกวาหรือบนใบแท้คู่แรกของถั่วฝักยาวที่ต้องการปลูกเชื้อ ทำเครื่องหมายหรือสัญลักษณ์ลงบนใบให้ทราบว่าเป็นใบที่ทำการปลูกเชื้อเพื่อให้ง่ายต่อการสังเกตเมื่อต้องติดตามผลการแสดงอาการ หลังจากนั้นพรมน้ำเล็กน้อยลงบนใบพืชเพื่อเป็นการล้างเศษพืชที่ติดอยู่ในน้ำคั้นที่ทาออกจากใบพืชแล้วคลุมพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ชุบน้ำทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จึงเอาวัสดุคลุมออก จากนั้นนำพืชที่ปลูกเชื้อทั้งหมดไปเก็บในโรงเรือนกันแมลง สังเกตและบันทึกลักษณะอาการที่เกิดขึ้นเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาเชื้อไวรัสต่อไป

2. การสำรวจแมลงพาหะ วัชพืชและพืชใกล้เคียงที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างแมลงที่พบในแปลงปลูกพืชทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี มาจัดจำแนกชนิดของแมลงและบันทึกช่วงเวลาที่พบ ทำการเก็บตัวอย่างวัชพืชและพืชบริเวณใกล้เคียงที่พบแสดงอาการคล้ายโรคไวรัสทุกช่วงฤดูโดยเก็บแยกชนิดใส่ถุงพลาสติกเก็บในกระติกน้ำแข็งนำกลับมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องปฏิบัติการ เพื่อบันทึกภาพและจำแนกชนิดพืชก่อนแบ่งใบที่แสดงอาการส่วนหนึ่งไปปลูกเชื้อบนต้นกล้าแตงกวาและถั่วฝักยาว ด้วยวิธีการ Mechanical sap transmission ตามวิธีดังกล่าวข้างต้น (3.2.1)

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 พร้อมทั้งหลุมตัวอย่างเปรียบเทียบใบพืชเป็นโรคและใบพืชปกติเปรียบเทียบ(ตารางที่3.1)

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

4) หยดน้ำคั้นตัวอย่างพืชทดสอบที่บดใน 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 เพื่อมิให้มีหยดน้ำคั้นติดอยู่ที่หลุม 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 แล้วทำการล้าง 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 แล้วดูด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ชั่วโมง เพื่อรอให้สีเหลืองของปฏิบัติชัดเจนยิ่งขึ้น

8) สังเกตและบันทึกการทดสอบ โดยการสังเกตระดับสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในแต่ละตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับสีของปฏิกิริยาที่ปรากฏบนตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรค (disease control) และตัวอย่างใบพืชปกติ (healthy control) และวิเคราะห์ผลจากค่า absorbance ของสีจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยค่า absorbance ของพืชเป็นโรคจะมีค่าสูงกว่าพืชปกติอย่างน้อย 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

4. การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด (seed transmission)

การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ดโดยการนำเมล็ดพันธุ์ที่มีการจำหน่ายในตลาดอำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรีซึ่ง เป็นพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมปลูกมาทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดพันธุ์ โดยใช้ถั่วฝักยาวทั้งหมด 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ขุนศึกNo. 7 พันธุ์สมบูรณ์โชคNo.99 พันธุ์ไผ่ขวาง005 พันธุ์ลำน้ำชี พันธุ์BIG1 และแตงกวาทั้งหมด 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มีชัย พันธุ์อเมซอน พันธุ์อะตอม พันธุ์อมตะ765 และพันธุ์แทมมี่ โดยการทดสอบเมล็ดพันธุ์ๆละ 200 เมล็ด นำมาเพาะในตะกร้าที่เตรียมดินไว้แล้ว โดยใช้ดินที่ปราศจากเชื้อด้วยการนำดินไปอบฆ่าเชื้อก่อนนำมาปลูก จากนั้นใส่เมล็ดถั่วฝักยาว หรือแตงกวา แต่ละพันธุ์ลงไปพันธุ์ละ 200 เมล็ด รดน้ำเช้าและเย็น และเก็บไว้ในโรงเรือนป้องกันแมลงหลังจากนั้นประมาณ 3 – 4 วัน ต้นกล้าจะเริ่มงอก สังเกตอาการต้นพืชตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนถึงประมาณ 2 สัปดาห์ จากนั้นบันทึกลักษณะอาการ คำนวณเปอร์เซ็นต์ต้นเป็นโรคและเก็บตัวอย่างต้นที่แสดงอาการของโรคไวรัสนำไปปลูกเชื้อเพื่อทำการวินิจฉัยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.1 แผนผัง การตรวจ ELISA จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวและใบแตงกวาที่แสดงอาการโรคไวรัสที่เก็บมาจากแปลงปลูกเพื่อตรวจสอบหาเชื้อไวรัสกลุ่ม Gemininvirus 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)

5. การศึกษาการถ่ายทอดโดยไส้เดือนฝอยในดิน (soil transmission)

การศึกษาการถ่ายทอดโดยไส้เดือนฝอยทำโดยการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวา ที่แสดงอาการของเชื้อไวรัสโดยเก็บบริเวณรอบๆ โคนต้นของพืชที่แสดงอาการของโรคไวรัสที่ความลึกประมาณ 30 เซนติเมตร และนำมาทำการทดสอบการถ่ายทอดโดยไส้เดือนฝอยโดยนำดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกมาใส่ในกระถางที่เตรียมไว้ แล้วนำเมล็ดถั่วฝักยาวพันธุ์ลำน้ำชี และแตงกวาพันธุ์อมตะ765 ซึ่งเป็นพันธุ์ที่นิยมปลูกในขณะนี้ โดยใช้เมล็ดในการเพาะจำนวนพันธุ์ละ 200 เมล็ด รดน้ำเช้าและเย็น นำไปเก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง หลังจากนั้นประมาณ 3 – 4 วัน ต้นกล้าจะเริ่มงอก และสังเกตลักษณะอาการตั้งแต่ระยะต้นกล้าที่เกิดขึ้นจนถึงประมาณ 2 สัปดาห์ ว่าปรากฏลักษณะอาการของโรคหรือไม่ เมื่อครบ 2 สัปดาห์จึงนำต้นที่ไม่ปรากฏอาการของโรคมาทำการปลูกเชื้อ (back test) สู่ต้นกล้าแตงกวาและถั่วฝักยาวอีกครั้ง ในกรณีที่พบต้นที่แสดงอาการจะทำการเก็บตัวอย่างต้นที่แสดงอาการของโรคไวรัสนำไปปลูกเชื้อเพื่อทำการวินิจฉัยต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (electron microscope; EM)

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

7. การวินิจฉัยโดยการตรวจสอบกรดนิวคลิอิคของเชื้อไวรัส (nucleic acid analysis)

7.1 การแยกสกัดกรดนิวคลิอิคของเชื้อไวรัส (RNA extraction)

การแยกสกัดกรดนิวคลิอิคของเชื้อไวรัสจากใบพืชที่เป็นโรคทำโดยการใช้ชุดสกัด UltraClean ™ Plant RNA Isolation Kit. บริษัท MO BIO Laboratories.Inc. ซึ่งมีอุปกรณ์ในชุดดัง(ภาพที่ 3.1) และการใช้น้ำยา Plant concert solution บริษัท Invitrogen ซึ่งมีอุปกรณ์ในชุดดัง (ภาพที่ 3.2) โดยมีวิธีในการสกัดต่างกันในแต่ละขั้นตอนดังต่อไปนี้

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

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

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

3) ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย PMR4 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) ดูดสารละลายจากข้อ 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 นาที เพื่อให้สารละลายที่ยังค้างอยู่บน 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 ที่ได้ที่ อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 โดยใช้ 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 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที โดยการเอียงหลอด หลังจากนั้นจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

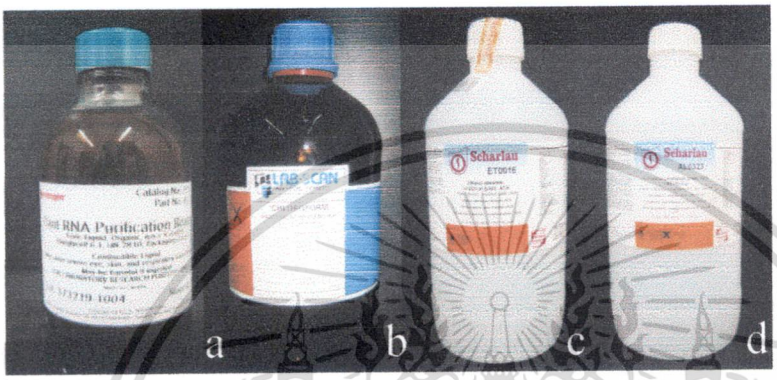
2) ดูดน้ำใสใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 M ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติม Chloroform ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3) ดูดน้ำใสส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ ก่อนเติม 2 - propanol เท่ากับปริมาณน้ำใสที่ได้ หลังจากนั้น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา10 นาที

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

7.2 การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสโดยการตรวจสอบdsRNAของเชื้อไวรัส (Double- stranded RNA detection)

การตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายใบแตงกวา ใบถั่วฝักยาว ใบวัชพืชและพืชใกล้เคียงทำโดยการนำใบพืชที่แสดงอาการมาทำการสกัด RNA ตามวิธีและขั้นตอนการสกัดในหัวข้อ 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 เข้าด้วยกันก่อนหยอดลงในแต่ละหลุม ของ agarose gel สำหรับตัวเปรียบเทียบมาตราฐานคือ Lambda DNA ที่ถูกย่อยด้วย enzyme Hind III

การตรวจสอบและวิเคราะห์ผลโดยนำ gel มาทำการย้อมสีด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น เวลา 15 นาที เพื่อดูลักษณะการเคลื่อนที่ของ dsRNA โดยใช้กล่องแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 260 – 302 นาโนเมตร จากลักษณะการเคลื่อนที่ของ band dsRNA ที่ตรวจสอบได้นั้น สามารถนำมาเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐาน ที่ใช้ แล้วคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างที่ต้องการโดยเปรียบเทียบกับ linear curve การยืนยันผลว่า band ที่ได้เป็น dsRNA ทำโดยนำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.15 M ที่มี enzyme RNase เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วนำมาตรวจสอบบนกล่องแสง ultraviolet อีกครั้ง แถบ band ของ dsRNA จะยังคงอยู่ไม่ถูกย่อยสลาย

ตัวอย่างใบพืชที่นำมาทำการตรวจสอบเชื้อไวรัสด้วยวิธีนี้คือ ใบถั่วฝักยาวที่แสดงอาการของโรคไวรัสจากการสำรวจในแปลงและการถ่ายทอดผ่านทางน้ำค้นจำนวน 6 ตัวอย่าง ตัวอย่างจากใบแตงกวาที่ได้จากการถ่ายทอดน้ำค้นจากแตงกวาเป็นโรค 3 ตัวอย่างจากแปลงปลูก และใบของวัชพืชและพืชข้างเคียงแปลงปลูกที่ทำแสดงอาการของโรคไวรัสจากการสำรวจตลอดปี

