

การลดปริมาณ และการแพร่ระบาดของโรคไวรัสในพืชชั้นพริกโดยการจัดการ  
ศัตรูพืชแบบผสมผสาน

THE DECREASE OF INCIDENCE AND EPIDEMIC OF VIRUS ON  
PASSIONFRUIT BY INTEGRATED PEST MANAGEMENT

ศิริชัย ทาวร  
SRICHAJ THAWORN

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช  
บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2549

ISBN 974-15-2346-7

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

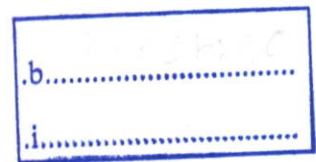
การลดปริมาณ และการแพร่ระบาดของโรคไวรัสในแพสชันฟรุตโดยการจัดการ  
ศัตรูพืชแบบผสมผสาน

THE DECREASE OF INCIDENCE AND EPIDEMIC OF VIRUS ON  
PASSIONFRUIT BY INTEGRATED PEST MANAGEMENT



ศิริชัย ถาวร  
SIRICHAJ THAWORN

เลขหมู่.....  
เลขทะเบียน..... 63427  
วัน,เดือน,ปี..... 28 ส.ค. 2549



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช  
บัณฑิตวิทยาลัย  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
พ.ศ. 2549  
ISBN 974-15-2346-7

**THE DECREASE OF INCIDENCE AND EPIDEMIC OF VIRUS ON  
PASSIONFRUIT BY INTEGRATED PEST MANAGEMENT**

**SIRICHAJ THAWORN**

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

**2006**

**ISBN 974-15-2346-7**

**COPYRIGHT 2006**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การลดปริมาณ และการแพร่ระบาดของโรคไวรัสในพืชชั้นฟรุ้ด โดยการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน
นักศึกษา	นายศิริชัย ถาวร
รหัสประจำตัว	44066305
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
พ.ศ.	2549
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. นवलพรรณ งามยี่สุน

### บทคัดย่อ

การสุ่มสำรวจอาการของโรคไวรัสที่เข้าทำลายต้นพืชชั้นฟรุ้ดจำนวน 15 แปลง จากแหล่งปลูกในอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร พบว่าพืชชั้นฟรุ้ดแสดงอาการของโรคไวรัส 3 อาการคือ 1) ใบค่างจุดเหลืองรุนแรง 2) ใบค่างสีเขียวเข้มและ 3) ใบค่างเส้นใบเป็น vein banding ซึ่งมีระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย 2.25 จากระดับความรุนแรง 0 - 4 ระดับ และการเกิดโรคไวรัสเฉลี่ย 89.10 เปอร์เซ็นต์ การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสด้วยพืชทดสอบใน 5 วงศ์ จำนวน 8 ชนิด คือ *Chenopodium amaranticolor*, *Phaseolus aureus*, *Vigna sesquipedalis*, *Cucumis sativus*, *Gomphrena globosa*, *Passiflora edulis* และ *Passiflora foetida* โดยผ่านทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission) พบว่าทั้ง 3 อาการเมื่อถ่ายทอดลงในต้น *C. amaranticolor* ทำให้เกิดจุดแผลสีน้ำตาลในใบที่ถูกปลูกเชื้อ และต่อมาจุดแผลจะกระจายไปยังใบยอด จากตัวอย่างใบค่างสีเขียวเข้มและ ใบค่างเส้นใบเป็น vein banding ตรงกลางจุดแผลจะแห้งตายและ ขอบจุดแผลจะมีสีชมพูถึงสีแดง และอาการในต้น *P. edulis* และ *P. foetida* จะคล้ายคลึงกันคือ มีการเกิดจุดแผลสีน้ำตาลเล็กๆ ในใบที่ถูกปลูกเชื้อ ต่อมาแสดงอาการจุดแผลกระจายไปยังใบยอด ทำให้ใบยอดค่าง หงิก และเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การตรวจสอบรูปร่างและ ขนาดอนุภาคเชื้อไวรัสของพืชชั้นฟรุ้ดด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสเป็นแบบ flexuous มีขนาดยาวเฉลี่ยประมาณ 642 นาโนเมตร ผลการแยกสกัด dsRNA ด้วยชุดสกัด Ultra Clean™ Plant RNA Isolation Kit และ การใช้ Plant concert solution และตรวจสอบ dsRNA โดยใช้เทคนิค gel electrophoresis (agarose gel 0.8 เปอร์เซ็นต์) พบว่าทั้ง 3 อาการตรวจพบ pattern dsRNA ของเชื้อ cucumber mosaic virus ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ  $1.32 \times 10^6$  และ  $0.8 \times 10^6$  ดาลตัน ตามลำดับ การตรวจสอบกลุ่มของเชื้อไวรัสด้วย potyvirus group degenerate primer และการหาอนุกรมวิธานที่เหมาะสมสำหรับปฏิกิริยา PCR เทคนิค RT-PCR และตรวจสอบด้วยเทคนิค gel electrophoresis

พบว่าทั้ง 3 อาการมี PCR product ขนาดประมาณ 1200 bp จึงจำแนกได้ว่าอาการทั้ง 3 อาการ มีเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายจัดอยู่ในกลุ่ม potyvirus และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพิ่ม PCR product ของเชื้อคือที่ 56.2 - 65 องศาเซลเซียส ซึ่งจากผลของอาการบนใบแพศชั้นฟรุ้ด การศึกษาชนิดและอาการบนพืชอาศัย ลักษณะ และรูปร่างของเชื้อ รวมทั้งผลการวิเคราะห์ dsRNA และ ขนาดของ PCR product สามารถจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อ passionfruit woodiness virus ซึ่งทำให้สามารถสรุปได้ว่าเชื้อที่เข้าทำลายแพศชั้นฟรุ้ดมีลักษณะของการเข้าทำลายร่วมของเชื้อ 2 ชนิด คือ cucumber mosaic virus (CMV) และ passionfruit woodiness virus (PWV) แต่ความเข้มข้นของเชื้อทั้งสองชนิดในแต่ละอาการมีอัตราส่วนความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จึงทำให้อาการที่แสดงออกที่สำรวจพบมีความแตกต่างกัน

จากการทดสอบควบคุมโรคไวรัสในระยะเวลา 1 ปี ในสภาพพื้นที่ปลูกแตกต่างกัน 3 พื้นที่ คือ แปลงปลูกเชิงเขา แปลงปลูกบนภูเขา และแปลงปลูกบนพื้นที่ราบ โดยการควบคุมโรคคือ 1) การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน โดยการใช้กับดักกาวเหนียวเหลืองร่วมกับการฉีดพ่นสารกำจัดแมลง imidacloprid อัตรา 20 ซีซี /น้ำ 20 ลิตร และการฉีดน้ำมันปิโตรเลียม อัตรา 5 ซีซี /น้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นทุก 2 สัปดาห์ 2) การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว โดยใช้สารกำจัดแมลง imidacloprid อัตรา 20 ซีซี /น้ำ 20 ลิตร เพียงอย่างเดียวฉีดพ่นทุก 2 สัปดาห์ และ 3) แปลงปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งวางแผนการทดลองแบบ 3 x 3 Factorials in RCBD ผลการประเมินระดับความรุนแรงของโรค และการเกิดโรคของทั้ง 3 พื้นที่ พบว่าการใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน สามารถลดระดับความรุนแรงของโรคได้ดีที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคน้อยที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้ สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ พบระดับความรุนแรงของโรคที่ระดับ 0.85, 1.07 และ 1.60 ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคพบ 58.50, 67.94 และ 78.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการใช้วิธีการแบบผสมผสานทำให้ชะลอการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคได้ดีกว่าการใช้ยาฆ่าแมลงเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ การใช้วิธีการแบบผสมผสานสามารถชะลอการเกิดโรคที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ได้ 7 เดือน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวชะลอการเกิดโรคได้ 6 เดือน และแปลงปลูกตามธรรมชาติชะลอการเกิดโรคได้เพียง 4 เดือน นอกจากนี้พบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสานทำให้ได้รับผลผลิตเฉลี่ยต่อเดือนสูงที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ คือได้รับน้ำหนักผลผลิต 91.19, 49.01 และ 22.38 กิโลกรัม ตามลำดับ และผลการสำรวจชนิด และ จำนวนแมลงในแปลงทดลองทั้ง 3 แห่ง พบเพลี้ยอ่อน 2 ชนิด คือ *Myzus persicae* และ *Aphis gossypii* และด้วงเต่า โดยพบแมลงมากที่สุดในแปลงที่ปลูกเชิงเขา รองลงมาคือแปลงปลูกบนที่ราบ และแปลงที่พบแมลงน้อยที่สุดคือแปลงที่ปลูกบนภูเขา และพบว่ามีภาระระบาดของแมลงในช่วงฤดูฝน (เดือนกันยายน - เดือนธันวาคม) มากกว่าในช่วงฤดูร้อน (เดือนมกราคม - เดือนมีนาคม)

<b>Thesis Title</b>	The Decrease of Incidence and Epidemic of Virus on Passionfruit by Integrated Pest Management
<b>Student</b>	Mr. Sirichai Thaworn
<b>Student ID</b>	44066305
<b>Degree</b>	Master of Science (Plant Pest Management Technology)
<b>Programme</b>	Plant Pest Management Technology
<b>Year</b>	2006
<b>Thesis Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Nualpan Ngamyeesoon

### ABSTRACT

Survey of virus disease incidence and disease assessment on passionfruit in 15 growing area of Pathiu district, Chumporn province was determined. The results showed that average virus disease incidence was 89.10 % and average of disease severity was 2.25 (rating scale 0 - 4 level). The diseased plants produced 3 different symptoms on leaves, which were severe mosaic with yellow spots, dark green mottle and mosaic vein banding.

Host range study by mechanical sap transmission of 3 symptoms to test plants in 5 families included *Chenopodium amaranticolor*, *Phaseolus aureus*, *Vigna sesquipedalis*, *Cucumis sativus*, *Gomphrena globosa*, *Passiflora edulis* and *P. foetida*. On *C. amaranticolor* revealed necrotic brown local lesions on inoculated leaves, later went systemic from samples of dark green mottle and mosaic vein banding. On *P. edulis* and *P. foetida* inoculated with 3 different symptoms, showed similar brown spots on inoculated leaves, while upper leaves showed mosaic with leaf distortion and malformation. Examination of virus particles on electromicroscope using leaf dip technique, revealed flexuous rods with an average of 642 nm. in length.

Detection of dsRNA on diseased leaves extracted with Ultra Clean™ Plant RNA Isolation Kit or Plant Concert Solution, and visualised on UV box after electrophoresis on agarose gel resulted 2 bands with molecular weight of  $1.32 \times 10^6$  and  $0.8 \times 10^6$  daltons. The band pattern and the size of dsRNA pointed out the presence of cucumber mosaic virus on diseased leaves. Moreover, using reverses transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) with specific potyvirus group degenerate primer and gradient temperature

resulted in specific band at 1200bp. with optimal temperature at 56.2<sup>o</sup>- 65<sup>o</sup>C for the best reaction.

As a result of host range study, particle size, symptoms on diseased leaves, dsRNA analysis and RT-PCR study, it concluded that passionfruits were infected by mixed infection of cucumber mosaic virus and passionfruit woodiness virus. The difference of combination in mix-infection resulted in variation of symptoms.

Control of virus diseases by integrated pest management (IPM) was studied for 1 year. Experiments were conducted on 3 different locations, which were hillside, on the hill and plain land. Three treatments were applied as follow ; IPM treatments using combination of sticky trap, imidacloprid spraying at 20 ml./20 lt. of water and petroleum oil spraying at 5 ml./20 lt. of water, both spraying at 2 weeks interval, chemical treatment using only imidacloprid spraying at 20 ml./20 lt. of water at 2 weeks interval, control treatment ( non-treated ) using only conventional practice. The experiment was randomized complete block design with three replicates ( 3 x 3 RCBD) The result of disease assessment and disease incidence in 3 locations indicated that IPM treatment decreased in both aspect with significant results of chemical treatment and control treatment at 0.85, 1.07 , 1.60 and 58.50%, 67.94%, 78.61% respectively. Moreover, IPM treatment also delayed the increasing of 100% virus incidence at 7 months after transplanting, while chemical treatment at 6 months and at 4 months for control treatment. In addition, an average yield with significant result at 91.19, 49.01, 22.38 kg. gained from IPM treatment, chemical treatment and control treatment, respectively.

Study of insect types found 2 species of aphids ( *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* ) and beetles. The insect population was significant different with the most density on hillside, on hill and on land. While, in rainy season ( October-December) insect populations were higher than in summer (January-March).

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยคำแนะนำจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. ดร. นवलพรรณ งามเชื้อสู่น ขอขอบพระคุณที่ให้คำปรึกษา คำเสนอแนะ และการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการวิจัยของวิทยานิพนธ์ เล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. รัตนา ปรมาศม และ ผศ. ดร. พรหมมาศ กูหากาญจน์ ที่ให้คำแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยีการเกษตรและบุคคลากรทุกท่านที่ได้อนุเคราะห์อุปการณ์ต่างๆ เกี่ยวกับงานวิจัยนี้ ตลอดจนเกษตรกรผู้ให้ความสะดวกแก่ข้าพเจ้าในด้านสถานที่ทำการทดลองวิจัยทุกท่าน

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา น้องชายและ น้องสาว ที่ให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆ น้องปริญญาตรี และพี่ปริญญาโททุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้คุณค่า และประโยชน์ที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอบอบแด่ บิดา มารดา และผู้มีอุปการะคุณทุกท่าน

ศิริชัย ถาวร

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแพสชันฟรุต.....	4
2.2 โรคไวรัสที่เข้าทำลายและความเสียหายในแพสชันฟรุต.....	5
2.3 การถ่ายทอดของโรคไวรัสในแพสชันฟรุต.....	7
2.4 วิธีการจัดการควบคุมโรคไวรัสในแพสชันฟรุต.....	9
2.5 วิธีการวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิคต่างๆ.....	12
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	17
3.1 การสำรวจโรคไวรัสในแปลงปลูกแพสชันฟรุตและการถ่ายทอดเชื้อ.....	17
3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแพสชันฟรุต.....	19
3.3 การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด ( seed transmission ).....	30
3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัสโดยการตรวจ ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน (Electron microscope).....	30
3.5 การใช้วิธีการแบบผสมผสานในการป้องกันกำจัดโรคไวรัสของแพสชันฟรุต.....	30
3.6 การประเมินระดับความรุนแรงของโรค เปรอ์เซ็นต์การเกิดโรคและผลผลิตที่ได้ .....	31
3.7 สสำรวจชนิดของแมลงพาหะในแปลงปลูกแพสชันฟรุต.....	34
3.8 สถานที่ทำการทดลอง.....	34

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.9 ระยะเวลาในการทดลอง.....	34
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	35
4.1 การสำรวจโรคไวรัสในแปลงปลูกพืชชั้นฟรุ้ดและการถ่ายทอดเชื้อ.....	35
4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชชั้นฟรุ้ด.....	43
4.3 การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด ( seed transmission ).....	49
4.4 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope).....	49
4.5 การประเมินเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคและเปอร์เซ็นต์ การเกิดโรคของพืชชั้นฟรุ้ด เมื่อใช้วิธีการแบบผสมผสานและการใช้ สารเคมีเพียงอย่างเดียวในการป้องกันกำจัดโรคไวรัส.....	53
4.6 การสำรวจชนิดและจำนวนของแมลงพาหะ.....	76
บทที่ 5 วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง.....	82
บรรณานุกรม.....	86
ประวัติผู้เขียน.....	91

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 วงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญและอายุของพืชที่ใช้ในการทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสโดยการถ่ายทอเชื้อไวรัสด้วยน้ำคั้น (mechanical sap transmission).....	19
4.1 การประเมินระดับความรุนแรงของโรค (disease assesment) และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (disease incidence) ของแพสชันฟรุ้ดที่สำรวจจำนวน 15 แปลง.....	39
4.2 ลักษณะอาการการเกิดโรคไวรัสของแพสชันฟรุ้ดจากการถ่ายทอลงในพืชทดสอบจำนวน 5 วงศ์ โดยการใช้ น้ำคั้น (mechanical sap transmission).....	43
4.3 น้ำหนักโมเลกุล dsRNA ของเชื้อไวรัสที่แสดงอาการ 1) ใบค่างจุดเหลืองรุนแรง 2) ใบค่างสีเขียวเข้ม และ 3) ใบค่างเส้นใบมีลักษณะ vein bandin เปรียบเทียบกับตัวมาตรฐานคือ lambda DNA Hind III digest.....	50
4.4 การเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสานการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวและแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกเชิงเขา.....	53
4.5 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสานการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวและแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกเชิงเขา.....	56
4.6 การเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสานการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวและแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา.....	58
4.7 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสานการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวและแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา.....	61
4.8 การเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสานการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวและแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนที่ราบ.....	63
4.9 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสานการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวและแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา.....	67
4.10 น้ำหนักผลผลิตของแปลงที่ใช้การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวและแปลงปลูกตามธรรมชาติ.....	70
4.11 ผลการสำรวจตรวจนับชนิดและจำนวนของแมลงที่ติดกับกับคักกาวเหนียวในวิธีการที่ใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน.....	76

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
3.1 การกำหนดระดับความรุนแรงของโรคซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระดับ.....	18
3.2 ชุดสกัด Ultra Clean™ Plant RNA Isolation Kit.....	24
3.3 ชุดสกัดโดยใช้น้ำยา Plant concert solution.....	24
3.4 อุปกรณ์การเตรียม gel electrophoresis สำหรับการตรวจ dsRNA.....	25
3.5 การคำนวณสมการเชิงเส้นและค่า R-squared .....	26
3.5 อุปกรณ์การเตรียม gel electrophoresis สำหรับการตรวจ PCR product.....	29
3.7 ขนาดพื้นที่ ระยะปลูก และการวางแผนผังการทดลองแต่ละวิธีการในสภาพพื้นที่แต่ ละแปลงทดลอง.....	32
3.8 การวางแผนผังในการสุ่มต้นพืชชั้นฟรุ้ตอย่างมีระบบในการประเมินระดับความ รุนแรงของโรคและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค.....	33
4.1 อาการใบด่างจุดเหลืองรุนแรง.....	36
4.2 อาการด่างสีเขียวเข้ม.....	37
4.3 อาการใบด่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding.....	38
4.4 การประเมินระดับความรุนแรงของโรคไวรัส (disease assesment) ในแปลงปลูก พืชชั้นฟรุ้ตของเกษตรกรจำนวน 15 แปลง.....	39
4.5 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัส (disease incidence) ในแปลงปลูก พืชชั้นฟรุ้ตของเกษตรกรจำนวน 15 แปลง.....	40
4.6 การประเมินระดับความรุนแรงของโรค (disease assesment) และเปอร์เซ็นต์การเกิด โรค (disease incidence) ของพืชชั้นฟรุ้ตที่สำรวจจำนวน 15 แปลง.....	40
4.7 อาการของโรคไวรัสหลังจากปลูกเชื้อ 28 วัน ในต้นกล้าพืชชั้นฟรุ้ต.....	42
4.8 ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดจากอาการใบด่างจุดเหลืองรุนแรงในพืช ทดสอบชนิดต่างๆ.....	46
4.9 ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดจากอาการอาการใบด่างสีเขียวเข้มในพืช ทดสอบชนิดต่างๆ.....	47
4.10 ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดจากอาการใบด่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding ในพืชทดสอบชนิดต่างๆ.....	48
4.11 การตรวจสอบ dsRNA ของอาการตัวอย่างพืชชั้นฟรุ้ตที่แสดงอาการ โรคไวรัส ซึ่งประกอบด้วย 3 อาการ ด้วยวิธี gel electrophoresis.....	50

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.12 การใช้วิธี gel electrophoresis ตรวจสอบ temperature gradient PCR.....	51
4.13 การใช้วิธี gel electrophoresis ตรวจสอบ Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR) ของเชื้อด้วยกลุ่ม potyvirus.....	51
4.14 ลักษณะของอนุภาคของเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นแพสชันฟรุต.....	52
4.15 การเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสในพื้นที่แปลงปลูกเชิงเขา.....	54
4.16 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสในพื้นที่แปลงปลูกเชิงเขา.....	57
4.17 การเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา.....	59
4.18 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา.....	62
4.19 การเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสในพื้นที่แปลงปลูกบนที่ราบ.....	65
4.20 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา.....	68
4.21 การเปรียบเทียบระดับการเกิดโรคเฉลี่ยต่อปี.....	71
4.22 การเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยต่อปี.....	71
4.23 น้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยของแพสชันฟรุตใน 3 สภาพแปลงปลูก.....	73
4.24 น้ำหนักผลผลิตของแพสชันฟรุตในแปลงปลูกบนภูเขา.....	73
4.25 น้ำหนักผลผลิตของแพสชันฟรุตในแปลงปลูกบนพื้นที่ราบ.....	75
4.26 การเปรียบเทียบน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยต่อเดือน.....	75
4.27 การเปรียบเทียบจำนวนแมลงที่ตรวจนับจากกับดักกาวเหนียวในแปลงปลูกเชิงเขา.....	79
4.28 การเปรียบเทียบจำนวนแมลงที่ตรวจนับจากกับดักกาวเหนียวในแปลงปลูกบนภูเขา.....	79
4.29 การเปรียบเทียบจำนวนแมลงที่ตรวจนับจากกับดักกาวเหนียวในแปลงปลูกบนพื้นที่ราบ....	80
4.30 การเปรียบเทียบจำนวนแมลงเฉลี่ยต่อปีที่ตรวจนับจากกับดักกาวเหนียวใน 3 สภาพพื้นที่แปลงเพาะปลูก.....	81

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มา

แพสชันฟรุต หรือเสาวรส (passionfruit) เป็นพืชอุตสาหกรรมชนิดใหม่ที่มีผู้นิยมปลูกกันมากขึ้นในปัจจุบัน การเพาะปลูก และการดูแลรักษาง่าย สามารถทนแล้งได้ดี เจริญเติบโตเร็ว ให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่สูง สามารถเก็บผลผลิตได้ตลอดทั้งปี มีระยะเวลาการให้ผลผลิตยาวนาน น้ำแพสชันฟรุตมีวิตามินซีสูงกว่าน้ำส้มถึง 3 เท่า จึงเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในประเทศ และต่างประเทศ สามารถนำมารับประทานผลสดหรือแปรรูป ทั้งเป็นน้ำผลไม้ และใช้เป็นส่วนประกอบผสมของน้ำผลไม้ชนิดอื่นเพื่อเพิ่มรสชาติที่แปลกใหม่ ทำให้รสชาติ มีกลิ่นหอม นอกจากนี้ยังมีคุณค่าทางอาหาร มีปริมาณแคโรทีน และวิตามินซีสูง ปัจจุบันมีการขยายพื้นที่การเพาะปลูกกันอย่างกว้างขวาง มีบริษัทเอกชนเข้ามาส่งเสริมการปลูกและรับซื้อนำไปพัฒนาเป็นอุตสาหกรรมการแปรรูปหลายอย่าง เพื่อทดแทนการปลูกข้าวโพด และพืชไร่ชนิดอื่นที่ประสบปัญหาทางโรค และแมลง ตลอดจนราคาของผลผลิตที่ตกต่ำ (ดวงใจ ชูปัญญา. 2534) จากสถิติการปลูกแพสชันฟรุตปี 2542 พบว่าผลผลิตแพสชันฟรุตมีไม่เพียงพอต่อความต้องการของโรงงาน ก็สามารถผลิตผลผลิตรวมทั้งประเทศได้จำนวน 5,232 ตัน แต่มีบริษัทหรือโรงงานที่ต้องการแพสชันฟรุตเป็นวัตถุดิบรวมทั้งประเทศเท่ากับ 14,113 ตัน (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542) ซึ่งหากได้มีการขยายการผลิต และการแปรรูปภายในประเทศให้มากขึ้นก็จะเพิ่มประโยชน์ต่อเกษตรกร ในการเสริมรายได้ และสามารถส่งออกเพื่อนำเงินตราเข้าประเทศ ช่วยลดการขาดดุลทางการค้า แต่การผลิตแพสชันฟรุตในปัจจุบันก็พบว่า ยังมีปัญหาทางแมลง และโรคที่สำคัญอยู่บ้าง ซึ่งแมลงที่ทำความเสียหายกับผลผลิต ได้แก่ แมลงวันทอง แมงมุมแดง ค้างคาวปีกแข็ง หนอนเจาะกิ่งหรือลำต้น ซึ่งมักจะเจาะแทงผลอ่อน ทำให้ผลเหี่ยว ผลหลุ่ร่วง นอกจากนี้ ยังพบเพลี้ยอ่อนเป็นศัตรูที่สำคัญ ซึ่งพบว่ามักจะระบาดมากในช่วงฤดูฝน สำหรับโรคที่มีสาเหตุจากเชื้อราได้แก่ โรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อ *Phytophthora cinnamoni* และ *Phytophthora megasperma* ซึ่งพบมากในฤดูฝน โรคใบจุดสีน้ำตาลที่เกิดจากเชื้อ *Alternaria passiflorae* ทำให้มีรอยฉ่ำน้ำ มีจุดสีน้ำตาลที่ผล ใบหลุ่ร่วง โรคผลเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Botryodi plodia theobromae* ทำให้ผิวหรือขั้วผลเกิดแผลเน่าสีน้ำตาลอ่อน เหี่ยวยุบ และเน่า บางส่วนของผลจะยุบตัวลง นอกจากนี้ยังพบโรครวมตามข้อหรือกิ่งที่เกิดจากเชื้อ *Fusarium* sp (ฉฐพร พรหมสร. 2546)

โรคที่พบว่าเป็นปัญหาที่สำคัญ และพบบ่อยที่สุดของแพสชันฟรุตคือ โรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อไวรัส ซึ่งในต่างประเทศมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อไวรัสหลายชนิดที่เข้าทำลายแพสชันฟรุตเชื้อที่สำคัญได้แก่ passionfruit woodiness virus ทำให้ใบมีอาการต่างแบบ mosaic ซึ่งเซลล์พืชในบาง

พื้นที่หรือบางส่วนมีการเปลี่ยนสีโดยเซลล์ที่เป็นโรคจะมีสีเขียวอ่อนหรือสีเหลืองปนเขียวเนื่องจากการสูญเสียคลอโรฟิลล์ ใบมีจุดวงแหวนมีสีแตกต่างกันจากสีเขียวเข้มไปถึงจุดสีเหลืองซึ่งแห้งตาย ผลมีลักษณะบิดเบี้ยวผิดปกติ รูปร่าง เปลือกผลหนา และแข็ง อนุภาคของเชื้อไวรัสสาเหตุโรคมีรูปร่างเป็นท่อนยาว ขนาด 750 นาโนเมตร กว้าง 12 นาโนเมตร และเชื้อ passionfruit yellow mosaic virus ทำให้ใบค่างเป็นจุดสีเหลืองอ่อน ใบม้วนงอ ลักษณะอนุภาคของเชื้อมีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 นาโนเมตร และ capsid protein ของเชื้อมีน้ำหนักประมาณ 20.5 กิโลคาลตัน (Chang. 1992) passion fruit crinkle virus ทำให้ใบหงิกงอ แต่จะไม่แสดงอาการของโรคที่ผล (Chang. 1996) passionfruit srilankan mottle virus ทำให้เกิดอาการใบค่างแบบ systemic มีจุดสีเหลืองจำนวนมาก ใบบิดเบี้ยวผิดปกติ รูปร่าง เส้นใบเหลือง ผลห่อหุ้มด้วยเปลือก ลักษณะอนุภาคของเชื้อสาเหตุโรคมีรูปร่างเป็นท่อนยาวประมาณ 841 นาโนเมตร polypeptide มีน้ำหนักโมเลกุล 2 ชนิดคือ 28.7 กิโลคาลตัน และ 33.2 กิโลคาลตัน และเชื้อ passionfruit vein clearing virus ทำให้เส้นใบโปร่งแสง ใบเปราะ ลำต้นมีข้อปล้องสั้น ผลบิดเบี้ยวผิดปกติ รูปร่าง และผลผลิตลดลง (Brunt *et al.* 1996) passiflora ringspot virus ทำให้ใบค่าง พื้นที่เป็นโรคมีลักษณะกลมเป็นจุดวงแหวน อนุภาคของเชื้อไวรัสมีรูปร่างเป็นแท่งยาวขนาด 810 ถึง 830 นาโนเมตร กว้าง 15 นาโนเมตร และเชื้อ passiflora latent carlavirus ไม่แสดงอาการของโรคในพืชชั้นฟรุ้ด แต่จะแสดงอาการใบค่างเหลืองแบบ systemic ใน *Chenopodium quinoa* อนุภาคของเชื้อมีลักษณะเป็นท่อนยาวมีขนาด 651 นาโนเมตร กว้าง 12 นาโนเมตร (Pares *et al.* 1997) cucumber mosaic virus ทำให้พืชมีอาการใบค่างเป็นจุดวงแหวน ใบม้วนงอ ปลายใบเหลือง (Xu *et al.* 1999)