8. การตรวจสอบด้วยเครื่อง real time PCR

การตรวจสอบด้วย real time PCR โดยใช้ เครื่อง CHROMO 4 Real – Time PCR ของ บริษัท ธีระเทรดดิงส์ ใช้น้ำยา Quantitect SYBR®Green ปริมาตร 12 ไมโครลิตร และใช้ degenerate primer Pot1(5'ATTBTCDATRCACCA 3') และdegenerate primer Pot2 (5' TGYGAYGCBGATGGY TC 3') ปริมาตรอย่างละ 0.5 ไมโครลิตร และ Template cDNA 10 ไมโครลิตร ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถั่วฝักยาว น้ำ 2 ไมโครลิตร โดยการศึกษา gradient temperatureที่อุณหภูมิที่ 38, 42, 45 และ 50 องศาเซลเซียส และใช้ตัวอย่างของเชื้อไวรัส passionfruit เป็น postive control

โปรแกรม real time PCR ของ เชื้อ potyvirusgroup

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

9. การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ในการแพร่ระบาดเชื้อไวรัสในแปลงปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาว

โดยนำข้อมูลจากการศึกษาทั้งหมดมาหาความสัมพันธ์โดยเฉพาะในแง่ของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายร่วมทั้งในแตงกวาและถั่วฝักยาว สิ่งมีชีวิตที่เป็นพาหะ รวมทั้งแมลง ไส้เดือนฝอยในดิน วัชพืช และพืชข้างเคียง ซึ่ง อาจเป็นพืชอาศัยที่ดีของเชื้อทำให้เป็นแหล่งสะสมเชื้อไวรัสที่เข้าทำลาย แตงกวาหรือถั่วฝักยาวในรุ่นต่อไป การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแปลงปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวนี้จะเป็นประโยชน์ในการป้องกันกำจัดโดยการตัดวงจรของเชื้อและโรคที่สัมพันธ์กัน เป็นการลดการแหล่งสะสมเชื้อหรือเป็นการลดพาหะของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การสำรวจโรคไวรัสในแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกสลับในพื้นที่เดียวกัน

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

1) อาการเขียวเข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อนแผลพอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง

2) อาการใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้มเกือบหมด ใบพอง พื้นใบบางส่วนสีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ

3) อาการเส้นใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและเส้นใบพื้นใบสีเขียวอ่อน

4) อาการด่างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วใบและเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้นแคระแกร็น

5) อาการใบเรียวเล็ก ผิดรูปร่าง

6) อาการด่างเขียวตามเส้นใบและขอบใบโค้งลง

7) อาการยอดแตกพุ่มแจ้

และพบว่าในแตงกวาพบอาการของโรคไวรัส 3 ลักษณะอาการ (ภาพที่ 4.2 a - c) ได้แก่

1) อาการด่างเหลืองกระจายทั่วใบ

2) อาการด่างเหลืองตามเส้นใบพื้นใบสีเหลือง

3) อาการจุดพองสีเขียว กระจายทั่วใบ พื้นใบสีเหลืองอ่อน

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยวิธี Mechanical sap transmission ของถั่วฝักยาวที่แสดงอาการเป็นโรคไวรัส ลงบนใบเลี้ยงคู่แรกของถั่วฝักยาวพบว่าถั่วฝักยาวจากตัวอย่างอาการที่ 1-6 สามารถถ่ายทอดได้ด้วยน้ำคั้น ในขณะที่ตัวอย่างอาการที่ 7 ไม่สามารถถ่ายทอดได้ด้วยน้ำคั้น ส่วนแตงกวาในทุกตัวอย่างที่แสดงอาการของโรคไวรัสพบว่า สามารถถ่ายทอดด้วยวิธี Mechanical sap transmission ลงบนใบเลี้ยงคู่แรกของแตงกวาได้ โดย อาการที่ 1-3 ของแตงกวาเมื่อทำการถ่ายทอดเชื้อปรากฏอาการเหมือนกัน (ภาพที่ 4 .2 d) ผลของความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้นใบถั่วฝักยาวที่เป็นโรคจึงนำเอา isolate ของถั่วฝักยาวจากตัวอย่างอาการที่1-6 และ isolate ของแตงกวาจาก 1 ตัวอย่าง มาทำการศึกษาชนิดของเชื้อในขั้นตอนต่อไป

การทดสอบพืชอาศัยโดยการนำตัวอย่างของถั่วฝักยาวตัวอย่างที่ 1 - 6 มาทำการปลูกเชื้อลงบนพืชทดสอบ *Chenopodium amaranticolor* หลังจากนั้นประมาณ 2 สัปดาห์พบว่า *Chenopodium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

amaranticolor ที่ทำการปลูกเชื้อไวรัสโดยตัวอย่างที่ 1 แสดงอาการด่างตามเส้นใบและอาการจุดแผลแห้งตายบนใบปลูกเชื้อ ตัวอย่างที่ 2 แสดงอาการ จุดเหลืองจากนั้นเปลี่ยนเป็นแดงบนใบที่ปลูกเชื้อ ตัวอย่างที่ 3 แสดงอาการด่างตามเส้นใบและอาการจุดแผลแห้งตายบนใบปลูกเชื้อ ตัวอย่างที่ 4 แสดงอาการจุดแผลแห้งตายขอบแผลสีแดงบนใบปลูกเชื้อ ตัวอย่างที่ 5 แสดงอาการจุดแผลแห้งตายขอบแผลสีแดงบนใบปลูกเชื้อ ตัวอย่างที่ 6 แสดงอาการด่างตามเส้นใบและอาการจุดแผลแห้งตายบนใบปลูกเชื้อ (ภาพที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.1 อาการโรคไวรัสบนใบถั่วฝักยาวจากการสำรวจ

a) อาการที่ 1 แสดงลักษณะอาการเขียวเข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อนแผลพอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง

b) อาการที่ 2 แสดงลักษณะอาการใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้ม เกือบหมด ใบพอง พื้นใบบางส่วนสีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ

c) อาการที่3 แสดง ลักษณะอาการเส้นใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและเส้นใบพื้นใบสีเขียวอ่อน

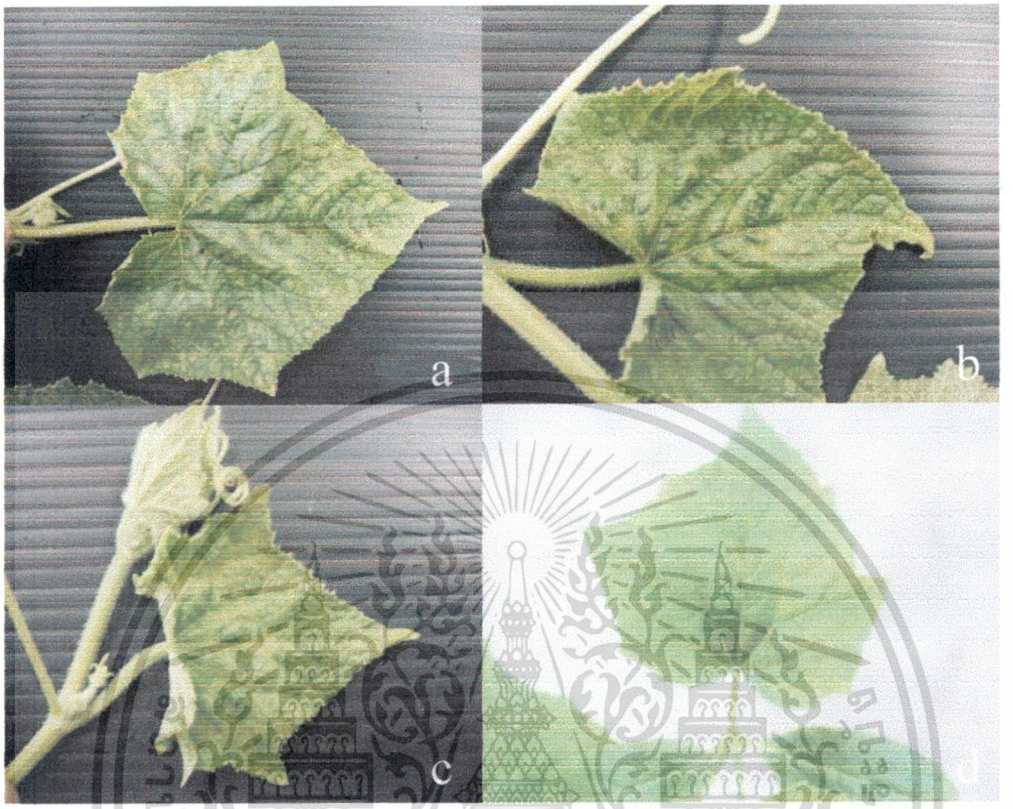
d) อาการที่ 4 แสดงลักษณะอาการ ด่างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วใบและเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้นแคระแกร็น

e) อาการที่ 5 แสดงลักษณะอาการ ใบเรียวเล็ก ผิดรูปร่าง

f) อาการที่ 6 แสดงอาการด่างเขียวตามเส้นใบขอบใบโค้งลง

g) อาการที่ 7 แสดงลักษณะอาการยอดแตกพุ่มแจ้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 อาการโรคไวรัสบนใบแตงกวาจากการสำรวจและการถ่ายทอดเชื้อจากน้ำคั้น

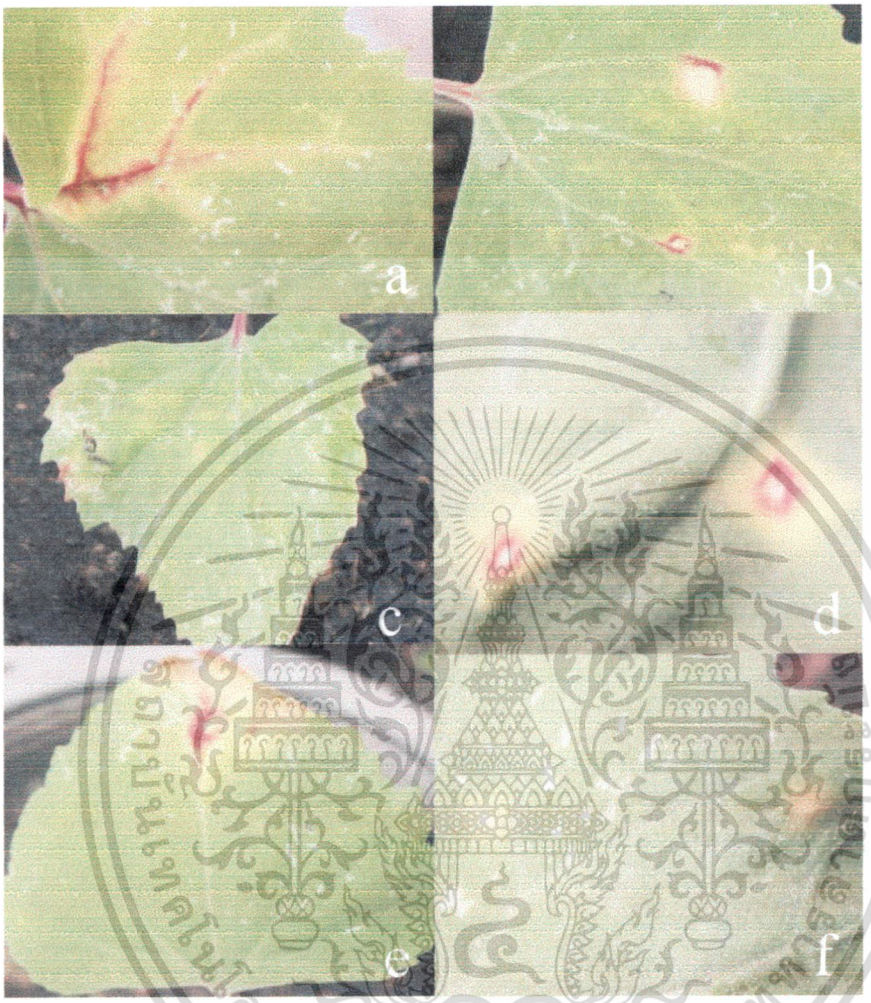
a) อาการที่ 1 แสดงลักษณะอาการ ด่างเหลืองกระจายทั่วใบ

b) อาการที่ 2 แสดงอาการ ด่างเหลืองตามเส้นใบ พื้นใบสีเหลือง

c) อาการที่ 3 แสดงลักษณะอาการ จุดพองสีเขียว กระจายทั่วใบ พื้นใบสีเหลืองอ่อน

d) อาการใบด่างบนแตงกวาภายหลังการถ่ายทอดเชื้อจากน้ำคั้นจากใบแตงกวาที่เป็นโรค จากใบแตงกวาอาการที่ 1 - 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ผลการปลูกเชื้อด้วยน้ำคั้นจากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวเป็นโรคสู่ต้น *Chenopodium amaranticolor*.