ในประเทศไทยพบว่าโรคไวรัสที่สำคัญของพืชชั้นฟรุ้ดเกิดจากเชื้อ passionfruit woodiness virus ทำให้เกิดอาการใบค่างเป็นวงแหวนใบบิดเบี้ยว ผลมีลักษณะบิดเบี้ยวเปลือกผลหนากว่าปกติ ขนาดของผลเล็กลง ผลผลิตลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อ cucumber mosaic virus ทำให้เกิดอาการ ใบค่างและเหลือง ใบยอดหงิกงอ ผิวใบไม่เรียบและผลบิดเบี้ยว ซึ่งถ้าเชื้อทั้งสองชนิดนี้เข้าทำลายร่วมกัน จะทำให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มมากยิ่งขึ้น การป้องกันกำจัดทำได้ยากเพราะพายุในการนำโรคมียหลายชนิด ดินที่เป็นโรคแล้วไม่สามารถรักษาให้หายได้ต้องกำจัดโดยการถอนทิ้ง และนำไปเผาเท่านั้น นอกจากนี้เชื้อยังสามารถถ่ายทอดทางการทาบกิ่ง แมลงพาหะ วัชพืช และพืชอื่นๆ ที่ปลูกในบริเวณนั้นด้วย (ดวงใจ ชูปัญญา และ วรธรรม สักคังศ์. 2529ข) สำหรับอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร เป็นแหล่งหนึ่งที่มีการปลูกพืชชั้นฟรุ้ดกันอย่างกว้างขวางทางภาคใต้ เกษตรกรสามารถขายผลผลิตสดหรือนำส่งโรงงานแปรรูปผลไม้รวมบรรจุกระป๋อง แต่ปัญหาหลักที่สำคัญที่ทำให้คุณภาพ และปริมาณของผลผลิตลดลง คือโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ด้วยสาเหตุนี้จึงจำเป็นต้องนำวิธีการที่เหมาะสมมาใช้ เพื่อลดความเสียหาย สามารถควบคุมป้องกันกำจัดเชื้อไวรัสในแปลงปลูก ผลิตผลผลิตได้เพียงพอต่อความต้องการบริโภคภายในประเทศ และส่งออกเพื่อทำรายได้แก่ประเทศ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อสำรวจโรคไวรัส และแมลง ประเมินระดับความรุนแรงของโรคไวรัสและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของแพชชั่นฟรุตในท้องที่ อ. ปะทิว จ. ชุมพร
- 1.2.2 ทำการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแพชชั่นฟรุต
- 1.2.3 หาแนวทางในการป้องกันกำจัดโรคไวรัสโดยใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานแพชชั่นฟรุต

## 1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 ทราบความรุนแรงของโรค และจำนวนชนิดของแมลงที่เป็นพาหะนำโรคไวรัสของแพชชั่นฟรุตในท้องที่ อ. ปะทิว จ. ชุมพร
- 1.3.2 ทราบชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแพชชั่นฟรุต
- 1.3.3 วิธีการป้องกันกำจัดและ ลดปัญหาการแพร่ระบาดของโรคไวรัสในแพชชั่นฟรุต

## บทที่ 2

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของแพสชันฟรุต

แพสชันฟรุต (Passionfruit) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Passiflora laurifolia* Linn มีชื่อไทยว่า เสาวรส กะทกรกยักษ์ หรือ กะทกรกฝรั่ง เป็นพืชจัดอยู่ในวงศ์ Passifloraceae อยู่ในตระกูลเดียวกับ กะทกรกไทย ซึ่งเป็นวัชพืชที่ขึ้นกระจายอยู่ทั่วไป แพสชันฟรุตมีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในประเทศ เม็กซิโก บราซิล และปารากวัย ต่อมาได้แพร่กระจายไปยังประเทศออสเตรเลีย อินเดีย เคนยา นิวซีแลนด์ ออฟริกาใต้ นิวกินี มาเลเซีย และไต้หวัน แต่ได้พัฒนาเป็นพืชอุตสาหกรรมได้อย่างดีที่ ประเทศออสเตรเลีย ไต้หวัน และสหรัฐอเมริกา สำหรับในประเทศไทยได้ถูกนำเข้ามาทดลองปลูก เป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2498 ที่สถานีการเกษตรแม่โจ้ ต่อมาได้ทดลองปลูกที่มหาวิทยาลัยเกษตร ศาสตร์ บางเขน สถานีทดลองเกษตรที่สูง คอยขุนช่างเคี่ยน และโครงการแม่สา จังหวัดเชียงราย และได้นำมาส่งเสริมให้เป็นพืชเศรษฐกิจชนิดใหม่ โดยส่งเสริมให้ปลูกแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก คือ จังหวัดระยอง จันทบุรี ซึ่งได้นำมาแปรรูปโดย บริษัทสยามอุตสาหกรรม ไปใช้ผสมกับน้ำผลไม้ ชนิดอื่นเพื่อให้รสชาติดี ปัจจุบันในประเทศไทยมีการเพาะปลูกกันอย่างกว้างขวาง แหล่งที่เพาะ ปลูกกันมากได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน เพชรบูรณ์ ลำพูน นครราชสีมา บุรีรัมย์ ปราจีนบุรี ชลบุรี จันทบุรี ระยอง ประจวบคีรีขันธ์ และ ชุมพร (กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542)

ลักษณะของลำต้นเป็นไม้เลื้อย มีเถายาวอาจยาวถึง 15 เมตร มีอายุประมาณ 4 - 5 ปี ต้น อ่อนมีสีเขียวไม่มีขน ข้างในลำต้นกลวง เมื่อแก่ลำต้นจะกลายเป็นสีม่วงอมแดง และเริ่มมีมือเกาะ เมื่อยาวประมาณ 6 - 8 ข้อ มือเกาะมีสีเขียว ม้วนขดเป็นวง ช่วยในยึดเกาะของลำต้น ลำต้นสามารถ จะแตกออกเป็นกิ่ง เจริญเติบโตแผ่ปกคลุมพื้นที่ได้อย่างรวดเร็ว

ลักษณะของใบ ใบของต้นอ่อนมีรูปร่างรีเหมือนรูปไข่ ฐานใบเป็นรูปหัวใจ ขอบใบมีหยัก เล็กๆ เมื่อเริ่มโตใบจะแตกออกเป็น 3 แฉก ก้านใบไม่มีขน ที่โคนใบต่อกับก้านใบจะมีต่อมเล็กๆ 2 อัน

ลักษณะของดอกเป็นดอกเดี่ยว จะเริ่มออกดอกเมื่อมีอายุประมาณ 5 เดือน ดอกออกตามตา ข้าง เมื่อบานเต็มที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6 - 10 เซนติเมตร มีสีสวยงามสะดุดตา มีกลิ่นหอม กลีบรองดอกมี 3 ใบ อยู่ที่ปลายของก้านดอก กลีบเลี้ยงมีฐานรองดอก 5 อัน ลักษณะรูปไข่ยาวเรียว ด้านล่างสีเขียวอมเหลือง ด้านบนสีขาว กลีบดอกมี 5 กลีบ ขนาดใหญ่กว่ากลีบเลี้ยงเล็กน้อย เป็นรูป ไข่มีสีขาวแบนบาง ตรง โคนกลีบดอกมีสีม่วง มีเกสรตัวผู้ 5 อัน และอับเกสรอยู่ตรงปลาย กลางดอก มีก้านชูรังไข่ ที่ยอดรังไข่จะมีก้าน 3 อันซึ่งจะมีเกสรตัวเมียที่ปลาย

ลักษณะของผล เริ่มติดผลขณะมีอายุได้ 6 - 7 เดือน ผลอ่อนมีสีเขียว ผิวเรียบเป็นมัน รูปร่าง กลมหรือรี มีจุดสีขาวกระจายอยู่ทั่วไป เมื่อโตเต็มที่ผลมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 - 7 เซนติเมตร ผล

แก้มสีเหลืองเข้มหรือสีม่วงเข้มแล้วแต่พันธุ์ เปลือกผลชั้นนอกจะแข็งบาง ชั้นกลางมีสีเขียว สำหรับชั้นในมีสีขาวจะหนา และอ่อนนุ่มมีเมล็ดจำนวนมากติดอยู่กับผนังรังไข่ เมล็ดมีสีดำ รูปร่างแบนเหมือนใบไม้ มีถุงห่อหุ้มสีเหลือง น้ำในผลมีสีเหลืองเข้ม รสเปรี้ยว มีกลิ่นหอม

## 2.2 โรคไวรัสที่เข้าทำลายและความเสียหายในแพชชั่นฟรุต

โรคไวรัสเป็นสาเหตุหลักสำคัญของแพชชั่นฟรุต ซึ่งพบว่าโรคมีการระบาด และกระจายอยู่ทั่วไปในหลายพื้นที่ บางแห่งอาการของโรคมีความรุนแรงมากทำให้ผลผลิต และคุณภาพลดลง มีเชื้อไวรัสหลายชนิดที่สามารถเข้าทำลายแพชชั่นฟรุต ได้แก่ passionfruit woodiness virus ที่ทำให้เกิดโรค passionfruit woodiness ซึ่งมีรายงานว่าพบการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางในประเทศได้หวัน บราซิล และแอฟริกาใต้ในปี 1980 (Kitajima *et al.* 1986; Brand *et al.* 1993) อาการของโรคคือใบมีอาการด่างเป็นจุดสีเหลือง ต่อมากลายเป็นจุดวงแหวน ทำให้ใบพืชบิดเบี้ยว ใบเปลี่ยนรูปร่าง ผลบิดเบี้ยว เปลือกผลแข็ง และหนา อายุการให้ผลผลิตลดลง

Crestani *et al.* (1986) รายงานว่าในรัฐ Rio de Janeiro ประเทศบราซิล พบแพชชั่นฟรุตพันธุ์ Golden (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) มีอาการด่างเหลือง ใบหงิกงอ จากการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนโดยเทคนิค leaf dip พบว่าเกิดจากเชื้อ passionfruit yellow mosaic virus ซึ่งอนุภาคมีรูปร่างเป็นทรงกลม มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 30 นาโนเมตร

Taylor and Greber (1973) รายงานว่าเชื้อไวรัสสาเหตุของโรค passionfruit woodiness มีอนุภาครูปร่างเป็นแท่งยาวขนาด 750 x 12 นาโนเมตร และcapsid protein ของเชื้อมีน้ำหนักประมาณ 37 กิโลดาลตัน

Chang (1992) รายงานว่าพบโรค passiflora leaf mottle virus ในประเทศไต้หวัน โดยพืชแสดงอาการด่างเล็กน้อยที่ใบ รูปร่างและ ขนาดอนุภาคของเชื้อจะใกล้เคียงกับเชื้อ passionfruit woodiness virus แต่ capsid protein ของเชื้อจะมีน้ำหนักประมาณ 38 กิโลดาลตัน

โรค passionfruit srilankan mottle virus พบในประเทศศรีลังกาโดย Dassanayake and Hicks (1992) คือพบอาการเป็นจุดด่างที่ใบจำนวนมากทำให้พืชอ่อนแอลง ผลจะแข็งมาก เชื้อไวรัสมีรูปร่างเป็นแท่งยาวขนาด 841 นาโนเมตร มีน้ำหนักโมเลกุลของ polypeptide 2 ชนิดคือ 33.2 และ 28.7 กิโลดาลตัน

Brand *et al.* (1993) ได้ศึกษาโรค passionfruit woodiness virus ในประเทศแอฟริกาใต้ พบว่าแพชชั่นฟรุตแสดงอาการใบด่าง ผลด่าง ผิวเปลือกไม่เรียบ และเปลือกหนากว่าปกติ ผลผลิตลดลงต่อมาสามารถจำแนกเชื้อสาเหตุได้คือเชื้อ cucumber mosaic virus, tobacco necrosis virus และ passionfruit woodiness virus

Brown *et al.* (1993) รายงานว่าพบแพสชันฟรุตเป็นโรค *passiflora leaf mottle virus* เป็นครั้งแรกในประเทศเปอร์โตริโกซึ่งพืชมีอาการใบค่าง หงิกรุนแรง ใบมีวันบิดเบี้ยวทำให้ผลผลิต และคุณภาพลดลง

Bencher *et al.* (1996) รายงานโรคไวรัสของแพสชันฟรุตในประเทศโคลัมเบียที่ทำให้เกิดอาการต่างรุนแรง ใบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และต้นตายก่อนให้ผลผลิต ซึ่งจากการจำแนกเชื้อโดยการ ใช้วิธี Western blot analysis เปรียบเทียบกับเชื้อในกลุ่ม potyvirus และการทดสอบชนิดของพืชอาศัย ลักษณะอาการวิทยา ลำดับของกรดอะมิโน ลำดับของนิวคลีโอไทด์และปฏิกิริยาของ Dot-blot hybridization พบว่าเชื้อที่ก่อปัญหานั้นคือ soybean mosaic virus

Trindade *et al.* (1999) ได้รายงานการสำรวจเชื้อไวรัสจาก 2 พื้นที่ในประเทศบราซิล คือที่ Capitaio Paco และ Igarape Acu รัฐ Para แล้วนำมาจำแนกเชื้อไวรัสสาเหตุของโรคด้วยวิธี PTA-ELISAs (Plate-Trapped Antigen Enzyme Linked Immunosorbent Assays) และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) พบว่าสาเหตุของโรคแพสชันฟรุตในแปลงเกิดจากเชื้อ *passionfruit woodiness virus* ซึ่งทำให้เกิดโรคในแปลงประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องมาจากการนำต้นกล้าที่เป็นโรคจากรัฐ Minas และ Bahia ของประเทศบราซิลเข้ามาปลูก

Barbosa *et al.* (1999) รายงานว่าใบของ *passionfruit* พันธุ์ Golden ในประเทศบราซิล มีอาการจุดค่าง จากการทดสอบการถ่ายทอดในพืชอาศัยและการใช้วิธี ELISA (Enzyme - Linked Immunosorbent Assay) พบว่าเชื้อสาเหตุโรคคือ cucumber mosaic virus

Xu *et al.* (1999) พบว่าเชื้อไวรัสสาเหตุโรคของ *Passiflora* spp ใน Fujian ประเทศจีน เกิดจากเชื้อ cucumber mosaic virus เมื่อทำการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) และการใช้วิธี PAS-ELISA (Protein A - sandwich Enzyme - linked Immunosorbent Assay) พบการเกิดโรค 30 – 40 เปอร์เซ็นต์ บางครั้งพบ 90 เปอร์เซ็นต์ จากการสำรวจโรคไวรัสในแปลงปลูกแพสชันฟรุตระหว่างปี 1988 - 1995 โดยพืชแสดงอาการใบค่างเป็นจุดวงแหวน ใบมีวันงอ ปลายใบเหลือง

Novaes *et al.* (2000) รายงานว่าโรคไวรัสของแพสชันฟรุตในประเทศบราซิลที่แพร่ระบาด และทำความเสียหายแก่แพสชันฟรุต เกิดจากเชื้อสาเหตุหลายชนิดคือ *passionfruit woodiness virus*, cucumber mosaic virus, *greenspot passiflora virus*, *passionfruit vein clearing*, *passion fruit yellow mosaic virus* และ *purple granadilla mosaic virus*

Moraes *et al.* (2002) ทำการทดสอบแปลงปลูก *Passiflora nitida* ในรัฐ Sao Paulo ประเทศบราซิล เพื่อศึกษาความอ่อนแอของ *Passiflora nitida* ต่อเชื้อ *passionfruit woodiness virus* จากการตรวจสอบด้วยวิธีทางเซรัมวิทยา และการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy) พบว่า *Passiflora nitida* แสดงความอ่อนแอ และแสดงอาการของโรค *passionfruit woodiness virus*

สำหรับในประเทศไทย มีการศึกษาโรคไวรัสของแพสชันฟรุตในหลายจังหวัด ได้แก่ จังหวัด เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน เพชรบูรณ์ ชัยนาท ปราจีนบุรี ขอนแก่น ระยอง และจันทบุรี โดย ดวงใจ ชูปัญญา และ วรธรรม สักคiewicz (2529ก) พบอาการใบด่าง ผิวใบไม่เรียบมีลักษณะเป็นคลื่น มีรอยนูนชัดเจน เป็นจุดวงแหวน จากการทดสอบในพีชอายุ 24 ชนิดแล้วตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) ด้วยวิธี leaf dip พบอนุภาคเชื้อไวรัสเป็นท่อนยาวคดงอ คือเชื้อ passionfruit woodiness virus และจากการทดสอบการถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน 4 ชนิด คือ *Myzus persicae*, *Aphis craccivora*, *A. glycines* และ *A. gossypii* โดยเลือกตัวเต็มวัยที่สมบูรณ์ และแข็งแรงไม่มีปีกมาถ่ายทอดโรคใบด่าง โดยการนำเพลี้ยอ่อนมาคอกอาหารใน petri dish เป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมงแล้วย้ายเพลี้ยอ่อนไปคอกกินต้นแพสชันฟรุตที่แสดงอาการเป็นโรคนาน 24 ชั่วโมง แล้วย้ายเพลี้ยอ่อนไปคอกกินต้นกล้าแพสชันฟรุตปกติ ที่มีอายุประมาณ 45 วัน นาน 24 ชั่วโมงโดยใช้เพลี้ยอ่อน 25 ตัวต่อต้น หลังจากนั้นฉีดพ่นยาฆ่าแมลง แล้วนำต้นกล้าแพสชันฟรุตไปเก็บในกรงกันแมลง ติดตามตรวจอาการการติดโรค 7 - 30 วัน ซึ่งพบว่า *A. gossypii* สามารถถ่ายทอดได้ดีที่สุดคือ 100 เปอร์เซ็นต์ *A. craccivora* 30 เปอร์เซ็นต์ *M. persicae* 30 เปอร์เซ็นต์ และ *A. glycines* ถ่ายทอดได้น้อยที่สุดคือ 10 เปอร์เซ็นต์

ดวงใจ ชูปัญญา และคณะ (2531) พบว่าแพสชันฟรุตของบริษัทสยามอุตสาหกรรมที่จังหวัดระยอง ในปี 2528 - 2529 เป็นโรคใบด่างถึง 100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบอาการใบด่าง เส้นใบสีผลด่าง ผิวเปลือกไม่เรียบ เปลือกหนากว่าปกติ ผลบิดเบี้ยวมีขนาดเล็ก ผลผลิตลดลงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ สาเหตุเกิดจากเชื้อ passionfruit woodiness virus นอกจากนี้ยังพบเชื้อ cucumber mosaic virus แพสชันฟรุตมีอาการด่าง และด่างเหลือง ใบยอดบิดและ หงิกงอ ผิวใบไม่เรียบ ผลบิดเบี้ยว ซึ่งถ้าเกิดเชื้อทั้งสองชนิดเข้าทำลายร่วมกันจะทำให้แพสชันฟรุตมีอาการรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น

โดยทั่วไปแล้วในธรรมชาติ พบว่าแพสชันฟรุตมีการเข้าทำลายร่วมของเชื้อไวรัสมากกว่าหนึ่งชนิด เชื้อไวรัสหลายชนิดสามารถเข้าทำลายร่วมกันบนพีชชนิดเดียวกัน ทำให้อาการของโรคมีความรุนแรง และความเสียหายเพิ่มขึ้น ซึ่งกองโรคพืชและจุลชีววิทยา (2532) ศึกษาเชื้อไวรัสโรคใบด่างแพสชันฟรุตจากแหล่งปลูกต่างๆ ในประเทศไทยโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) พบว่าในหนึ่งอาการมีลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสอยู่ร่วมกัน 2 แบบ คืออนุภาคเป็นท่อนยาวคดงอ และอนุภาคทรงกลม ซึ่งก็คือเชื้อ passionfruit woodiness virus และ cucumber mosaic virus

### 2.3 การถ่ายทอดของโรคไวรัสในแพสชันฟรุต

เชื้อไวรัสเป็นเชื้อสาเหตุโรคพืชที่ไม่สามารถเข้าสู่พืชอาศัยด้วยตัวเอง ต้องอาศัยพาหะหรือเข้าทางบาดแผล เชื้อไวรัสบางชนิดสามารถเข้าสู่พืชได้วิธีเดียว และบางชนิดเข้าสู่พืชได้หลายวิธี ซึ่งลักษณะวิธีของการถ่ายทอดจะมีความสำคัญในแง่ของการแพร่ระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนั้นๆ การถ่ายทอดเชื้อโดยวิธีกล (mechanical transmission) เป็นการเข้าสู่พืชทางบาดแผล ไม่ค่อยเกิดขึ้นเอง

ตามธรรมชาติ เพราะเชื้อไวรัสส่วนใหญ่มีปริมาณไม่สูงพอในเซลล์พืชหรือไม้คงทนเมื่อแยกตัวออกจากเซลล์พืช แต่ก็มีเชื้อไวรัสบางชนิด คือ tobacco mosaic virus และ potato virus X สามารถแพร่กระจายได้โดยการปฏิบัติทางเขตกรรม เช่น การใช้มีดหรือกรรไกรตัดแต่งพืช (นวลพรรณงามยี่สุน. 2539)

ธีระ สุตะบุตร (2532) รายงานว่าเชื้อ cucumber mosaic virus มีพืชอาศัย (host range) กว้างมาก จากการทดสอบพืชอาศัย 46 ชนิดใน 13 วงศ์ คือวงศ์ Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Compositae, Cucurbitaceae, Labiatae, Leguminosae, Pedaliaceae, Polemoniaceae, Solanaceae, Umbelliferae, Cruciferae, Gramineae และ Convolvulaceae โดยการถ่ายทอดผ่านทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission) พบว่าสามารถเข้าทำลายพืชทดสอบได้จำนวน 35 ชนิดใน 10 วงศ์ ซึ่งมีเพียง 3 วงศ์เท่านั้นที่ไม่ใช่พืชอาศัย ได้แก่ วงศ์ Cruciferae, Gramineae และ Convolvulaceae

Satya *et al.* (2002) รายงานว่าเชื้อ chilli veinal mottle virus ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุโรคไวรัสของพริก ในประเทศอินเดีย ทำให้ใบพริกมีอาการค่างสีเขียวเข้ม และใบม้วนงอ สามารถถ่ายทอดทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission) ได้ดีลงในพืชอาศัยในวงศ์ Solanaceae และยังสามารถถ่ายทอดผ่านทางแมลงพาหะคือ เพลี้ยอ่อน *A. gossypii*, *A. craccivora* และ *M. persicae* แบบ non – persistent

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ด (seed transmission) เชื้อไวรัสสามารถติดไปกับส่วนของ seed coat และถ่ายทอดลงสู่ต้นกล้าเมื่อมีการนำเมล็ดไปเพาะซึ่ง Tomlinson and Carter (1970) รายงานว่าเชื้อ cucumber mosaic virus สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดของต้น *Stellaria media* ได้ 21-40 เปอร์เซ็นต์ ถ้าต้นแม่เกิดจากเมล็ดที่เป็นโรค และ Cooper (1976) รายงานว่าเชื้อ cherry leaf roll virus สามารถถ่ายทอดผ่านทางเมล็ดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเชื้อเข้าทำลายต้นยาสูบ *N. rustica* ซึ่งปลูกที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สำหรับในแพสชันฟรุต ปัจจุบันยังไม่พบว่ามีรายงานการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางเมล็ดพันธุ์ (seed transmission) ซึ่งการถ่ายทอดเชื้อไวรัสในแพสชันฟรุตที่สำคัญ ได้แก่ การถ่ายทอดทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission) การทาบกิ่ง (transmission by grafting) และทางแมลงพาหะ (insect transmission) (Taylor and Greber. 1973)

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสโดยการทาบกิ่ง (transmission by grafting) วิธีนี้สามารถเกิดขึ้นได้เมื่อมีการใช้ต้น stock หรือ scion ที่เป็นโรคในการทาบกิ่ง การถ่ายทอดเชื้อไวรัสจะประสบความสำเร็จมากขึ้น ถ้าการทาบกิ่งใช้ส่วนของ stock และ scion ของพืชที่อยู่ใน species เดียวกันหรือใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังสามารถถ่ายทอดโดยติดไปกับท่อนพันธุ์ (transmission by vegetative propagation) ซึ่งวิธีนี้จะเกิดกับพืชที่ใช้การขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ คือการขยายพันธุ์แบบ การปักชำ การตอน การใช้ไหล และการใช้หัวปลุก

การถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่สำคัญที่สุดในการแพร่ระบาดของโรคคือ การถ่ายทอดทางแมลงพาหะ ซึ่งแมลงพาหะส่วนใหญ่จะอยู่ใน Order Homoptera ประกอบไปด้วยวงศ์ Aphididae คือ

เพลี้ยอ่อนชนิดต่างๆ วงศ์ Cicadellidae คือ เพลี้ยจักจั่น วงศ์ Delphacidae คือ เพลี้ยกระโดด วงศ์ Aleyrodidae คือ แมลงหมีขาวและ วงศ์ Pseudococcidae คือ เพลี้ยแป้งนอกจากนี้ยังมี Order Coleoptera คือ พวกด้วงชนิดต่างๆ Order Thysanoptera คือ เพลี้ยไฟ และ Order Acarina คือ พวกไร ซึ่ง Jayashree *et al.* (1999) รายงานว่าเชื้อ pumpkin yellow vein mosaic virus เข้าทำลายต้นฟักทองอย่างกว้างขวางได้ในทุกระยะการเจริญเติบโต ซึ่งพาหะนำโรคคือแมลงหมีขาว *Bemisia tabaci* และพบว่าการถ่ายทอดเชื้อทำให้เกิดโรคได้ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้แมลงอดอาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมงแล้วนำมาปล่อยให้ดูดกินพืชที่ปกตินาน 3 ชั่วโมงในอัตรา 15 ตัวต่อต้น

Doomar *et al.* (1999) รายงานว่าเชื้อ cucumber mosaic virus ที่เข้าทำลายต้น marigold (*Tagetes erecta* L) ทำให้เกิดอาการใบด่าง และใบหงิก ในประเทศอินเดีย สามารถถ่ายทอดเชื้อไวรัสได้ทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission) และ แมลงพาหะ (insect transmission) คือพวกเพลี้ยอ่อน 3 ชนิด ได้แก่ *A.gossypii*, *A. Craccivora* และ *M. persicae*

Redinbaugh *et al.* (2002) รายงานว่าเชื้อ maize fine streak virus ซึ่งอยู่ในกลุ่ม Rhabdovirus ทำให้ข้าวโพดเกิดอาการใบด่างเป็นขีดๆ สามารถถ่ายทอดผ่านทางแมลงพาหะคือเพลี้ยอ่อน *Rhopa losiphum padi* และ *M. persicae*

การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อไวรัสผ่านทางแมลงพาหะ (insect transmission) ของเพศชั้นฟรุ้ดพบว่า Passiflora leaf mottle virus ในประเทศเปอร์โตริโก สามารถถ่ายทอดเชื้อผ่านทางแมลงหมีขาว *Bemisia tabaci* จากต้นเพศชั้นฟรุ้ดที่เป็นโรคไปยังต้นถั่วจากการตรวจสอบด้วยวิธี Dot blot และ Southern hybridization. (Brown *et al.* 1993)

Rubies *et al.* (1996) เก็บตัวอย่างใบ *Passiflora* sp นำมาตรวจสอบหาโรคไวรัส พบว่าโรคนีมีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวาง ซึ่งส่วนใหญ่เชื้อถูกถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อนได้แก่ เชื้อไวรัสในกลุ่ม Cucumovirus, Potyvirus, Carlavirus และ Alfamovirus

Iwai *et al.* (1996) ศึกษาเพศชั้นฟรุ้ดพันธุ์ Ohdama ซึ่งมีอาการด่างแบบ systemic ที่ใบ และมีรูปร่างผิดปกติอย่างรุนแรง พบว่าสาเหตุโรคเกิดจากเชื้อ passionfruit woodiness virus สามารถถ่ายทอดโดยเพลี้ยอ่อน *M. persicae*

Chagas *et al.* (2001) รายงานว่าเชื้อไวรัสในกลุ่ม Rhabdovirus หรือ Rhabdovirus-like ได้แก่เชื้อ greenspot passiflora virus ในเพศชั้นฟรุ้ด สามารถถ่ายทอดโดยไรในวงศ์ Brevipalpus คือ *Brevipalpus phoenicis*, *B. obovatus* และ *B. californicus* ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจกับเพศชั้นฟรุ้ดในประเทศบราซิล