a) และ b) เชื้อตัวอย่างที่ 1 ปรากฏอาการด่างตามเส้นใบและอาการจุดแผลแห้งตายบนใบปลูกเชื้อ

c) เชื้อตัวอย่างที่ 2 ปรากฏอาการจุดเหลืองจากนั้นเปลี่ยนเป็นแดงบนใบที่ปลูกเชื้อ

d) และ e) เชื้อตัวอย่างที่ 3 และ ตัวอย่างที่ 6 ปรากฏ อาการด่างตามเส้นใบและอาการจุดแผลแห้งตายบนใบปลูกเชื้อ

f) เชื้อตัวอย่างที่ 4 และ ตัวอย่างที่ 5 อาการจุดแผลแห้งตายขอบแผลสีแดงบนใบปลูกเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การสำรวจแมลงพาหะ วัชพืชและพืชใกล้เคียงที่แสดงอาการคล้ายโรคไวรัส

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างวัชพืชและพืชใกล้เคียงที่พบว่าแสดงอาการของโรคไวรัสในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบวัชพืชและพืชข้างเคียง ได้แก่ อุตพิษ (*Typhonium trilobatum* Schott.) แสดงอาการด่างเขียวร่างแห ผักขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.) แสดงอาการด่างเป็นจุดเหลืองอ่อน หญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* L.) แสดงอาการด่างสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ใบผิดรูป ผักเสี้ยน (*Cleome gynandra* L.) แสดงอาการด่างเหลืองอ่อนใบบิดเบี้ยว ผักแครด (*Synedrella nodiflora* L.) แสดงอาการด่างสีเขียวตามเส้นใบ โหระพา (*Ocimum basilicum*) แสดงอาการด่างเหลืองใบบิดเบี้ยว แมงลัก (*Ocimum canum* L.) แสดงอาการด่างเหลืองใบบิดเบี้ยว กะเพรา (*Ocinum sanctu*) แสดงอาการด่างเหลืองกระจายทั่วใบ ครอบจักรวาล (*Abutilon hirtum*) แสดงอาการใบลีบเล็ก มะเขือพวง (*Solanum torvum*) แสดงอาการด่างเขียวอ่อนใบผิดรูปเล็กน้อย มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) แสดงอาการด่างเขียวเข้มใบเป็นคลื่น พริก (*Capsicum frutescencs* L.) แสดงอาการด่างเขียวอ่อนใบมีขนาดเล็ก ใบผิดรูป (ภาพที่ 4.4)

จากการสำรวจแมลงในแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกันและบริเวณรอบๆ แปลงปลูกในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบแมลงได้แก่ แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*)เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis gossypii*) เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ (*Myzus persicae*) เพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียว (*Nephotettix virescens*) เพลี้ยกระโดด(*Nilaparvata lugens.*) ตั๊กแตน (*Cyrtacanthacris tatarica*) ด้วงเต่า(*Micraspis* sp.) (ภาพที่4.5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.4 อาการของโรคไวรัสบนวัชพืชและพืชข้างเคียง

a) อาการใบด่างเหลือง ใบผิดรูปร่าง บนใบกะเพรา (*Ocimum sanctum*)

b) อาการด่างเขียว ใบเป็นคลื่น บนใบมะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*. Mill.)

c) อาการใบเล็ก บนใบครอบจักรวาล (*Abutilon hirtum* (Lam.) Sweet)

d) อาการด่างสีเขียวอ่อนสลับเข้มใบผิดรูป บนผักแครด (*Synedrella nodiflora* (L.)

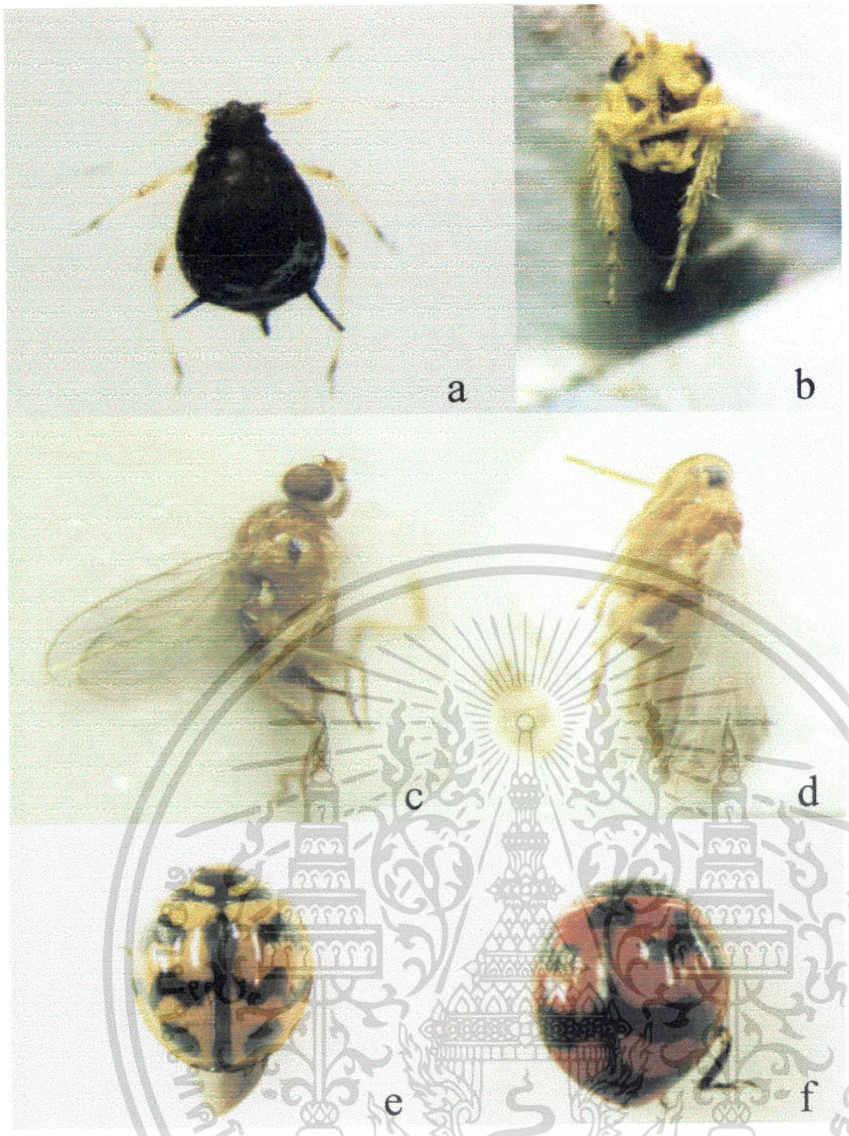
e) อาการด่างเขียวร่างแห บนใบอุตพิษ (*Typhonium trilobatum* Schott.)

f) อาการด่างเขียวอ่อน กระจายทั่วใบ บนใบมะเขือพวง (*Solanum Torvum* Sw.)

g) อาการด่างสีเขียวอ่อน ใบผิดรูปร่าง ใบเล็กลง บนใบพริก (*Capsicum frutescencs* L.)

h) อาการด่างเขียวเข้มตามเส้นใบ ใบมีลักษณะเป็นคลื่น ใบผิดรูป บนใบหญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* L.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 ชนิดของแมลงที่สำรวจพบในแปลงปลูกตลอดปี

a) เพลี้ยอ่อน (*Aphis gossypii*)

b) เพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียว (*Nephotettix virescens*)

c) แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*)

d) เพลี้ยกระโดด (*Nilaparvata lugens.* Stal.)

e) และ f) ด้วงเต่า (*Micraspis* sp.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การตรวจสอบด้วยวิธีการทาง เซรุ่มวิทยา

การตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยา ด้วยวิธีการทาง ELISA (Enzyme-linked immunosorbent Assay) แบบ indirect โดยใช้เซรุ่มของเชื้อในกลุ่ม Geminivirus และ TYLCV ตรวจหาเชื้อไวรัส พบว่าตัวอย่างถั่วฝักยาวทุกตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลับที่ทำการสำรวจทุกฤดู ตลอดทั้งปีไม่พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirus และ TYLCV แต่ในแตงกวาทุกตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลับที่ทำการสำรวจทุกฤดูตลอดทั้งปี พบเชื้อไวรัสเป็นสมาชิกในกลุ่ม Geminivirus ทุกตัวอย่าง แต่ไม่ใช่เชื้อไวรัส TYLCV

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

4. การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด (seed transmission)

การตรวจสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวและแตงกวาที่มีจำหน่ายในท้องตลาด อำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรีอย่างละ 5 พันธุ์ดังนี้ พันธุ์ถั่วฝักยาว ได้แก่ พันธุ์ขุนศึกNo.7 พันธุ์สมบูรณ์โชคNo.99 พันธุ์ไผ่ขวาง005 พันธุ์ลำน้ำชี พันธุ์B!G 1 และพันธุ์แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มีชัย พันธุ์อเมซอน พันธุ์อะตอม พันธุ์อมตะ765 พันธุ์แทมมี่ โดยการนำเมล็ดพันธุ์ดังกล่าว พันธุ์ละ 200 เมล็ดมาปลูกในดินที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ และนำกระถางที่เพาะเมล็ดมา เก็บไว้ในโรงเรือนกันแมลง รดน้ำเช้าเย็น สังเกตการงอกและการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าในระยะเวลา 2 สัปดาห์ ถั่วฝักยาวเริ่มแสดงอาการของโรคไวรัส และในเวลา 4 สัปดาห์ อาการที่ปรากฏมีความแตกต่างกัน 4 ลักษณะอาการได้แก่ อาการใบด่างเป็นปื้นเล็กๆตามด้วยอาการเหลืองทั้งใบก่อนที่ใบจะหลุดร่วง อาการด่างเขียวเป็นร่างแหตามเส้นใบ อาการแผลจุดสีเขียวอ่อนกระจายบนใบ ซึ่งอาการทั้ง 3 ลักษณะนี้พบบนใบแท้คู่แรก และเมื่อต้นถั่วมีการเจริญเป็นใบ trifoliate ก็ไม่ปรากฏอาการดังกล่าว ส่วนอาการจุดเหลืองบนใบ เส้นใบหดย่นทำให้ใบบิดเบี้ยว พบปรากฏบนใบ trifoliate คู่แรกเท่านั้น (ภาพที่4.6) ในขณะที่ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสบนแตงกวาพันธุ์ต่างๆ เปอร์เซ็นต์ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทางเมล็ดพันธุ์ของถั่วฝักยาวและแตงกวาดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 เปอร์เซ็นต์การถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดของถั่วฝักยาวและแตงกวา ทั้ง 5 พันธุ์

เมล็ดพันธุ์พืช	เมล็ดที่แสดงอาการโรคไวรัสคิดเป็น%				
	ใบด่าง	ใบลาย	ใบหยัก	แผลจุด	รวม
ถั่วฝักยาวพันธุ์ขุนศึกNo.7	10	0.5	-	-	10.5
ถั่วฝักยาวพันธุ์สมบูรณ์โชคNo.99	-	0.5	-	2	2.5
ถั่วฝักยาวพันธุ์ไผ่ขวาง005	3.5	1	5	-	9.5
ถั่วฝักยาวพันธุ์ลำน้ำชี	0.5	-	-	0.5	1
ถั่วฝักยาวพันธุ์BIG 1	3	-	2	-	5
แตงกวาพันธุ์มีชัย	-	-	-	-	0
แตงกวาพันธุ์อเมซอน	-	-	-	-	0
แตงกวาพันธุ์อะตอม	-	-	-	-	0
แตงกวาพันธุ์อมตะ765	-	-	-	-	0
แตงกวาพันธุ์แทมมี่	-	-	-	-	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่4.6 อาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดถั่วฝักยาว

a) อาการใบด่างเขียวเป็นปื้น ก่อนที่จะทำให้ใบเหลืองทั้งใบและร่วง

b) อาการด่างเขียวเป็นร่างแหตามเส้นใบ

c) อาการแผลจุดสีเขียวอ่อนกระจายทั่วใบ

d) อาการจุดเหลืองบนใบเส้นใบหดย่น ใบบิดเบี้ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

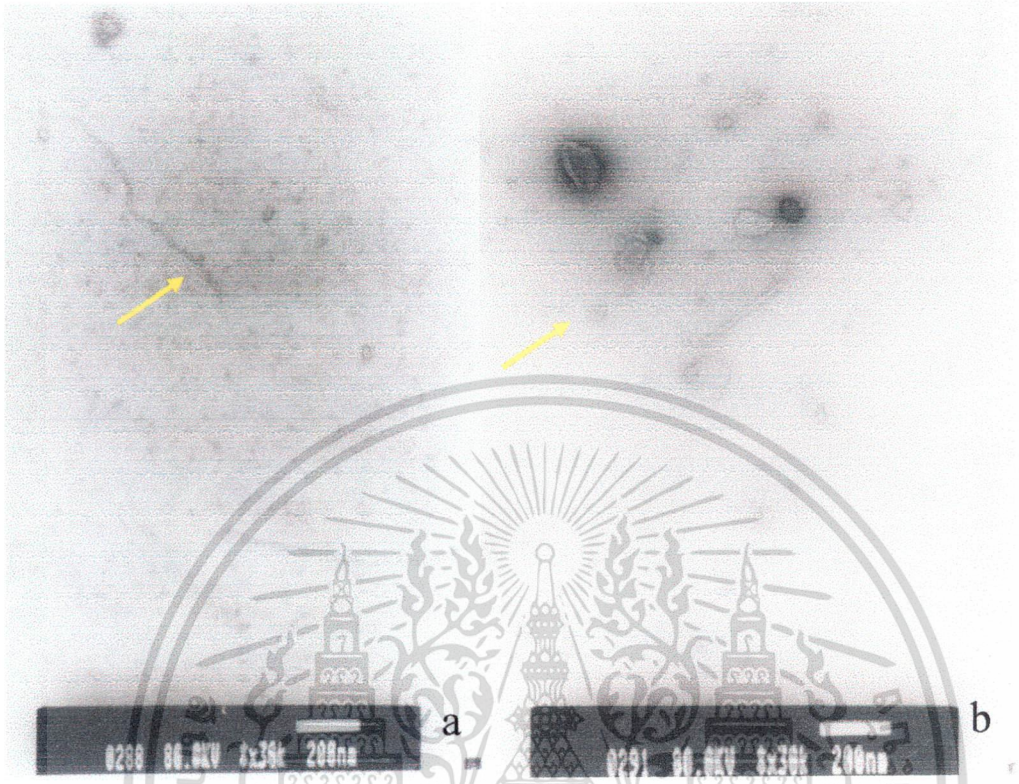
5. การศึกษาการถ่ายทอดทางดิน (soil transmission)

การศึกษาการถ่ายทอดทางดินโดยไส้เดือนฝอยทำโดยการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวา ที่แสดงอาการของเชื้อไวรัส โดยการสุ่มเก็บจากบริเวณรอบๆโคนต้นของพืชในแปลงที่แสดงอาการของโรคไวรัสที่ความลึกประมาณ 30 เซนติเมตร แปลงละ 30 จุด (พื้นที่ 1 ไร่) และนำดินตัวอย่างที่เก็บมาจากแปลงปลูกมาผสมรวมกันแล้วจึงมาใส่ในกระถางที่เตรียมไว้ก่อนนำเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวพันธุ์ลำน้ำชี และแตงกวาพันธุ์อมตะ 765 อย่างละ 200 เมล็ด ต่อตัวอย่างดิน 1 กระถาง นำกระถางที่เพาะเมล็ดไปเก็บในโรงเรือนกันแมลงรดน้ำเช้าเย็น สังเกตการงอกและการเจริญเติบโตของเมล็ดอย่างต่อเนื่อง แล้วทำการตรวจสอบเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าเมล็ดที่งอกขึ้นมาไม่แสดงอาการของโรคไวรัส และเพื่อยืนยันผลนี้จึงมีการทำ back test โดยนำใบถั่วฝักยาวและใบแตงกวาที่ไม่มีอาการของโรคไวรัสไปทำการปลูกเชื้อโดยวิธี mechanical sap transmission สู่ต้นกล้าถั่วฝักยาวและแตงกวา และสังเกตอาการอีก 4 สัปดาห์ไม่ปรากฏอาการของโรคไวรัสในพืชที่ทำการปลูกเชื้อเลย แสดงว่าเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในแปลงปลูกทั้งในถั่วฝักยาวและแตงกวาไม่ถ่ายทอดในดิน

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 ลักษณะอาการใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้มเกือบหมด ใบพอง พื้นใบบางส่วนสีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ 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 ลักษณะอาการด่างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วใบและเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้นแคระแกร็น ลักษณะอนุภาคที่ตรวจพบเป็นแบบ flexuous ขนาดประมาณ 648.06 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

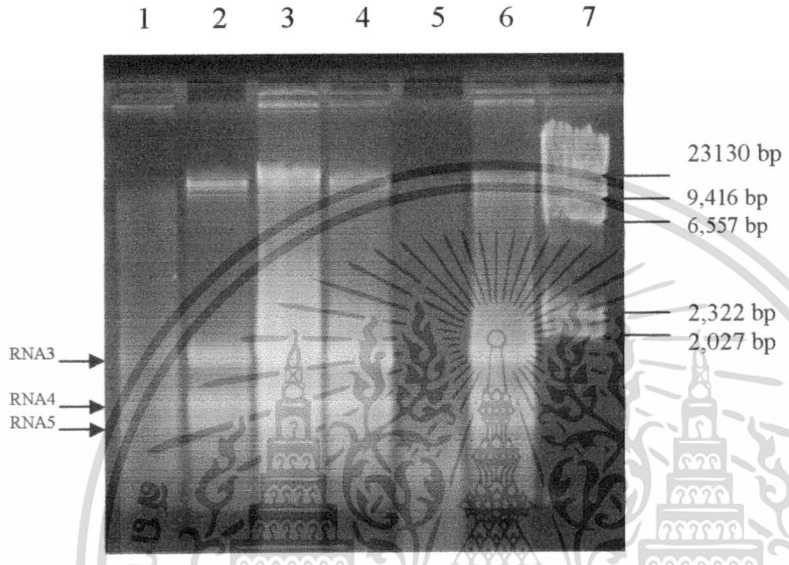
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การตรวจสอบกรดนิวคลิอิคสายคู่เชื้อไวรัส (dsRNA detection)

การตรวจสอบตัวอย่างของถั่วฝักยาวและแตงกวา พืชข้างเคียงและวัชพืช ที่เก็บมาจากแปลงปลูกพืชสลับที่ทำการเก็บตัวอย่างทุกฤดู ตลอดทั้งปี นำมาสกัดแยก dsRNA และแยกด้วยกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ผลโดยดูภายใต้กล่อง U.V. ผลการตรวจสอบพบว่าการแยกสกัด 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 อุตพิษ ผักขมหนาม กระเม็ง ผักเสี้ยน ผักแครด โหระพา แมงลัก กะเพรา ครอบจักรวาล มะเขือพวง มะเขือเทศ พริก พบว่าแถบ band ของ dsRNA ยังคงอยู่ไม่ถูกย่อยสลาย แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้งหมดที่กล่าวมามีการเข้าทำลายโดยเชื้อ CMV

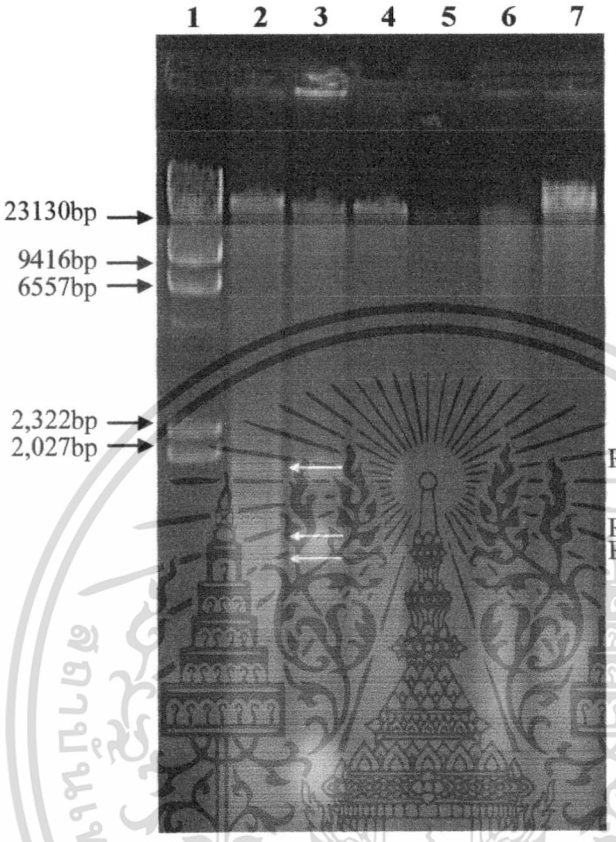
ตัวอย่างแสดง pattern ของ dsRNA จากการตรวจสอบบนใบพืชบางชนิด(ภาพที่ 4.8 และ ภาพที่ 4.9)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.8 patterns ของ dsRNA จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บรวบรวมจากแปลงปลูกตัวอย่างที่ 1- 6 ภายหลังการ digestโดยนำ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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 = ใบครอบจักรวาล Lane 6 = ใบอุตพิษ lane 7 = พริก