## 2.4 วิธีการจัดการโรคไวรัสในเพศชั้นฟรุ้ด

วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน (Integrated Pest Management) เป็นการใช่วิธีจัดการศัตรูพืชร่วมกันตั้งแต่ 2 วิธีขึ้นไป เพื่อลดการใช้สารเคมีหรือใช้ให้น้อยที่สุดในการป้องกันกำจัด

ศัตรูพืชไม่ให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจ ลดปัญหาสารพิษตกค้าง และรักษาสภาพแวดล้อม สำหรับการควบคุมโรคไวรัสโดยวิธีผสมผสาน การจัดการแมลงพาหะมีความสำคัญในการควบคุมโรคไวรัส ซึ่งนอกจากการใช้สารเคมีแล้วยังมีวิธีที่สามารถจัดการกับแมลงได้หลายวิธี

เครือพันธุ์ กิตติปกรณ์ และคณะ (2536) ใช้วิธีเขตกรรม วิธีกลและการฉีดพ่นสารเคมีทางใบป้องกันกำจัดโรคไวรัสของแตงร้าน พบว่าการใช้แผ่นพลาสติกสีเงินสะท้อนแสงคลุมแปลง ร่วมกับการฉีดพ่นสารกำจัดแมลงพาหะของเชื้อไวรัสทำให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น 39.90 เปอร์เซ็นต์ จากแปลงเปรียบเทียบ ปริมาณเพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาวลดลง 79.30 และ 69.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตราการเกิดโรคใบด่างลดลง 82.66 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณไวรัสใบด่างแตง (cucumber mosaic virus) ไวรัสจุดวงแหวนมะละกอ (papaya ringspot virus) และไวรัสใบด่างเหลืองซูกินี (zucchini yellow mosaic virus) ลดลง 100, 100 และ 86.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Takada (1995) ศึกษาการใช้วิธีการผสมผสานในการควบคุมเพลี้ยอ่อนซึ่งเป็นพาหะนำโรคไวรัส ประกอบด้วย การใช้สารเคมีโดยใช้สารขับไล่ สารลดการกินอาหาร และสารเคมีฆ่าแมลง การควบคุมทางกายภาพโดยการคลุม การใช้ตาข่าย และการควบคุมโดยชีววิธีโดยใช้แมลงเบียน และแมลงห้ำ พบว่าวิธีการใดวิธีการหนึ่งไม่สามารถควบคุมโรคไวรัสได้อย่างสมบูรณ์ ควรใช้หลายหลายวิธีร่วมกันในการควบคุม

Hernandez *et al.* (2000) ศึกษาการเกิดโรค และความรุนแรงของโรค papaya ringspot virus โดยจัดการใน 3 ระบบคือ ระบบที่ 1 เป็น Integrated management (IPM) ระบบที่ 2 เป็น Integrated management ที่ไม่มี citroline (เป็น mineral oil ที่ได้จากปิโตรเลียม) (IPM-SC) และระบบที่ 3 เป็นแปลงปลูกตามธรรมชาติ พบว่าการใช้ระบบที่ 1 และระบบที่ 2 (IPM และ IPM-SC) เกิดโรคไวรัส 85 และ 88 เปอร์เซ็นต์ แต่ในระบบที่ 3 (แปลงธรรมชาติ) พบ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับด้านผลผลิตระบบที่ 2 (IPM-SC) ให้ความสูงของต้น จำนวนผลผลิตต่อต้นสูงที่สุดคือ 33741.3 กิโลกรัม/เฮกแตร์ ระบบที่ 1 (IPM) 31330.60 กิโลกรัม/เฮกแตร์ และระบบที่ 3 (แปลงธรรมชาติ) 17055.80 กิโลกรัม/เฮกแตร์

สารเคมี imidacloprid เป็นสารกำจัดแมลงชนิดดูดซึม มีฤทธิ์ตกค้างในธรรมชาติน้อย สามารถกำจัดแมลงที่อยู่ในดิน เมล็ด และที่ใบของพืชได้ ใช้กำจัดแมลงที่มีปากแบบดูดกินคือ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ และแมลงหวี่ขาวได้ดี โดยปกตินิยมใช้ป้องกันกำจัดแมลงกับพืชประเภท ข้าว ธัญพืช ข้าวโพด มันฝรั่ง ผัก และผลไม้ ซึ่ง Ahmed *et al.* (2001) รายงานการเปรียบเทียบการใช้สารเคมี imidacloprid กับ cypermethrin ที่อัตราที่ใช้เท่ากันคือ 47.6, 71.4, 95.2 และ 119 g a.i./ha ฉีดพ่นลงดินทุกๆ 10 วัน นาน 6 สัปดาห์ หลังจากปลูกเมล็ดมะเขือเทศในการควบคุมแมลงหวี่ขาว *B. tabaci* ซึ่งเป็นแมลงพาหะในการถ่ายทอดเชื้อ tomato yellow leaf curl virus พบว่าการใช้สารเคมี imidacloprid สามารถลดเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค tomato yellow leaf curl virus ได้ดีกว่าการใช้

สารเคมี cypermethrin ในทุกอัตราที่ใช้ และการใช้สารเคมี imidacloprid สามารถป้องกันการเกิดโรคไวรัสของต้นกล้ามะเขือเทศได้นานถึง 12 สัปดาห์

ศรีสุตา โท้ทอง และปิยรัตน์ เขียนมีสุข (2541) รายงานการทดสอบประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟในกล้วยไม้หวายลูกผสม (นิววันนี่) ในแปลงเกษตรกรของพุทธมณฑลสาย 3 แขวงทวีพัฒนา จังหวัดกรุงเทพมหานคร พ่นสารทุก 4 วันด้วยเครื่องพ่นสารแบบแรงดันน้ำสูง และตรวจนับจำนวนเพลี้ยไฟ 11 ครั้งโดยการเปรียบเทียบใน 14 กรรมวิธี คือ 1) fipronil (Ascend 5 เปอร์เซ็นต์ SC) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 2) carbosulfan (Posse 20 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 50 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 3) cypermethrin + phosalone (Parzon 28.75 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 40 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 4) imidacloprid (Cofidor 10 เปอร์เซ็นต์ SL) อัตรา 10 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 5) imidacloprid (Cofidor 10 เปอร์เซ็นต์ SL) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 6) betacyfluthrin (Folitec 2.5 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 7) abamectin (Vertimec 1.8 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 10 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 8) abamectin (Jacket 1.8 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 9) acetamiprid (Molan 20 เปอร์เซ็นต์ SP) อัตรา 5 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 10) fometanate (Dicazol 25 เปอร์เซ็นต์ SP) อัตรา 30 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 11) pyriproxyfen (Admiral 10 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 12) deltamethrin (Decis 3 เปอร์เซ็นต์ EC) อัตรา 15 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร 13) 10 ppm aza Neem Sed Kernel Extract (NSKE) อัตรา 50+100 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร + 0.5 เปอร์เซ็นต์ Neem Oil (NO) และ 14) ไม่ใช้สารฆ่าแมลง พบว่าการใช้ imidacloprid อัตรา 10-20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร abamectin อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร acetamiprid อัตรา 5 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร และ fipronil อัตรา 20 มิลลิตร/น้ำ 20 ลิตร มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟได้ดีที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีชนิดอื่นๆ

การใช้น้ำมันปิโตรเลียมในการจัดการศัตรูพืช เป็นวิธีที่นำมาใช้ทดแทนการใช้สารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งในประเทศออสเตรเลีย และประเทศจีน ประสบความสำเร็จในการนำน้ำมันปิโตรเลียมเข้าสู่ระบบการจัดการศัตรูพืชโดยวิธีผสมผสาน (Integrated Pest Management) ในการจัดการแมลงศัตรูส้ม ซึ่ง รุจน์ มรกต (2541) และ วิทย์ นามเรืองศรี (2543) รายงานว่าน้ำมันปิโตรเลียม มีระดับความเป็นพิษน้อย ส่วนมากจะอุดตันรูหายใจหรือช่องผ่านของอากาศในตัวแมลง นอกจากนี้ทำให้แมลงลดการวางไข่ และการกินอาหาร วิธีนี้สามารถป้องกันกำจัด เพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยไฟ เพลี้ยแป้ง เพลี้ยไก่แจ้ส้ม แมลงหวี่ขาว และไรได้ดี สำหรับวิธีอื่นคือ การใช้กับดัก ซึ่งพบว่ากับดักกาวเหนียวสีเหลืองเป็นสีที่ดึงดูดแมลง เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว หมัดตัวด้วง และผีเสื้อบางชนิดได้ดี มีประสิทธิภาพในการประเมินความหนาแน่นของประชากรแมลง สามารถใช้เป็นตัววัดในการควบคุมแมลงเหล่านี้ได้ ซึ่งศรีสุตา โท้ทอง และปิยรัตน์ เขียนมีสุข (2543) ศึกษาสีของกับดักกาวเหนียว

ที่ใช้คักจับเปลือกไฟในสวนกล้วยไม้พบว่า สำหรับเปลือกไฟ กับคักสีเหลือง สีฟ้า สีขาว และสีน้ำเงิน คักจับเปลือกไฟได้มาก กว่ากับคักแผ่นสีใส ส่วนสีเขียว และส้ม คักจับแมลงได้น้อย พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับคักแผ่นสีใส

นอกจากนี้ยังมีการนำวิธี Cross-protection คือการปลูกเชื้อไวรัสชนิดไม่รุนแรงมาใช้ในการป้องกันโรคไวรัส ซึ่งควงใจ ชูปัญญา (2534) รายงานว่าการปลูกเชื้อไวรัสชนิดอ่อนลงในต้นกล้าแพศชั่นฟรุต สามารถป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิดรุนแรงได้ โดยการคัดเลือกเชื้อไวรัสใบค่างชนิดอ่อน (mild strain) ที่พบในธรรมชาติมาทดสอบประสิทธิภาพในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง (severe strain) ในสภาพไร่ที่จังหวัดระยองโดยเปรียบเทียบระหว่างต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control) ต้นที่ปลูกเชื้อชนิดอ่อน ต้นที่ปลูกเชื้อชนิดรุนแรง และต้นที่ปลูกเชื้อชนิดอ่อนก่อน 2 สัปดาห์ แล้วปลูกเชื้อชนิดรุนแรงลงไป พบว่าต้นที่ไม่ได้ปลูกเชื้อ (control) เป็นโรครุนแรง 86 เปอร์เซ็นต์ ต้นที่ปลูกเชื้อไวรัสชนิดอ่อน (mild strain) แสดงอาการของโรค 43 เปอร์เซ็นต์ และต้นที่ปลูกเชื้อชนิดอ่อนก่อนแล้วปลูกเชื้อชนิดรุนแรงลงไปพบว่าแสดงอาการเป็นโรค 44 เปอร์เซ็นต์

## 2.5 วิธีการวินิจฉัยเชื้อด้วยเทคนิคต่างๆ

### 2.5.1 พืชอาศัย (Host range)

ข้อมูลของชนิดพืชทดสอบที่ถูกเชื้อเข้าทำลาย รวมทั้งอาการของโรคที่ปรากฏมีความสำคัญมากทั้งสำหรับเชื้อไวรัสที่มีการศึกษาแล้ว และเชื้อไวรัสที่ยังไม่มีการศึกษามาก่อน ซึ่งใช้เป็นข้อมูลสำคัญในการวินิจฉัยเชื้อ แต่อย่างไรก็ดีข้อมูลชนิดของพืชอาศัยที่นำมาทดสอบที่พืชแสดงอาการออกมา ไม่สามารถใช้เป็นข้อมูลเดียวในการสรุปชนิดของเชื้อไวรัสได้ นอกจากนี้ชนิดของพืชทดสอบ ยังมีประโยชน์ในการคัดเลือกพืชที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณของเชื้อไวรัส (นวลพรรณ งามยี่สุ่น. 2539)

### 2.5.2 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscopy)

การใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถตรวจสอบตัวอย่างที่ได้จากการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เพื่อศึกษารายละเอียดของอนุภาคหรือการตรวจสอบนำคั้นจากพืชที่เป็นโรคได้ในเวลาที่รวดเร็ว ซึ่งการเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบที่นิยมใช้คือวิธี quick leaf dip โดยการใช้หยดของน้ำคั้นจากใบพืชที่เป็นโรคหรือวิธี epidermis strip โดยการลอก epidermis ของใบพืชที่เป็นโรคมาวางบนหยด stain ที่ใช้ (Hictchborn and Hill. 1965) สำหรับเทคนิคที่ใช้ในระยะแรกคือ เทคนิค metal shadowing ซึ่งใช้ดูรูปร่าง และขนาดของอนุภาคเชื้อไวรัสแต่จะไม่เห็นรายละเอียดต่างๆ ภายในอนุภาค วิธีนี้ใช้กับตัวอย่างที่ได้จากการแยกเชื้อไวรัสให้บริสุทธิ์ที่สะอาดมากๆ แทบไม่มีสิ่งเจือปน โดยการสเปรย์ตัวอย่างลงบนกริด (copper grid ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร และ

เคลือบด้วย formvar หรือ collodion) เมื่อตัวอย่างแห้งก็พ่นด้วยไอโลหะหนักคือ ทอง platinum หรือ uranium ภายใต้ระบบสุญญากาศ ทำให้ไอโลหะหนักมาเคลือบอยู่บนตัวอย่าง ทำให้เกิดเงาที่ตัวอย่าง ได้ภาพตัวอย่างเป็น 3 มิติ เมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนอนุภาคของตัวอย่างจะเป็นสีขาวเมื่อบันทึกลงบนฟิล์มจะเป็นสีดำและ ต่อมาพัฒนาใช้เทคนิค negative contrast staining ซึ่งปัจจุบันเป็นวิธีที่นิยมใช้กันแพร่หลาย โดยการเตรียมตัวอย่างค่อนข้างง่ายและรวดเร็ว สามารถตรวจสอบจากตัวอย่างน้ำคั้นของพืชที่เป็นโรคได้โดยไม่ต้องเป็นตัวอย่างที่บริสุทธิ์ การย้อมสีแบบ negative staining สีจะจับรอบๆ อนุภาค ทำให้ได้ภาพของอนุภาคที่เป็นสีขาวรอบๆ ซึ่งสีที่ใช้ย้อมเป็นพวกโลหะหนักคือ sodium phosphotungstate 2 เฟอร์เซนต์ uranyl acetate หรือ ammonium molybdate ที่อิเล็กตรอนผ่านไม่ได้หรือผ่านได้ยาก (นวลพรรณ งามยี่สุน. 2539)