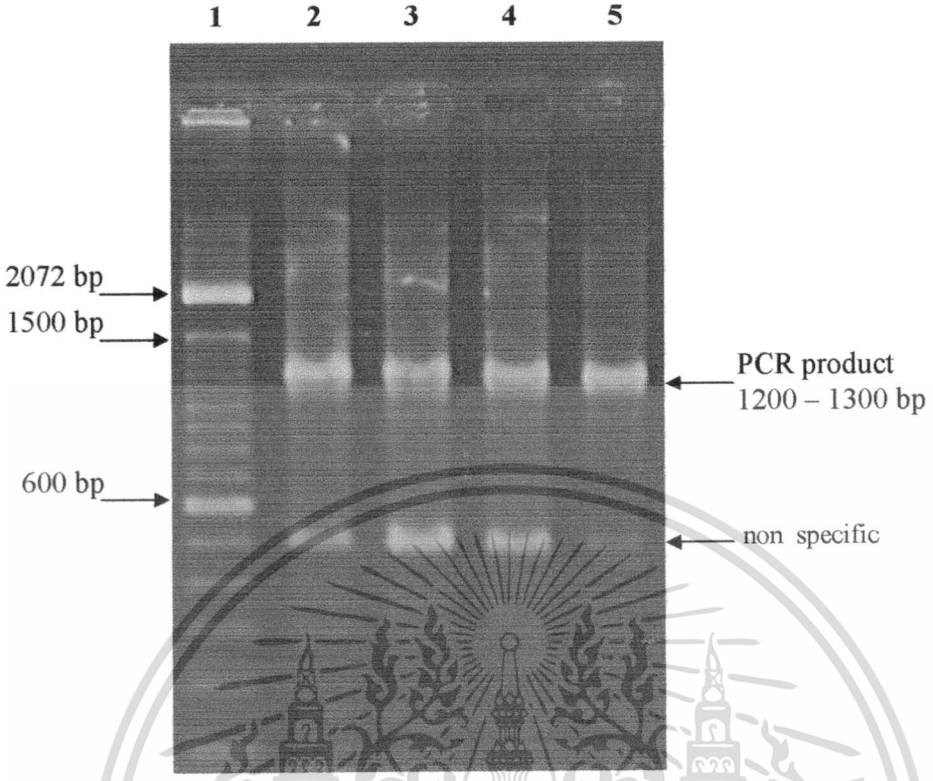
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8 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 องศาเซลเซียล พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมได้แก่ 50 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 4.10) และพบแถบ band ขนาด 1200-1300 bp. โดยไม่ปรากฏ non – specific band ในขณะที่อุณหภูมิอื่นพบทั้ง PCR product band และ band ของ non specific ที่ขนาดประมาณ 500 bp. (ภาพที่ 4.10) และจากผลการทดลอง จึงใช้อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสจากใบถั่วฝักยาวที่พบในแปลงปลูกและใบถั่วฝักยาวจากอาการที่ได้จากการถ่ายทอดผ่านเมล็ดพบว่า ในตัวอย่างของถั่วฝักยาวที่เก็บตัวอย่างมาจากแปลงปลูก ทุกตัวอย่าง ยกเว้นตัวอย่างจากเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวในการปลูกทดสอบการถ่ายทอดทางเมล็ด มี band ที่มีขนาดเดียวกับ band ของสมาชิกในกลุ่ม potyvirusgroup มากกว่า 1 band แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูกมีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus มากกว่า 1 ชนิด (ภาพที่ 4. 11) จากการคำนวณโดยการเปรียบเทียบกับขนาดตัวมาตราฐานในเครื่อง Gel Photodocumentation System ได้ขนาด ของแต่ละ band คือ band ที่ 1น้ำหนัก 1182 bp band ที่ 2 น้ำหนัก 1219 bp band ที่ 3 น้ำหนัก 1259 bp และตัวอย่างถั่วฝักยาวที่พบ band ในการตรวจสอบ (ตารางที่ 4.3)ซึ่งเมื่อนำมาตรวจสอบดูลำดับเบสจากข้อมูล gene bank (http://www.ncbi.nih.gov/) พบว่า band ที่ 2 มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของเชื้อ Bean yellow mosaic virus(BYMV) 1209 bp และ band ที่ 3 มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของเชื้อ Blackeye cowpea mosaic virus(BLCMV) 1242 (ภาพที่ 4.12)

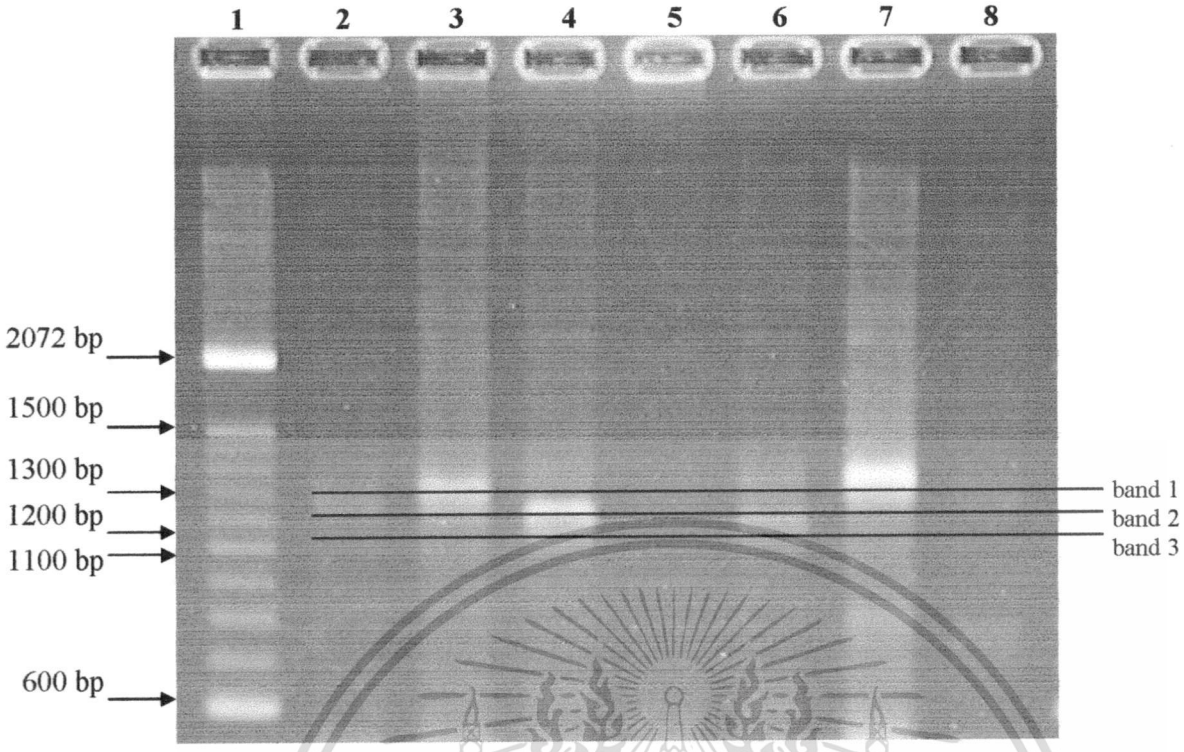
ตัวอย่างลำดับและจำนวนของ nucleotide base ที่ถูกจับจำเพาะกับ degenerate primer ในส่วนของ coat protein ของเชื้อทั้งสองดังแสดงใน (ภาพที่ 4.13) และ(ภาพที่ 4. 14)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



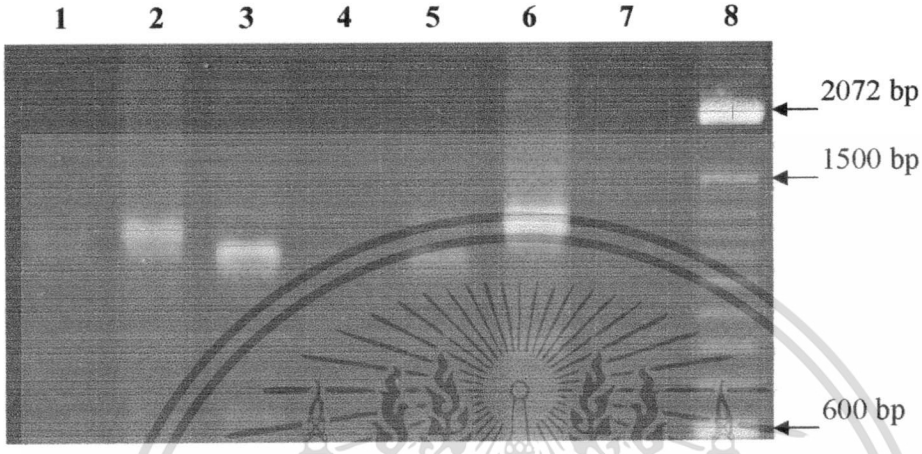
ภาพที่ 4.10 แสดงผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 38 – 50 องศาเซลเซียสสำหรับ degenerate primer pot 1 และ pot 2 ในเครื่อง real time PCR เพื่อตรวจเชื้อ ไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup จากตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่แสดงอาการใบเหลือง(ตัวอย่างที่ 1) โดย Lane 1 DNA ladder 100 bp. = Lane2 = 38 Lane 3 = 42 Lane 4 = 45 Lane5 = 50 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 แสดงผลการตรวจสอบเชื้อในกลุ่ม potyvirusgroup ด้วย real time PCR โดยการใช้น้ำยา Quantitect SYBR® Green และใช้ primer pot1 และ pot2 ที่อุณภูมิ 50 องศาเซลเซียส lane 1 = DNA ladder 100 bp. Lane 2 – 7 = ตัวอย่างถั่วฝักยาวจากแปลงปลูก (ตัวอย่างที่ 1 – 6) Lane 8 = ตัวอย่างอาการจากการทดสอบการถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ดพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 แสดงความแตกต่างของขนาด PCR product จากการตรวจสอบเชื้อใน potyvirus group ตัวอย่างใบถั่วฝักยาวที่เก็บจากแปลงปลูกและเมล็ดพันธุ์ Lane 1 – 6 = ตัวอย่างถั่วฝักยาวจากแปลงปลูก Lane7 = ตัวอย่างจากเมล็ดพันธุ์ Lane 8 = DNA ladder 100 bp

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7681tcggctgctcaattctttaccagatggatgggtgtactgcgatgctgatggttcccaattgacagctcactcactccatacctttgaat
gctgtccttgagatgcggttgagacttatggaagaatgggatttgggtgaacagatgttgaaaaaatctttatacagaaattgtgtacacaccc
atattgacaccagatggaacggttgtcaagaagtttaaagggaataacagtggacagccatccacagtggttgacaacacgctcatggtta
ttatggcagtttattatgcagcggaaaaagcttggtatcaaggggaatctcgaagatacacttgttttctttgccaacggggatgacctgctaat
tgccattaaaccagagtgtgaatcgtaccttgataaatttgagggcttgtttagtgaactgggattaaagtatgatttcagtagcagaacgaa
gaacaaaggtgacttgtggtttatgtcacacagaggaattcaaatagatgggatgtggattcctaaattggaagaggagcgcatcgtttcaa
ttctggagtgggacagagctatttcaaccagaacatagacttgaggcaatatgcgcagcaatgattgaagcatggggctatccaactctatta
aaccacataaggaagttctaccttgggtcttagggcaagcaccatatagtcaattgagtgctgagggcaaggcaccatacatttcagaagt
cgcgctcaagcacctatacactgaggagagagtcacaccagccgaattggaaaggtatagcattgcattaatcgactgttttgagtccgag
agtgatgaggtgcttgtgtgtcgttttcaatcagatcaagagatatttcaatgcaggtgaggacgaagaaggataaagcgaggaagaatgaa
gaaaatcctgataagaactctgagggcagagtagcaggcaaatagtgccagtacagagatgtgaatgcaggaactgttggaacgtttttca
gttcctaggctcaagaaaaatagcaggaaagctaaatatttctaggattggtggaaagatagttctcaatttagaccacctgctggaatataa
cccaccacaagatgacatttcaaatgttatagcaacacaagcacagtttgaagcatggtacaatggtgtcaaacaagcatatgaggttgaa
gattcacagatgggaattattctgaatggcctttatggtatggtgcatagaaat**ggcacatcaggaga8881**