### 2.5.3 การตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อ (dsRNA detection)

การนำเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิกแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction) มาใช้ในการตรวจสอบ และวินิจฉัยเชื้อไวรัส ซึ่งส่วนใหญ่ไวรัสมีหน่วยพันธุกรรมเป็น RNA การเข้าทำลายของเชื้อไวรัสจะมีช่วงการทวีจำนวนของเชื้อ (multiplication) จะมีการเกิด double stranded RNA (dsRNA) จึงทำการแยกสกัด RNA ออกมา ซึ่งวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจสอบเชื้อไวรัสกันอย่างแพร่หลาย และมีการดัดแปลงนำมาใช้ประโยชน์ในการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสหลายชนิด

Rezaian *et al.* (1991) รายงานการตรวจ dsRNA ของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดใบม้วนงอในต้นองุ่น หลายพันธุ์ที่นิยมใช้ผลิตไวน์ โดยการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อ และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี CF11 cellulose chromatography แล้วตรวจสอบ dsRNA ด้วย gel electrophoresis พบว่าขนาดของ dsRNA มีความแตกต่างกัน ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามของพันธุ์ขององุ่น และพบว่าเชื้อไวรัสมีความเข้มข้นสูงในเนื้อเยื่อส่วนลำต้นมากกว่าในใบของต้นองุ่น นอกจากนี้ นวลพรรณ งามยี่สุน และกิริติกุล ชีกร้าง (2546) รายงานว่าการแยกสกัด dsRNA ของเชื้อจากใบมะลิที่แสดงอาการเป็นโรคจากสภาพธรรมชาติ และมะลิที่แสดงอาการใบค่างจากการถ่ายทอดเชื้อโดย *Myzus persicae* โดยใช้ Rneasy Plant Mini Kit (QIAGEN) โดยมี บริษัท ซีระเทคคิง เป็นตัวแทนจำหน่าย พบว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อ cucumber mosaic virus

### 2.5.4 การตรวจสอบโดยเทคนิค Reverse Transcriptase polymerase chain reaction

#### (RT-PCR)

ปัจจุบันเทคนิค PCR หรือ Polymerase Chain Reaction ได้ถูกพัฒนาและนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคติดเชื้อไวรัสต่างๆ โดยประกอบด้วย 3 ขั้นตอนคือ

## 1. การแยกสกัด DNA หรือ RNA (nucleic acid extraction)

เป็นการแยกสกัดเอาสารพันธุกรรมออกจากสิ่งส่งตรวจ ก่อนที่จะนำสารพันธุกรรมที่ได้ไปทำการเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิคต่างๆทางด้านชีวโมเลกุล

## 2. การทำปฏิกิริยาอุณหภูมิเมอเรส (Thermal Cycling)

หลักการทั่วไปของเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) เป็นเทคนิคการเพิ่มขยายปริมาณชิ้นส่วนของ DNA ในหลอดทดลอง การเพิ่มขยายปริมาณ DNA จำเป็นต้องอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้คือ DNA แม่พิมพ์ (template DNA) thermostable, DNA polymerase, deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs), oligonucleotide primers และ Buffer ที่เหมาะสม

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์จะเกิดต่อเนื่องซ้ำกันเป็นวงจรลูกโซ่ ในแต่ละรอบ (Cycle) ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

### ขั้นตอนที่1. Denaturation

เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 90 - 95 องศาเซลเซียส ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำหรือสั้นเกินไป จะทำให้การแยกสายแม่พิมพ์ไม่สมบูรณ์ เป็นผลให้ประสิทธิภาพการทำ PCR ลดลง โดยทั่วไปการ denature ที่ 94 - 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที ก็เพียงพอสำหรับการแยกสายแม่พิมพ์อย่างสมบูรณ์ แต่ในทางปฏิบัติจริงๆ เวลาที่ใช้อาจปรับเปลี่ยนตามความเหมาะสม ขึ้นกับลักษณะความซับซ้อน (complexity) ของแม่พิมพ์ ลักษณะ และขนาดของหลอด PCR ปริมาตรของปฏิกิริยา PCR ชนิดของเครื่อง thermocycler ที่ใช้ในกรณีแม่พิมพ์ที่มี GC content สูงอาจต้องใช้เวลา denature นานขึ้น หรือใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้น การเติม glycerol ลงไปเพื่อกันการระเหยของน้ำ พยายามหลีกเลี่ยงการใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปหรือนานเกินไป เนื่องจากจะทำให้ activity ของ polymerase ลดลง

### ขั้นตอนที่2. Annealing

เป็นขั้นตอนลดอุณหภูมิลงมาที่ 50 - 55 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์สายเดี่ยวตรงบริเวณลำดับนิวคลีโอไทด์คู่สม ขั้นตอนนี้มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อประสิทธิภาพ และความจำเพาะในการทำ PCR โดยทั่วไปสามารถทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยการหาค่า  $T_m$  ของ Primer โดยการใช้ software หรือสูตรคำนวณ ได้ดังนี้  $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)$  ซึ่งจะได้ค่า  $T_m$  อย่างหยาบๆ จากนั้นเปรียบเทียบกับการทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่างกันประมาณ 2 องศาเซลเซียส หลากๆอุณหภูมิ โดยใช้ค่า  $T_m - 5$  องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิหลัก การใช้อุณหภูมิต่ำเกินไปทำให้การ annealing อย่างไม่จำเพาะเกิดขึ้นอย่างมากมาย แต่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไป การ annealing จะเกิดขึ้นน้อยหรือไม่มีเลย

### ขั้นตอนที่3. Primer extension

เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่ต่อออกจาก Primer ในทิศทาง 5' ไป 3' อุณหภูมิขั้นนี้จะอยู่ในช่วง 70 - 75 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาที่ใช้ขึ้นกับความยาว และความเข้มข้น

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

### 3. การแยกผลผลิตดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้าและการบันทึกผล (Detection)

หลังจากปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์เสร็จสมบูรณ์แล้ว นำผลผลิตที่ได้ คือ ดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากมีจำนวนซ้ำของลำดับเบสแกนไม่เท่ากัน มาแยกโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยใช้ตัวกลางชนิดอะกาโรส (agarose gel) ที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 180 โวลต์ โดยใช้เวลาประมาณ 30 - 40 นาที ดีเอ็นเอซึ่งมีประจุเป็นลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่ เมื่อดีเอ็นเอแยกโดยสมบูรณ์ แล้วจึงนำ agarose gel มาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) และนำไปตรวจสอบผลภายใต้กล้องแสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อดูลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นซึ่ง Faten *et al.* (1999) รายงานการจำแนกเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus คือ potato virus Y และ pepper veinal mottle virus ของ pepper (*Capsicum annum* L.) ในประเทศอินเดีย ในช่วงปี 1995 - 1997 โดยการใช่วิธี RT-PCR พบว่ามีการแพร่กระจายของเชื้อกลุ่ม potyvirus สูง ซึ่งเชื้อ potato virus Y พบว่ามีรายงานการแพร่ระบาดมานานแล้ว แต่สำหรับเชื้อ pepper veinal mottle virus เป็นการสำรวจพบเป็นครั้งแรกในประเทศอินเดีย

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

Marinho *et al.* (2003) ใช้เทคนิค RT-PCR ในการตรวจสอบเชื้อ apple stem grooving virus (ASPV) ในเนื้อเยื่อทุกส่วนของต้นแอปเปิ้ล โดยใช้ primer ASGV4F (5'- GTTCACTGAGGCA AAAGCTGTC - 3') - ASGV4R (5' - CTCCGTACCTCTTCCACAGGAC - 3') ซึ่งจำเพาะต่อเชื้อ ASPV ในการ replicase gene ด้วยระบบ Titan RT-PCR โดยนำน้ำคั้นของใบหรือเปลือกของต้นแอปเปิ้ลมาเป็น first strand จากนั้นตรวจสอบการเกิดสีหลังจากการทำ PCR ด้วย sandwich hybridisation 2 ชนิด คือ biotin-labelled capture probe และ digoxigenin (DIG) - labelled detection probe ซึ่งพบว่าการใช้ primer ASGV4F - ASGV4R สามารถตรวจพบเชื้อ ASPV ได้แม้มีปริมาณตัวอย่างในปริมาณเล็กน้อย

Mirosława (2004) รายงานการใช้เทคนิค RT-PCR ตรวจสอบการเข้าทำลายของเชื้อ strawberry mottle virus ในพืช *Fragaria virginiana* UC-11 ซึ่งเป็นพืชที่มี polysaccharides และ phenolic compound มาก ทดลองเปรียบเทียบการสกัด RNA ของเชื้อไวรัสใน 2 วิธีคือ วิธี lithium

method (ทำการบดตัวอย่างใน lithium chloride buffer) และวิธี silica capture method ตรวจสอบ RNA 1 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 5 dilutions คือ 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 และ 1:800 พบว่าวิธี lithium method ดีกว่าวิธี silica capture method เพราะว่าจากการตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis แล้วย้อมสีด้วย ethidium bromide วิธี lithium method สามารถเห็น band RNA ที่ความเข้มข้น 1:50, 1:100, 1:200 และ 1:400 แต่สำหรับวิธี silica capture method ไม่สามารถเห็น band RNA ที่ความเข้มข้นทั้ง 5 เลย

Cigdem and Filiz (2005) รายงานการสำรวจโรค apple chlorotic leaf spot ในประเทศตุรกี จำนวน 369 ตัวอย่างจากพืชพวก stone fruit คือ cherry peach nectarine apricot และ plum โดยนำตัวอย่างที่มีอาการที่น่าจะเกิดจากเชื้อ ACLSV มาตรวจด้วยเทคนิค DAS-ELISA และ RT-PCR พบว่าการใช้ ELISA พบ 13 ตัวอย่างมีเชื้อ ACLSV ในขณะที่การใช้ PCR พบ 51 ตัวอย่างที่ให้ผลเป็นบวก พืชพวก apricot พบเชื้อมากที่สุดรองลงมาคือ peach cherry และ plum

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

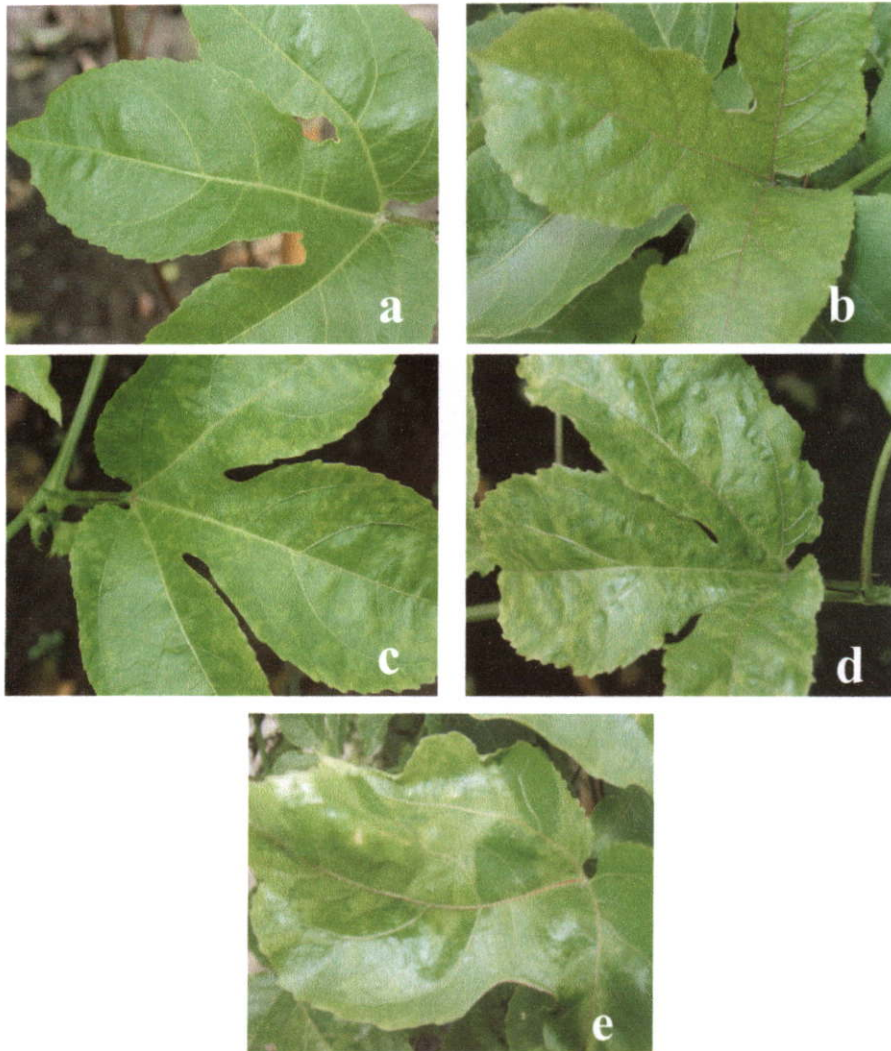
#### 3.1 การสำรวจโรคไวรัสในแปลงปลูกแพศชันฟรุ้ต และการถ่ายทอดเชื้อ

##### 3.1.1 สำรวจลักษณะอาการโรคไวรัส และประเมินระดับความรุนแรงของโรคไวรัสใน แพศชันฟรุ้ต

สุ่มสำรวจพื้นที่แปลงปลูกแพศชันฟรุ้ตของเกษตรกรในอำเภอปะทิวจังหวัดชุมพร จำนวน 15 แปลง สำรวจ และบันทึกอาการของโรคไวรัสทั้งหมด และประเมินระดับความรุนแรงของโรค โดยการสุ่มอย่างมีระบบแปลงละ 1 ไร่ ไร่ละ 50 ต้น (โดยการกำหนดให้หมายเลขลำดับแต่ละต้น ก่อน ซึ่งปกติ 1 ไร่ มีต้นแพศชันฟรุ้ตประมาณ 200 ต้น คือ ลำดับเลข 1- 200 ต้องการกลุ่มตัวอย่าง 50 ต้น ( $200 \div 50 = 4$ ) ต้องสุ่มหมายเลข 1 – 4 ออกมาก่อนหนึ่งหมายเลข เพราะต้องสุ่มหาต้นแรก ในการเริ่มต้น เมื่อสุ่มได้แล้วกำหนดต้นที่สุ่มได้เป็นต้นที่ 1 จากนั้นนับต่อไปอีกทีละ 4 ต้น จนได้กลุ่มตัวอย่างครบ 50 ต้น) ซึ่งกำหนดระดับความรุนแรงของโรคโดยรวมในแต่ละต้น แล้วนำไปวิเคราะห์ค่าในทางสถิติ ซึ่งแบ่งระดับความรุนแรงของโรคเป็น 5 ระดับ คือระดับ 0 ถึง ระดับ 4 ดังแสดงในภาพที่ 3.1 ซึ่งดัดแปลงมาจาก Moshe *et al.* (2001)