ภาพที่ 4.13 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ bean yellow mosaic virus 1209 bp ส่วนของดีเอ็นเอที่แรเงาสีน้ำเงินตามลำดับ (NCBI : NC 003492)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8041cctgatggatggattcactgccacgcagatggttctcagtttgatagttcattaacaccacttctactcaattcagtgcttggaatcaga
agattcttcatggaggattggtgggttggtgaagagatgcttgagaatttgtatgctgagatagtgtacacacccatattggcacctgatgga
acagtgtttaaaaaagttaagaggaaataatagtggacaacctccacagtcgtggacaacacactcatggttgtaatgtcagtctattattc
atgccacaaggtcggatggagtgatgatgacatacaagagcgtctggttttcttgcaaatggagatgatatcatactctccatacaagagg
cagatctttgggttcttgacacattcgctgcatcgtttagggagctgggattgaactacaacttttgatgagaggacaaggaagagagaagac
ctctggttcatgtcgcactgtgctatcgaagtggatggaatctacattccaaagctagaaccagagcgtgtggtttcaattctagagtgggac
aggagtaaggaaatgatgcacagaactgaggcaatttgcgcagctatgattgaagcatggggatatcctgaactgcttcaagagatcagg
aagttttatctatggctgcttgagagggatgaaactgaaagagattgcagctagtggaggagccccatacatagcagagtcagcactgaaaa
ctctttacactaataggaaaacaaagattgaagagttagcaaagtatctggaagtgcttgacttttgactatgatgtaggatgcggagaatct
gtgcacctacaatcaggaactgggcagccgcaaccaccaatagtggatgctggtgtggatgctggaaaggacaagagagagagaagca
atagaggaaaagaccctgaaggcaggggaggggtcagtaaacaacaaccgtggtgcaggggattcaatcaatgagagacaaggatgtga
acgcaggctccaaaggaaaagttgtccgcggcttcaaaagatcacaaaaaggatgaacttgcccatggtgaaagggaatgttatttttaa
atctagatcatctgttggattacaagccagaacaaactgatctttttaacacaaggagcaacaaagatgcagtttgaaatgtggtacaatgct
gtgaagggcgagtatgaaataagatgatgcacagatgtcaattgtaatgaatggcttcatggtgtggtgtattgacaat**9300**

ภาพที่ 4.14 ลำดับเบสดีเอ็นเอผลผลิตของ blackeye cowpea mosaic virus 12426 bp ส่วนของดีเอ็นเอที่แรเงาสีน้ำเงินตามลำดับ (NCBI : AY575773)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ในการแพร่ระบาดเชื้อไวรัสในแปลงปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาว

จากการสำรวจแตงกวาและถั่วฝักยาวที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกันโดยการปลูกแตงกวากับถั่วฝักยาวจะเริ่มปลูกหลังจากการเก็บเกี่ยวผลผลิตข้าวเสร็จเรียบร้อยแล้วโดยทำการปลูกแตงกวาหรือถั่วฝักยาวชนิดใดชนิดหนึ่งในแปลงปลูกและจะมีการปลูกหมุนเวียนเปลี่ยนไป การสำรวจทำทุกช่วงฤดูตลอดทั้งปี พบอาการของโรคไวรัสที่สามารถถ่ายทอดผ่านทางน้ำคั้นได้จากถั่วฝักยาว 6 ตัวอย่าง และจากแตงกวา 3 ตัวอย่างโดยพบว่ามีเชื้อไวรัสเข้าทำลายมากกว่า 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 ยกเว้นผักแครด ข่า ถั่วพู ถั่วลิสง ดังตารางที่ 4.5 ซึ่งพบว่าวัชพืชและพืชข้างเคียงถูกเชื้อ CMV เข้าทำลายถึง 73 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างที่สำรวจพบ

ตารางที่ 4.2 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การสำรวจ และวินิจฉัยเชื้อ CMV ในวัชพืชและพืชข้างเคียงที่แสดงอาการของโรคไวรัสและไม่แสดงอาการของโรคไวรัส

วัชพืชและพืชข้างเคียง	แสดงอาการของโรคไวรัส	ไม่แสดงอาการของโรคไวรัส	ตรวจสอบ CMV
อุตพิษ	+	-	+
ผักขมหนาม	+	-	+
หญ้ายาง	+	-	+
ผักเสี้ยน	+	-	+
ผักแครด	+	-	-
โหราพา	+	-	+
แมงลัก	+	-	+
กระเพรา	+	-	+
ครอบจักรวาล	+	-	+
มะเขือพวง	+	-	+
มะเขือเทศ	+	-	+
พริก	+	-	+
ข่า	-	+	-
ถั่วพู	-	+	-
ถั่วลิสง	-	+	-
รวมเป็นเปอร์เซ็นต์	80	20	73

หมายเหตุ + คือ ตัวอย่างที่พบเชื้อไวรัส
- คือ ตัวอย่างที่ไม่พบเชื้อไวรัส

การสำรวจพบแมลงหลายชนิดที่เป็นพาหะสามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ ดังตารางที่ 4.6 โดยเฉพาะเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด คือ *A. gossypii* และ *M. persicae* ซึ่งจัดเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อ CMV และเชื้อไวรัสอื่นหลายชนิดรวมถึงเชื้อในกลุ่ม Potyvirusgroup เช่นเชื้อ BYMV และ BLCMV ในลักษณะ non - persistant นอกจากนี้ชนิดของวัชพืชและพืชข้างเคียงในแปลงปลูกยังเป็นทั้งพืชอาหารของเพลี้ยอ่อนและพืชอาศัยของเชื้อไวรัส ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการแพร่ระบาดเชื้อ CMV จัดเป็นเชื้อปัญหาหลักในแปลงปลูกตลอดปี โดยการแพร่ระบาดโดยตรงในกรณีของถั่วฝักยาวมาจากการถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด จากตารางที่ 4.1 ส่วนการเข้าทำลายของเชื้อในช่วงปลูกจะอาศัยเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะหลัก โดยดูด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กินอาหารจากวัชพืช และพืชข้างเคียงที่ถูกเชื้อ CMV เข้าทำลายจึงเป็นแหล่งสะสมเชื้อข้ามฤดูปลูกทำให้เชื้อ CMV สามารถแพร่ระบาด อย่างต่อเนื่องและรุนแรง ส่วนแมลงหวี่ขาวเป็นพาหะของเชื้อไวรัสในกลุ่ม Gemenivirusgroup ซึ่งเข้าทำลายได้ทั้งถั่วฝักยาวและแตงกวาถึงแม้ว่าในการสำรวจครั้งนี้จะไม่พบเชื้อในถั่วฝักยาวแต่มีความเป็นไปได้อย่างมากในการเข้าทำลายในพืชในรุ่นต่อๆ ไป

ตารางที่ 4.4 ชนิดของแมลงที่พบในแปลงและคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

ชนิดของแมลงที่สำรวจพบ	คุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส		
	CMV	Geminivirusgroup	potyvirusgroup
แมลงหวี่ขาว	-	+	+
เพลี้ยอ่อนถั่ว	+	-	+
เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ	+	-	+
เพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียว	+	+	+
เพลี้ยกระโดด	+	+	+
ตั๊กแตน	+	-	+
ด้วงเต่า	+	-	+

หมายเหตุ + คือ มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส
- คือ ไม่มีคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อไวรัส

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

ดังนั้นการกำจัดวัชพืช พืชอาศัยที่เป็นแหล่งของเชื้อไวรัสและแมลง รวมถึงการกำจัดแมลงพาหะ การคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่ปลอดโรค และการวางแผนในการปลูกพืช จะทำให้สามารถตัดวงจร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส จะช่วยลดปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การสำรวจอาการโรคไวรัสใน ถั่วฝักยาว แตงกวา วัชพืช และพืชข้างเคียง ในแปลงปลูกพืชสลับภายหลังการทำนาเขตพื้นที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี พบอาการของโรคไวรัสในถั่วฝักยาวแตกต่างกัน 7 อาการดังนี้ 1) สีเขียวเข้มตามเส้นใบ พื้นใบเขียวอ่อนแผลพอง ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง 2) ใบบิดเบี้ยว ผิดรูปร่าง สีใบเขียวเข้ม ใบพอง พื้นใบบางส่วนมีสีเหลืองแทรกอยู่ตามเส้นใบ 3) เส้นใบมีสีเขียวเข้ม ทั้งแนวกลางใบและเส้นใบ พื้นใบสีเขียวอ่อน 4) ใบด่างสีเหลืองอ่อนกระจายทั่วใบและสีเขียวเข้มตามเส้นใบ ลำต้นแคระแกร็น 5) ใบเรียวเล็ก ผิดรูปร่าง 6) เกิดอาการด่างเขียวตามเส้นใบและขอบใบโค้งลง 7) ยอดแตกพุ่มแจ้ ในแตงกวาพบอาการของโรคไวรัส 3 ลักษณะ ได้แก่ 1) ด่างเหลืองกระจายทั่วใบ 2) เส้นใบและพื้นใบเป็นสีเหลือง 3) จุดพองสีเขียวกระจายทั่วใบ พื้นใบมีสีเขียวอ่อน

ซึ่งเมื่อนำใบพืชที่แสดงอาการเหล่านี้มาทำการถ่ายทอดโดยวิธี Mechanical sap transmission สู่ต้นอ่อนถั่วฝักยาวและแตงกวาพบว่าในถั่วฝักยาวที่แสดงอาการที่1- อาการที่ 6 สามารถถ่ายทอดได้โดย เมื่อสังเกตอาการอย่างต่อเนื่องพบว่าอาการบนต้นที่ถูกปลูกเชื้อปรากฏอาการเช่นเดียวกับอาการของตัวอย่างใบเป็นโรคที่เก็บมาจากแปลงปลูก ส่วนอาการแตกพุ่มแจ้ไม่สามารถถ่ายทอดโดยน้ำคั้น ในขณะที่การถ่ายทอดเชื้อจากตัวอย่างใบแตงกวาที่เป็นโรคทั้ง 3 อาการพบเพียงอาการใบด่าง ปรากฏบนแตงกวาที่ได้รับการปลูกเชื้อซึ่งเมื่อสังเกตอาการอย่างต่อเนื่องก็ไม่ปรากฏอาการเช่นเดียวกับที่พบในแปลง จากผลที่ได้ดังกล่าวทำให้ทราบว่าเชื้อไวรัสส่วนใหญ่ที่เข้าทำลายถั่วฝักยาวทำให้เกิดอาการแตกต่างกันมีคุณสมบัติในการถ่ายทอดเชื้อโดยน้ำคั้นซึ่งเป็นคุณสมบัติของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคหลายชนิด (Walkey. 1985) และความแตกต่างของอาการที่พบในแปลงน่าจะเกิดจากการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด ดังเช่นที่พบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสในถั่วฝักยาวในรายงานของ Gumedzoe *et al.* (1990) ในประเทศ โทโก (Togo) พบการเข้าทำลายของเชื้อ cowpea yellow mosaic virus และเชื้อ cowpea mottle virus นอกจากนี้ยังพบการเข้าทำลายร่วมของเชื้อทั้งสองนี้รวมถึงเชื้อ cowpea aphid-borne mosaic virus เชื้อ cowpea mild mottle virus และเชื้อ southern bean mosaic virus และจากรายงานใน Proceeding of International Workshop TARI (1990 -1991) พบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายถั่วฝักยาวในประเทศไต้หวัน 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) ศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสในถั่วฝักยาวในพื้นที่ปลูกต่างๆของประเทศโทโก (Togo) โดยการใช้ antiserum ของเชื้อ 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 carlvirus (CMMV) และเชื้อ cowpea strain of tobacco mosaic tobamovirus (TMV-CS) พบการเข้าทำลายของเชื้อ CPMV มากที่สุดและยังพบการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสเหล่านี้มากกว่า 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 และต้นตาย Anderson *et al.* (1996) ศึกษาการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ blackeye cowpea mosaic และ cucumber mosaic โดยการตรวจสอบด้วยวิธี ELISA พบว่าระดับความเข้มข้นของเชื้อ CMV ลดลงเมื่อพืชมีอายุมากขึ้นแต่การเข้าทำลายร่วมของเชื้อทั้งสองทำให้พืชแสดงอาการใบด่างและแคระแกรนอย่างรุนแรง เช่นเดียวกับรายงานของ Gillaspie *et al.* (1998) ส่วนอาการแตกพุ่มแจ้บนถั่วฝักยาว (อาการที่ 7) อาจเกิดจากความผิดปกติของยอดอ่อนต่อสารเคมีที่ใช้ฉีดพ่นในแปลงหรือเกิดจากการเข้าทำลายของเชื้อบางชนิดเช่นไวรอยด์ซึ่งพบทำให้เกิดอาการดังกล่าว อย่างไรก็ตามเนื่องจากเชื้อนี้ไม่สามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้นจึงไม่มีการศึกษาต่อเนื่อง ในกรณีของแตงกวาซึ่งสามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางน้ำคั้นโดยอาการที่ปรากฏเป็นอาการของโรคไวรัสที่ต่างจากอาการในแปลงเป็นผลเนื่องมาจากการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัส

ในบางเชื้ออาจมีอุปสรรคในการถ่ายทอดเพราะคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อไวรัสบางชนิด เช่นเชื้อในกลุ่ม luteovirusgroup หรือ geminivirusgroup เช่นเชื้อ bean golden yellow mosaic virus type 1 ไม่สามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้นแต่ถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาวเท่านั้น ส่วน bean golden yellow mosaic virus type 2 สามารถถ่ายทอดได้ทั้ง 2 ลักษณะ (Garrido-Ramirez *et al.* 2000) ในประเทศไทยมีรายงานเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแตงกวาเช่นเชื้อ watermelon mosaic virus (WMV) โดยเครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ (2537) และ เชื้อ leaf roll virus (ศักดิ์ สุนทรสิงห์ 2537) Blancard *et al.* (1994) รายงานว่า squash mosaic virus (SqMV) ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับแตงในหลายประเทศ เช่นประเทศออสเตรเลีย ไต้หวันและประเทศทางตอนใต้ของแถบเมดิเตอร์เรเนียน Thomas *et al.* (1996) พบว่าแตงส่วนใหญ่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของเชื้อ papaya ring spot –W (PRSV –W) Zitikaite (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 อุตพิษ (*Typhonium trilobatum* Schott.) แสดงอาการด่างเป็นร่างแห ผักขมหนาม (*Amaranthus spinosus* L.) แสดงอาการด่างเป็นจุดเหลืองอ่อน หญ้ายาง (*Euphorbia heterophylla* L.) แสดงอาการด่างสีเขียวเข้มตามแนวเส้นใบ ผักเสี้ยน(*Cleome gynandra* L.) แสดงอาการด่างเหลืองอ่อนใบบิดเบี้ยว ผักแครด(*Synedrella nodiflora* L.) แสดงอาการด่างสีเขียวตามเส้นใบ ครอบจักรวาล (*Abutilon hirtum*) แสดงอาการใบลีบเล็ก ส่วนพืชใกล้เคียงได้แก่ โหระพา (*Ocinum basilicum*) และแมงลัก (*Ocinum canum* L.) แสดงอาการด่างเหลืองใบบิดเบี้ยว กระเพรา (*Ocinum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

sanctum)แสดงอาการด่างเหลืองกระจายทั่วใบ มะเขือพวง (*Solanum Torvum*) แสดงอาการด่างเขียวอ่อนใบผิดรูปเล็กน้อย มะเขือเทศ (*Lycopersicon esculentum*) แสดงอาการด่างเขียวเข้มใบเป็นคลื่น พริก (*Capsicum frutescencs* L.)แสดงอาการด่างเขียวอ่อนใบมีขนาดเล็ก ใบผิดรูป

จากการสำรวจแมลงในแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกันและบริเวณรอบๆ แปลงปลูกในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบแมลงได้แก่ แมลงหวี่ขาว (*Bemisia tabaci*)เพลี้ยอ่อนถั่ว (*Aphis gossypii*) เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ (*Myzus persicae*) เพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียว(*Nephotettix virescens*) เพลี้ยกระโดด (*Nilaparvata lugens*) ตั๊กแตน (*Cyrtacanthacris tatarica* L.) ด้วงเต่า(*Micraspis* sp.) ผลการตรวจสอบทางเซรุ่มวิทยาโดยวิธี ELISA ด้วย antiserum เฉพาะของไวรัสในกลุ่ม Geminivirus และ antiserum ของเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) พบเชื้อไวรัสในกลุ่ม Geminivirus ใน แตงกวาทั้ง 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 ซึ่งจากผลการศึกษานี้ยืนยันชนิดของเชื้อไวรัส CMV เป็นหนึ่งในเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายร่วม โดยเชื้อนี้มีอนุภาคแบบ isometric particle ขนาด 28-30 นาโนเมตร (Walkey. 1985) ในขณะที่อนุภาคของเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirusgroup มีลักษณะ flexuous rod ขนาด 600-850 นาโนเมตร ซึ่งสอดคล้องกับขนาดโดยเฉลี่ยของอนุภาคที่ตรวจพบในใบถั่วฝักยาวส่วนใหญ่

การตรวจสอบการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์โดยนำเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาวและแตงกวาที่มีจำหน่ายในท้องตลาดอำเภอท่ายาง จังหวัดเพชรบุรีอย่างละ 5 พันธุ์ดังนี้ พันธุ์ถั่วฝักยาว ได้แก่ พันธุ์ขุนศึก No.7 พันธุ์สมบูรณ์โชค No. 99 พันธุ์ไผ่ขวาง 005 พันธุ์ลำน้ำชี และพันธุ์BIG 1 และพันธุ์แตงกวาทั้ง 5 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์มีชัย พันธุ์อเมซอน พันธุ์อะตอม พันธุ์อมตะ 765 และ พันธุ์แทมมี่ โดยการนำเมล็ดพันธุ์ดังกล่าวพันธุ์ละ 200 เมล็ดมาปลูกและสังเกตอาการของโรคเมื่อพืชเจริญเติบโต พบว่าใน 2 สัปดาห์ ถั่วฝักยาวเริ่มแสดงอาการของโรคไวรัส และใน 4 สัปดาห์ อาการที่ปรากฏมีความแตกต่างกัน 4 ลักษณะอาการได้แก่ อาการใบด่างเป็นปื้นเล็กๆตามด้วยอาการเหลืองทั้งใบก่อนที่ใบจะหลุดร่วง อาการด่างเขียวเป็นร่างแหตามเส้นใบ อาการแผลจุดสีเขียวอ่อนกระจายบนใบ ซึ่งอาการทั้ง 3 ลักษณะนี้พบบนใบแท้คู่แรก และเมื่อต้นถั่วมีการเจริญเป็นใบ trifoliate ก็ไม่ปรากฏอาการดังกล่าว ส่วนอาการจุดเหลืองบนใบ เส้นใบหดย่นทำให้ใบบิดเบี้ยว พบปรากฏบนใบ trifoliate คู่แรกเท่านั้น ในขณะที่ไม่พบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสบนแตงกวาพันธุ์ต่างๆ เปอร์เซ็นต์ของการถ่ายทอดเชื้อไวรัสทางเมล็ดพันธุ์ของถั่วฝักยาวรวมทุกอาการอยู่ระหว่าง 1-10.5 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาการถ่ายทอดทางดินโดยไส้เดือนฝอยทำโดยการเก็บตัวอย่างดินจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวา ที่แสดงอาการของเชื้อไวรัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยการสุ่มเก็บดินจากบริเวณรอบๆโคนต้นของพืชในแปลงที่แสดงอาการของโรคไวรัส และนำดินตัวอย่างมาเพาะเมล็ดพันธุ์ถั่วฝักยาว พันธุ์ลำน้ำชี และแตงกวา พันธุ์อมตะ อย่างละ 200 เมล็ด ทำการตรวจสอบเป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าต้นอ่อนที่เจริญขึ้นมาไม่แสดงอาการของโรคไวรัส และเมื่อนำใบที่ไม่แสดงอาการโรคไวรัสไปทำการ back test สู่ต้นกล้าทั้งถั่วฝักยาวและแตงกวาก็ไม่ปรากฏอาการของโรคไวรัส แสดงว่าเชื้อไวรัสที่ตรวจพบในแปลงปลูกทั้งในถั่วฝักยาวและแตงกวาไม่ถ่ายทอดในดิน จากการตรวจสอบโดยแยกสกัด dsRNA ของเชื้อในใบถั่วฝักยาวที่เป็นโรคจากการถ่ายทอดผ่านเมล็ด พบว่าเชื้อสาเหตุของทั้ง 4 อาการที่ปรากฏคือเชื้อ CMV ซึ่ง ความสามารถในการถ่ายทอดเชื้อ CMV ผ่านเมล็ดถั่วฝักยาวมีรายงานของ Hampton *et al.* (1992) ว่าเชื้อ CMV เป็นเชื้อหนึ่งในจำนวนเชื้อไวรัสที่ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดถั่วฝักยาว โดยอัตราการถ่ายทอดจะขึ้นอยู่กับ strain ของเชื้อและความแตกต่างทางสายพันธุ์ของเมล็ด 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) ส่วนอาการที่แสดงบนใบถั่วฝักยาวที่แตกต่างกันเกิดขึ้นจากพันธุ์ถั่วฝักยาวที่ใช้ทดสอบและอาจมีความแตกต่างในเรื่อง strain ของเชื้อ CMV ที่เข้าทำลายรวมถึงอายุของพืชขณะที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย (Gillaspie *et al.* 1998) นอกจากนี้มีรายงานการถ่ายทอดเชื้ออื่นผ่านทางเมล็ดถั่วฝักยาว เช่น Jeyanandarajah (1992) รายงานการเข้าทำลายของเชื้อ blackeye cowpea mosaic virus, bean common mosaic virus, cucumber mosaic virus โดยถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดในประเทศศรีลังกา Patil and Gupta (1992a) รายงานว่าเชื้อ bean common mosaic virus ถ่ายทอดผ่านเมล็ดได้ 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยเชื้ออยู่ที่ testa ของเมล็ด Puttaraju *et al.* (2003) พบว่าเชื้อ blackeye cowpea mosaic virus ถ่ายทอดผ่านทางเมล็ด 7 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ ยิ่งสูงทำให้เกิดการบิดเบี้ยวของใบ (distortion symptom) มากขึ้น

การตรวจสอบเชื้อโดยการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อไวรัสจากตัวอย่างใบพืชต่อไปนี้คือ ถั่วฝักยาว ตัวอย่างที่ 1- 6 และแตงกวา ตัวอย่างที่ 1 - 3 และในวัชพืช และพืชข้างเคียง ได้แก่ อุตพิษ ผักขมหนาม หญ้ายาง ผักเสี้ยน หญ้ายาง ผักแครด โหระพา แมงลัก กระเพรา ครอบจักรวาล มะเขือพวง มะเขือเทศ พริก พบ pattern ของ dsRNA ของเชื้อ CMV ในเกือบทุกตัวอย่างยกเว้นในผักแครด โดย pattern ของ dsRNA ของเชื้อ CMV แยกตัว อย่างชัดเจนโดยเฉพาะ RNA3 RNA4 RNA 5 และในบางพืชพบ satellite RNA ของเชื้อด้วย