##### 3.1.2 การถ่ายทอดเชื้อและ เพิ่มจำนวนเชื้อไวรัส

เก็บใบอ่อนของแพศชันฟรุ้ตที่แสดงอาการของโรคไวรัส จากแปลงปลูกของเกษตรกร มาทำการถ่ายทอด และเก็บรักษาเชื้อ เพื่อศึกษาต่อในสภาพโรงเรือนทดลองโดยถ่ายทอดเชื้อด้วยน้ำคั้น (mechanical sap transmission) ลงในต้นกล้าแพศชันฟรุ้ตที่มีอายุประมาณ 1 เดือน โดยก่อนปลูกเชื้อต้องคลุมต้นกล้าด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้พืชมีสภาพอ่อนแอเหมาะสมต่อการเข้าทำลายของเชื้อ นำใบอ่อนที่แสดงอาการของโรคไวรัสที่ชัดเจน และคาดว่ามีความเข้มข้นของเชื้อสูง บดให้ละเอียดด้วยสารละลาย Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 M pH 7.2 ในโกร่งที่แช่เย็น อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อ buffer 2 มิลลิลิตร และใส่ผง celite ลงไปด้วยเพื่อทำให้พืชเกิดบาดแผล เชื้อไวรัสสามารถผ่านเข้าไปในพืชได้ง่าย ใช้นิ้วมือที่สะอาดจุ่มทาน้ำคั้นเบาเบาไปยังใบอ่อนของต้นกล้าแพศชันฟรุ้ต ทำสัญลักษณ์ลงบนใบที่ทาน้ำคั้น เพื่อให้ทราบว่าเป็นใบที่ปลูกเชื้อ หลังจากนั้นพรมน้ำเล็กน้อยลงบนใบพืชเพื่อล้างเศษพืชที่อาจเป็นพิษออกจากใบพืชแล้วคลุมพืชทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงจึงเอาวัสดุคลุมออก แยกต้นพืชที่ปลูกเชื้อไปไว้ในโรงเรือนทดลองกันแมลง รดน้ำทุกวัน สังเกตอาการ และบันทึกผล



**ภาพที่ 3.1** การกำหนดระดับความรุนแรงของโรคซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 0 คือพืชปกติที่ไม่แสดงอาการของโรคหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 0 เปอร์เซ็นต์ (a); ระดับ 1 คือ ใบอ่อนแสดงเฉพาะอาการต่างเล็กน้อยหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 1 - 25 เปอร์เซ็นต์ (b); ระดับ 2 คือ ใบอ่อน แสดงอาการต่าง และหงิกเล็กน้อยหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 26-50 เปอร์เซ็นต์ (c); ระดับ 3 คือ ใบอ่อนแสดงอาการต่าง และหงิกเพิ่มมากขึ้น แต่ใบอ่อนยังมีการเจริญเติบโตหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 51-75 เปอร์เซ็นต์ (d); และระดับ 4 คือ ใบอ่อนแสดงอาการต่าง และหงิกรุนแรง ใบอ่อนหยุดชะงักการเจริญเติบโตหรือพื้นที่ใบเป็นโรค 76-100 เปอร์เซ็นต์ (e)

### 3.2 การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชชั้นฟรุต

#### 3.2.1 การทดสอบศึกษาพืชอาศัย (host range) ชนิดต่างๆ ของเชื้อไวรัสโดยการถ่ายทอดทางน้ำคั้น (mechanical sap transmission)

ทดสอบพืชอาศัยชนิดต่างๆ ในวงศ์ Leguminosae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae และ Passifloraceae ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยนำเมล็ด 3 - 4 เมล็ด ปลูกในกระถางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุดินลงไป 3 ใน 4 ส่วนของกระถาง เขียนชื่อของพืชแต่ละชนิดติดลงบนกระถาง ดูแลรดน้ำจนพืชงอกงามถึงระยะเวลาที่เหมาะสมในการปลูกเชื้อ จากนั้นนำมาคลุมด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้พืชอ่อนแอ ง่ายต่อการเข้าทำลายของเชื้อ เมื่อครบระยะเวลานำกระดาษหนังสือพิมพ์ที่คลุมออก และทำการปลูกเชื้อไวรัสด้วยน้ำคั้น (mechanical sap transmission) โดยนำใบแพสชันฟรุตที่แสดงอาการของโรคมารดให้ละเอียดในโกร่งเซย์น ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วกับสารละลาย potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 M pH 7.2 อัตราส่วนใบพืช 1 กรัมต่อ buffer 2 มิลลิลิตร ใส่ผง celite ใช้มือจุ่มน้ำคั้นแล้วนำไปทาลงบนใบพืชทดสอบเพื่อเป็นตัวแทนทำให้เกิดแผลบนใบพืช หลังจากนั้นพรมน้ำเล็กน้อยลงบนใบพืชเพื่อล้างเศษพืชออก ดินป้ายบนที่วันที และชนิดของพืชที่ปลูกเชื้อ แล้วคลุมพืชด้วยกระดาษหนังสือพิมพ์ที่ชุ่มน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเอาวัสดุคลุมออก เก็บพืชที่ปลูกเชื้อแล้วในกรงกันแมลง รดน้ำทุกวัน สังเกต และบันทึกลักษณะอาการที่เกิดขึ้นหลังการปลูกเชื้อ 7 - 30 วัน เปรียบเทียบลักษณะอาการที่พบกับต้นเปรียบเทียบ (control) ชนิดละ 5 ต้น

ตารางที่ 3.1 วงศ์ ชื่อวิทยาศาสตร์ ชื่อสามัญ และอายุของพืชที่ใช้ในการทดสอบการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสโดยการถ่ายทอดเชื้อไวรัสด้วยน้ำคั้น (mechanical sap transmission)

วงศ์	ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ	อายุที่ใช้ทดลอง(วัน)
Chenopodiaceae	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	Goosefoot	45
Leguminosae	<i>Phaseolus aureus</i> Roxb	ถั่วเขียว	5-7
	<i>Vigna sesquipedalis</i> Wight	ถั่วฝักยาว	5-7
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L	แตงกวา	5-7
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i>	บานไม่รู้โรย	28-35
Passifloraceae	<i>Passiflora edulis</i> Sims	แพสชันฟรุต	35-40
	<i>Passiflora foetida</i> L	กระทกรกป่า	35-40

### 3.2.2 การวินิจฉัยเชื้อไวรัสโดยการตรวจสอบกรดนิวคลีอิก

การนำเทคนิคการแยกสกัดกรดนิวคลีอิกแบบ RNA สายคู่ (dsRNA extraction) มาใช้ในการตรวจสอบ และวินิจฉัยเชื้อไวรัส ซึ่งส่วนใหญ่ไวรัสมีหน่วยพันธุกรรมเป็น RNA ซึ่งการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสจะมีช่วงการทวีจำนวนของเชื้อ (multiplication) มีการเกิด double stranded RNA (dsRNA) จึงทำการแยกสกัด total RNA ออกมา ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้ 2 วิธีในการแยกสกัดเพราะว่าชุดสกัดที่ใช้ในตอนแรกบริษัทที่นำเข้าไม่มีการนำเข้ามาขายอีก คือ การใช้ชุด Ultra Clean™ Plant RNA Isolation Kit ของบริษัท MO BIO Laboratories, Inc ประเทศสหรัฐอเมริกา และการใช้ Plant concert solution ของบริษัท Invitrogen

#### 3.2.2.1 การแยกสกัดกรดนิวคลีอิกของเชื้อไวรัส

แยกสกัดจากใบพืชที่เป็นโรค โดยใช้ชุดสกัด Ultra Clean™ Plant RNA Isolation Kit. ของบริษัท MO BIO Laboratories, Inc. ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ดังภาพที่ 3.2 โดยมีขั้นตอนการแยกสกัดดังต่อไปนี้

1. บดใบพืชที่แสดงอาการของเชื้อไวรัสชัดเจนน้ำหนักประมาณ 0.1 กรัม ด้วย โนโตรเจนเหลว เติมสารละลาย PMR1 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที
2. ใส่น้ำที่เย็นลงในหลอดที่บรรจุ 600 ไมโครลิตร เติมสารละลาย PMR2 500 ไมโครลิตร และเติม สารละลาย PMR 3 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดไปมา แช่ในน้ำแข็งนาน 5 นาที ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. ใส่น้ำที่เย็นลงในหลอดที่บรรจุ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลาย PMR4 800 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. ใส่น้ำที่เย็นลงในหลอดที่มี spin filter ให้ได้ปริมาตร 650 ไมโครลิตร แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ที่น้ำใสเก็บตะกอน
5. เติมสารละลาย PMR5 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที หลังจากนั้นเทน้ำใสทิ้ง นำหลอดที่มี spin filter ไป หมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สารละลายที่ยังค้างอยู่บน filter ไหลผ่านลงมาจนหมด
6. นำ spin filter จากข้อ 5. มาใส่ในหลอดใหม่เติมสารละลาย PMR6 ปริมาตร 30 - 50 ไมโครลิตร ก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 30 วินาที เพื่อละลายตะกอน RNA ที่ได้จากการสกัดทั้งหมด (total RNA) เก็บ RNA ที่ได้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

การแยกสกัดโดยใช้น้ำยา Plant concert solution ของบริษัท Invitrogen ซึ่งประกอบด้วยอุปกรณ์ดังภาพที่ 3.3 โดยมีขั้นตอนในการสกัดดังต่อไปนี้

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. ใส่น้ำใส่ในหลอดใหม่ เติมสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 5 M ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรและเติม Chloroform ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. ใส่น้ำใส่ส่วนบนใส่ในหลอดใหม่ ก่อนเติม Isopropyl alcohol เท่ากับปริมาณน้ำใส่ที่ได้ หลังจากนั้น นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

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

5. ทิ้งน้ำใส่แล้วนำหลอดผึ่งให้แห้ง (air-dry) ตะกอนที่ได้คือ RNA รวม (total RNA) ก่อนเติม RNase free water ปริมาตร 10 - 30 ไมโครลิตรเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

### 3.2.2.2 จำแนกชนิดของเชื้อไวรัส โดยการตรวจสอบ ds RNA ของเชื้อไวรัส (Double stranded RNA detection)

การตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อไวรัสที่ทำการแยกสกัด ในข้อ 3.2.2.1 โดยนำ total RNA ใน RNase free water ที่ได้ไปทำการแยกด้วยวิธี gel electrophoresis โดยใช้ agarose gel ที่มีความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวกลาง electrophoresis buffer ที่ใช้คือ Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (TAE) buffer ซึ่ง TAE buffer (50 X) ซึ่งประกอบด้วย (Tris 242 กรัม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร และ EDTA 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5M pH 8.0) อุปกรณ์การเตรียม gel electrophoresis ดังแสดงในภาพที่ 3.4

#### ขั้นตอนการเตรียม agarose gel

เตรียม TAE buffer (10x) จาก TAE buffer (50 X) โดยใช้ TAE buffer (50 X) 50 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำ 50 มิลลิลิตร มาละลาย agarose gel ซึ่งมีน้ำหนัก 0.4 กรัม ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเตาไมโครเวฟ ไม่ควรให้เดือดเพราะจะเกิดการ

ระเหยทำให้ปริมาตรเปลี่ยนแปลงไป หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้อุ่นพอคี่ที่สามารถจับด้วยมือเปล่าได้จึงนำไปเทใน gel chamber ก่อนเท gel ลงใน gel chamber ใส่หวี (comb) โดยให้ปลายซี่หวีอยู่สูงจากรูฐานประมาณ 2 มิลลิเมตร แล้วเท agarose gel ที่อุ่นลงไป ทิ้งไว้ 15-20 นาที จนแข็งตัวจึงค่อยๆ คึงหวีออก เท buffer ที่เหลืออีก 450 มิลลิตร ลงไปให้ท่วม gel สูงประมาณ 1 - 3 มิลลิตร ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยหยุดตัวอย่างของ total RNA ที่สกัดได้จากใบพืชเป็นโรคทำโดยการผสม total RNA ปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับ gel loading buffer (Blue juice 10X จากบริษัท Invitrogen) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน ก่อนหยอดลงในแต่ละหลุมของ agarose gel สำหรับตัวเปรียบเทียบมาตรฐานคือ Lambda DNA ที่ถูกย่อยด้วย enzyme Hind III เมื่อให้กระแสไฟฟ้าครบ 2 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบ และวิเคราะห์ผล โดยนำ gel มาย้อมสีด้วยสารละลาย ethidium bromide ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิตร เป็น เวลา 5 นาที เพื่อดูลักษณะการเคลื่อนที่ของ dsRNA โดยใช้กล้องแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 260 – 302 นาโนเมตร จากลักษณะการเคลื่อนที่ของ band dsRNA ที่ตรวจสอบได้นั้น สามารถนำมาเปรียบเทียบกับ การเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐานที่ใช้ แล้วคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างที่ต้องการ โดยเปรียบเทียบกับ linear curve การยืนยันผลว่า band ที่ได้เป็น dsRNA ทำโดยนำ gel ที่ได้มาแช่ในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.15 M ที่มี enzyme RNase เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที แล้วนำมาตรวจสอบบนกล้องแสง ultraviolet อีกครั้ง ซึ่งแถบ band ของ dsRNA จะยังคงอยู่ไม่ถูกย่อยสลาย

วิธีการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดย linear curve ดังแสดงในภาพที่ 3.5

1. การหาสมการ linear ของตัวมาตรฐานหรือตัวเปรียบเทียบจากการเคลื่อนที่ใน gel electrophoresis

1.1 วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐาน (marker) แต่ละ band จากจุดกึ่งกลางหลุม gel electrophoresis ไปยังแต่ละ band ของ Lane marker