ผลการสำรวจแมลงในแปลงปลูกถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกันในพื้นที่เดียวกันและบริเวณรอบๆ แปลงปลูกในทุกช่วงฤดู ตลอดทั้งปี พบ แมลงหวี่ขาว (*B. tabaci*) เพลี้ยอ่อนถั่ว (*A. gossypii*) เพลี้ยอ่อนกะหล่ำ (*M. persicae*) เพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียว (*N. virescens*) เพลี้ยกระโดด (*N. lugens*)ตั๊กแตน(*C. tatarica* L.) ด้วงเต่า (*Micraspis* sp.) การสำรวจพบชนิดของเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด คือ *A. gossypii* และ *M. persicae* ซึ่งจัดเป็นพาหะถ่ายทอดเชื้อ CMV ในลักษณะ non - persistant

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Palukaitis *et al.* 1992) และยังเป็นพาหะของเชื้อไวรัสหลายชนิดรวมถึงเชื้อ bean yellow mosaic virus และ blackeye cowpea mosaic virus ส่วนแมลงหวี่ขาวก็จัดเป็นแมลงพาหะที่ดีของเชื้อไวรัสในกลุ่ม geminivirusgroup ซึ่งสามารถเข้าทำลายได้ทั้งแตงกวาและถั่วฝักยาว นอกจากนี้เพลี้ยจั๊กจั่นสีเขียวและเพลี้ยกระโดดซึ่งโดยทั่วไปพบในนาข้าว เป็นแมลงพาหะเชื้อไวรัสในลักษณะ persistant (Walkey. 1985) จากการศึกษาทำให้ทราบว่าเชื้อ CMV จัดเป็นเชื้อไวรัสหลักที่สำคัญในการเข้าทำลายถั่วฝักยาวและแตงกวาที่ปลูกสลับกับพื้นที่ที่ใช้ปลูกข้าว ในเขตอำเภอ บ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี โดยมีเพลี้ยอ่อนทั้งสองชนิดเป็นพาหะ โดยเชื้อเข้าทำลายพืชในลักษณะการเข้าทำลายร่วมทำให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรงและมีความแตกต่างกัน แหล่งของเชื้อ CMV โดยตรงในกรณีของถั่วฝักยาวมาจากเมล็ดที่เป็นโรค ส่วนการเข้าทำลายของเชื้อในช่วงฤดูปลูกอาศัยเพลี้ยอ่อนเป็นพาหะหลักโดยดูดกินอาหารจากวัชพืช ได้แก่ ครอบจักรวาล อุตพิษ หญ้ายาง ผักเสี้ยน ผักขม และพืชข้างเคียงคือ กระเพรา โหระพา แมงลัก พริก มะเขือพวง และมะเขือเทศ ซึ่งเป็นแหล่งสะสมเชื้อข้ามฤดูปลูกทำให้เชื้อ CMV สามารถแพร่ระบาด อย่างต่อเนื่องและรุนแรง ส่วนแหล่งของเชื้อ bean yellow mosaic virus และ blackeye cowpea mosaic virus อาจติดมากับเมล็ดพันธุ์ได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถถูกถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนจากแปลงปลูกถั่วฝักยาวที่ปลูกเหลื่อมเวลากัน และกรณีเช่นเดียวกันนี้อาจเกิดกับแตงกวาที่ถูกเชื้อ CMV และเชื้อไวรัสในกลุ่ม geminivirusgroup เข้าทำลายโดยมีแมลงหวี่ขาวเป็นพาหะ

ดังนั้นจากการศึกษาปัญหาการปลูกแตงกวาสลับกับถั่วฝักยาวภายหลังการทำนาในพื้นที่อำเภอบ้านลาด จังหวัดเพชรบุรี นี้ชี้ให้เห็นปัญหาการสูญเสียผลผลิตเนื่องจากการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสในแปลงปลูกพืชสลับว่ายังคงมีอย่างต่อเนื่องและอาจรุนแรงขึ้น หากเกษตรกรยังคงใช้วิธีปลูกพืชสลับโดยเหลื่อมเวลาซึ่งเป็นผลให้เชื้อไวรัสและแมลงพาหะสะสมอยู่ในพื้นที่โดยตลอด โดยในแตงกวาพบว่าแมลงพาหะ วัชพืช และแปลงปลูกพืชข้างเคียงที่มีเชื้อไวรัสอาศัยอยู่ เป็นแหล่งสะสมของเชื้อไวรัสที่จะกลับเข้ามาทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกแตงกวาอีก และในส่วนของถั่วฝักยาวพบว่าเมล็ดพันธุ์ที่ไม่ปลอดเชื้อ แมลงพาหะ วัชพืช และแปลงปลูกพืชข้างเคียงที่มีเชื้อไวรัสอาศัยอยู่จะเป็นแหล่งสะสมของเชื้อไวรัส และจะทำให้เชื้อไวรัสกลับเข้ามาทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกถั่วฝักยาวได้อีก นอกจากนี้การแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสจะเกิดจากแมลงพาหะทำให้เชื้อไวรัสแพร่กระจายจากแปลงปลูกหนึ่งสู่อีกแปลงปลูกหนึ่งและไปยังวัชพืชซึ่งเป็นพืชอาศัยของเชื้อไวรัสทำให้สามารถอยู่ข้ามฤดูปลูกได้และกลับมาทำความเสียหายให้กับแปลงปลูกแตงกวาและถั่วฝักยาวอีกในฤดูต่อไป เพราะฉะนั้นการกำจัดวัชพืช พืชอาศัยที่เป็นแหล่งของเชื้อไวรัสและแมลง รวมถึงการกำจัดแมลงพาหะ การคัดเลือกเมล็ดพันธุ์ที่ปลอดโรค และการวางแผนในการปลูกพืช จะทำให้สามารถตัดวงจรการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัส จะช่วยลดปัญหาการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสและป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2540. ความต้องการวัตถุดิบของโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร ปี 2540. ฝ่ายอุตสาหกรรมเกษตร กองส่งเสริมธุรกิจเกษตร.

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ พัน อินทร์จันทร์ นวลจันทร์ ดีมา และ ลักษณา วรรณภีร์. 2537. การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาวิธีป้องกันกำจัดโรคไวรัสของพริก และแตงอย่างมีประสิทธิภาพในสภาพไร่.**การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 32 ระหว่าง 3 – 5 ก.พ.** หน้า 223 – 232.

จานุลักษณ์ ขนบดี. 2532. **การผลิตเมล็ดพันธุ์ผัก.** โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์ กรุงเทพฯ. 183 หน้า.

ขุมพล สาระนาค และ อรพรรณ วิเศษสังข์. กองเกษตรสัมพันธ์ กรมส่งเสริมการเกษตร. 2537. โรคถั่วฝักยาว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย

ศักดิ์ สุนทรสิงห์. 2537. **โรคของผักและการป้องกันกำจัด.** คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 หน้า.

ธีระ สูตะบุตร. 2535. **โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย.** โรงพิมพ์ หจก. ฟันนี่ พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 310 หน้า

นวลพรรณ งามยี่สุ่น. 2540. "การตรวจสอบเชื้อไวรัสพืชโดยการแยกสกัดและวิเคราะห์กรดนิวคลิอิคแบบ RNA สายคู่". **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า** 13(12) : 32 – 37.

นวลพรรณ งามยี่สุ่น และกีรติกุล ชีกว้าง. 2546. "การวินิจฉัยเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายมะลิโดยวิธีการวิเคราะห์ dsRNA และวิธีการถ่ายทอดเชื้อ". **วารสารโรคพืช.** 17 (1 – 2) : 12 – 22.

นวลพรรณ งามยี่สุ่น และ คมศร แสงจินดา. 2548. "การตรวจหาเชื้อไวรัส CMV เชื้อไวรัสหลักในการเข้าทำลายถั่วฝักยาวและแตงกวาในแปลงปลูกพืชสลับภายหลังการทำนา". **ในการประชุมวิชาการ พืชสวนแห่งชาติ ครั้งที่ 5.** ชลบุรี : โรงแรมเวลคัมจอมเทียนบีช.

เมืองทอง ทวนทวี. 2532. **ผักบ้านเราสวนผัก 2.** หน้า 162 –205.

พิบูลย์ มงคลสุข. 2530. **โรคพืชวิทยา.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 308 หน้า.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล. 2542. **โรคและศัตรูบางชนิดของผักและการป้องกันกำจัด.** ไทยวัฒนาพานิชจำกัด. 141 หน้า.

อุดม ฟ้ารุ่งสาง. 2527. "การตรวจสอบเชื้อไวรัสในเมล็ดถั่วฝักยาว และการรับรองสุขภาพเมล็ดพันธุ์ที่ปราศจากโรค" .วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

Aftab, M., Asad, S., Khokhar, K. M., Ayub, M. A., Butt, T. B. 1993. "Effect of mungbean yellow mosaci virus on the yeld and growth components of asparagus bean." **Pakistan Journal of Phytopathogy.** 5 (1-2) : 58 – 61.

Anderson, C.W. 1957. Seed transmission of three viruses in cowpea. **Phytopathology.** 47 : 515.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anderson, EJ. Kline, AS. Morelock, TE. and Mcnew, RW. 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 GI. and Mih AM. 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.

Chang, CA. Yang, TT. Tsan, TM. and Chen, CC. 1994. "Production and application of virus free seed to ontrol virus diseases of asparagus beans." **Plant Protection Bulletin Taipei.** 36 (4) : 313 - 325.

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

Green, S.K., and J. S. Kim. 1991. "Characteristics and Control of Viruses Infecting Peppers : A Literature Revier." 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 Giomate Fitopatologiche Perugia.** 16-20 aprile. 55-60.

Hampton, R. O., Albrechtsen, S. E., and Mathur, S. B. 1992. "Seed health (viruses) of *Vigna unguiculate* 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. "Characterrization of double – stranded ribonucleic acid in tobacco leaves, Proc. Natl." **Acad. Sci. U&A.** 76 : 3637 – 3640.

Jeyanandarajah, P. 1992. "Seed borne viruses infecting three important leguminous food crops in Sri Lanka." **Seed Science and Technology.** 20 (3) : 629 - 641.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jordan, R.L., Ohr, H.D. and Zentmyer, G.A. 1983. "Avocado blackstreak disease. A newly Reconized major disease of avocado in Califorma." **Phytopathology.** 73 : 970.

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. 1994. "First Report of Cowpea Aphid – Borne Mosaic Potyvirus from Cowpeas Grown Commercially in the U.S." **Plant Disease.** 81 : (8) 959.

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.

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

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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, HR. Prakash, HS. and Shetty, HS. 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, AA. and Jeyanandarajah, P. 1996." Blackeye cowpea mosaic potyvirus, the cause of a severe disease of vegetable cowpea (Vigana unguiculata ssp. sesquipedalis)cv. Polonmae in Sri Lanka." **Tropical Science.** 36 (3) : 129 – 137.

Sevik, M.A. and Sokmen. 2003. "Virus Infecting Cucurbits in Samsun Turkey." **Plant Disease.** 87 : 341 – 344.

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, HW. 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 islating 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**. Heinemann : London. 329.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้