1.2 จากนั้นหาค่า log ของ น้ำหนักโมเลกุลตัวมาตรฐาน (marker เป็นตัวที่รู้น้ำหนักโมเลกุลของแต่ละ band แล้ว)

1.3 แล้วนำค่าที่ได้คือ ค่าระยะทางการเคลื่อนที่ของแต่ละ band กับ ค่า log น้ำหนักโมเลกุลมาสร้างแผนภูมิใน โปรแกรม Microsoft Excel

1.4 จากนั้นนำมาคำนวณหา สมการเชิงเส้นและ ค่า R- squared ให้เลือกที่ option เส้นแนวโน้มใน โปรแกรม

2. วัดระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวอย่างที่เราต้องการทราบแต่ละ Lane ทุก band ที่สังเกตเห็น โดยวัดระยะทางจากจุดกึ่งกลางหลุม gel electrophoresis ในแต่ละ Lane ไปยังแต่ละ band ของแต่ละตัวอย่าง

2.1 นำค่าระยะทางที่วัดได้มาแทนค่าเป็นค่า  $X$  ในสมการเชิงเส้นที่ได้จากการไปสร้างแผนภูมิ ก็จะคำนวณได้เป็นค่า  $\log$  น้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างแต่ละ band

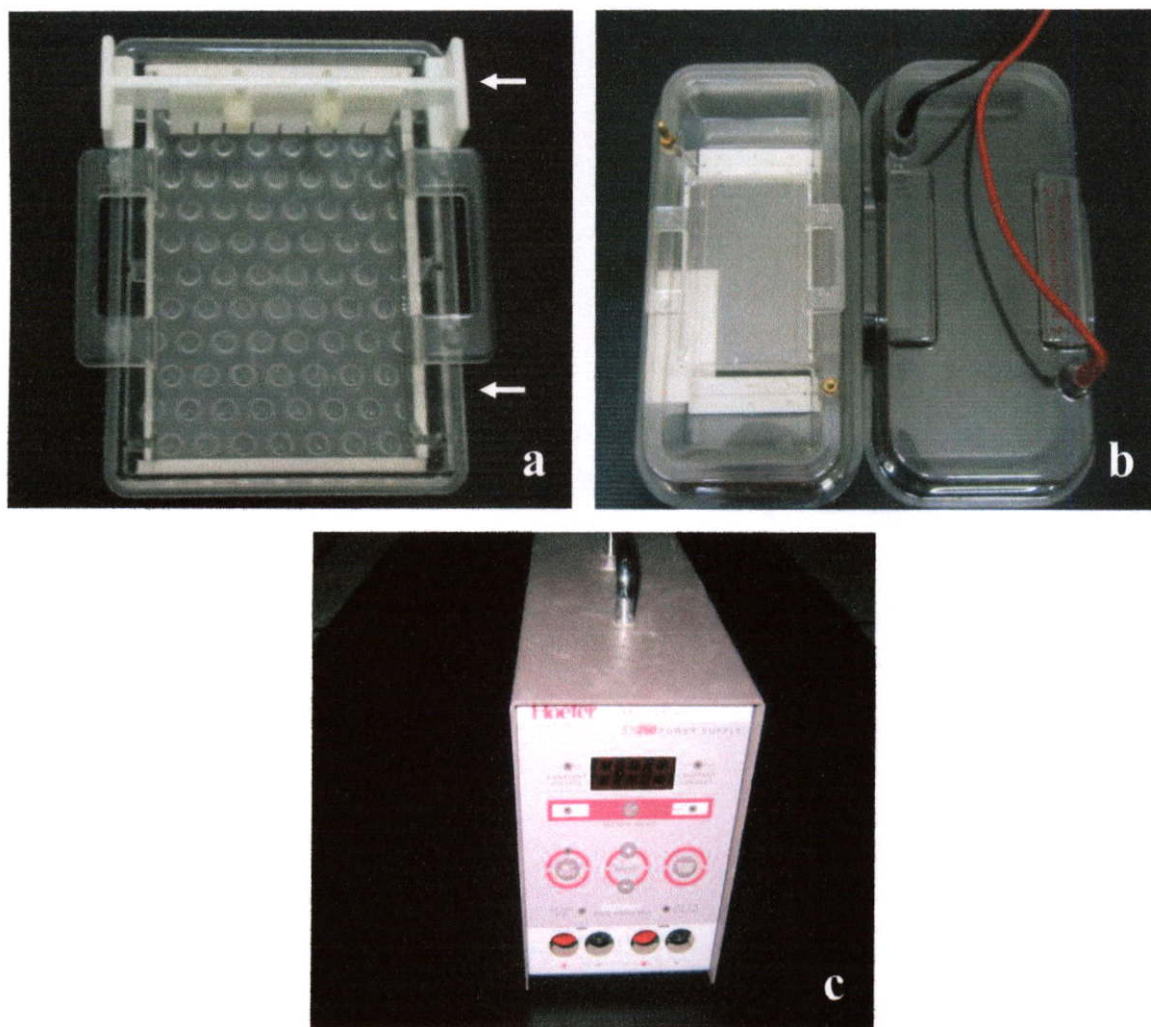
2.2 ถอดค่า  $\log$  น้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างแต่ละ band ออกก็จะได้น้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างแต่ละ band (การถอดค่า  $\log$  คำนวณ โดยใช้ 10 ไปยกกำลังค่าของตัวอย่างที่ได้)



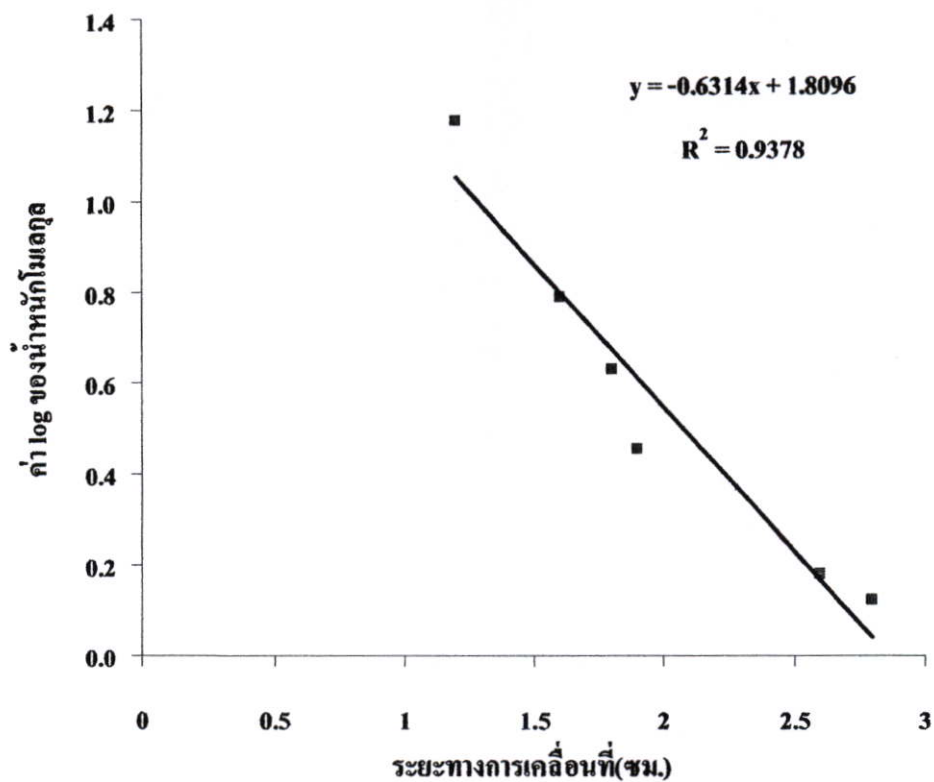
ภาพที่ 2 แสดงชุดสกัด Ultra Clean™ Plant RNA Isolation Kit. ประกอบด้วย Solution PMR1 (a); PMR2 (b); PMR3 (c); PMR4 (d); PMR5 (e); PMR6 (f); microtube (g); และ microtube (h); ที่มี spin filter (หลอดสีฟ้า)



ภาพที่ 3 แสดงชุดสกัดโดยใช้น้ำยา Plant concert solution ประกอบด้วย chloroform (a); ethanol absolute (b); 2 – propanol (c); distilled water (DNase RNase Free) (d); และ plant RNA purification solution (e)



ภาพที่ 4 แสดงอุปกรณ์การเตรียม gel electrophoresis ประกอบด้วย การเตรียม agarose gel ซึ่งประกอบด้วย หวี (comb) (a); และ gel chamber (ตามลูกศรชี้) ชุดสำหรับการ run gelelectrophoresis (b); เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 50 โวลต์ (c)



ภาพที่ 3.5 สมการเชิงเส้น และค่า R-squared จากการคำนวณโดยใช้ระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวมาตรฐาน และ ค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลในโปรแกรม Microsoft Excel

### 3.2.3 การตรวจสอบเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus โดยการใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

#### 1. การทำ temperature gradient PCR ที่เหมาะสม

ศึกษา temperature gradient PCR ในช่วงอุณหภูมิ 45 - 65 องศาเซลเซียส จำนวน 5 อุณหภูมิ คือที่ 45, 51.5, 56.2, 60.9 และ 65 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเพิ่มทวีจำนวนของชิ้น DNA

#### 2. การเตรียม Primer mix (one - step ) ของบริษัท

ประกอบด้วย 2 x buffer 12.5  $\mu$ l primer pot1 (5' - 3') ATTBTCDATRCACCA 0.5  $\mu$ l primer pot2 (5' - 3') TGYGAYGCBGATGGYTC 0.5 ไมโครลิตร น้ำ 0.5 ไมโครลิตร Template 10 ไมโครลิตร และ Superscript III RT 1 ไมโครลิตร แบ่ง Master mix ใส่หลอด microtube ผสม RNA template ตัวอย่างอาการไวรัสของพืชชั้นฟรุ้ดแต่ละชนิดลงในหลอด microtube ที่เตรียม Master mix เรียบร้อย เตรียมเข้าเครื่อง PCR ต่อไป

#### 3. การเตรียม cDNA โดยการใช้ Superscript™ III First - Strand Synthesis System for RT - PCR

การเตรียม primer mix โดยผสม Template RNA 5 ไมโครลิตร Reverse primer ความเข้มข้น 5 M 1 ไมโครลิตร 10 mM dNTP mix 1 ไมโครลิตร และ DEPC - treated water 3 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดย briefly centrifuge บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หลังจากนั้น แช่น้ำแข็งอย่างน้อย 1 นาที

การเตรียม cDNA Synthesis MIX โดยการผสม 10x RT Buffer 2 ไมโครลิตร 25 mM MgCl<sub>2</sub> 4 ไมโครลิตร 0.1 M DTT 2 ไมโครลิตร Rnase OUT™ 1 ไมโครลิตร และ SuperScript III RT 1 ไมโครลิตร โดยการใส่เรียงตามลำดับ ผสม primer mix กับ cDNA Synthesis mix โดยใช้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เท่ากันผสมโดยการ briefly centrifuge บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 50 นาที และที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นแช่น้ำแข็งเติม Rnase H 1 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส

#### 4. การเตรียม Platinum PCR supermix

โดยใช้ PCR mix 22 ไมโครลิตร primer pot1(5' - 3') ATTBTCDATRCACCA 0.5 ไมโครลิตร primer pot2 (5' - 3') TGYGAYGCBGATGGYTC 0.5 ไมโครลิตร และ Template DNA 5 ไมโครลิตร แบ่งใส่หลอด microtube แต่ละหลอดเตรียมเข้าเครื่อง PCR ใส่หลอดไมโคร ทิวปลงในเครื่อง Programmable DNA Thermal Cycle ตามเงื่อนไขดังนี้

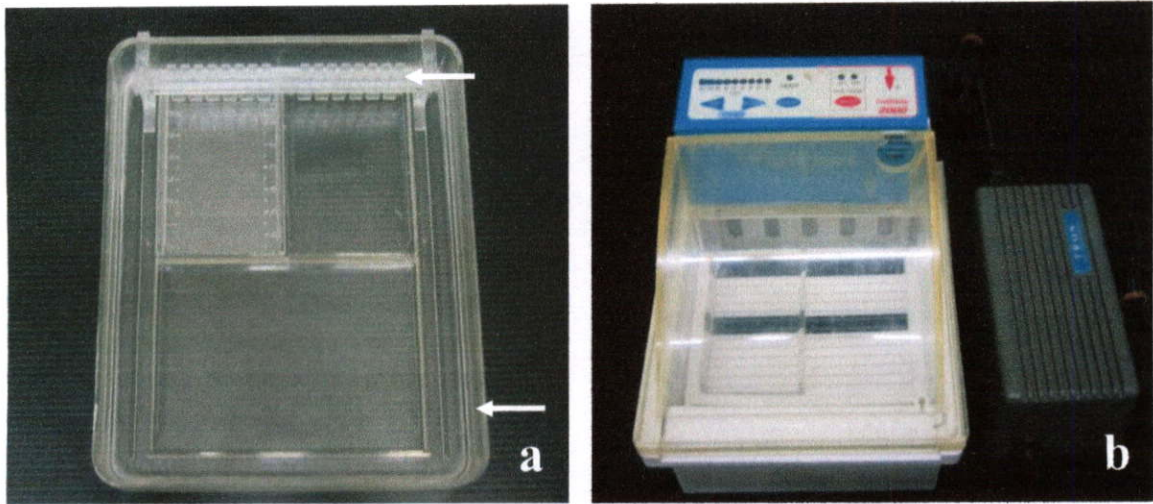
## โปรแกรม PCR ของ เชื้อกลุ่ม potyvirus

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

### 3.2.4 การใช้กระแสไฟฟ้า (gel eletrophoresis) ในการแยก RT-PCR product ของเชื้อไวรัส

เตรียม electrophoresis buffer โดยใช้ TBE buffer (50x) ซึ่งประกอบด้วย Tris 242 กรัม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร และ EDTA 100 มิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5 M pH 8.0 อุปกรณ์การเตรียม gel eletrophoresis ดังแสดงในภาพที่ 3.6

ขั้นตอนการเตรียม agarose gel เตรียม TBE buffer (10x) จาก TBE buffer (50 X) โดยใช้ TBE buffer (50 X) 50 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันแล้วนำ 50 มิลลิลิตร มาละลาย agarose gel ซึ่งมีน้ำหนัก 0.4 กรัม ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน หยดสารตัวอย่างดีเอ็นเอลงในหลุมที่เตรียมไว้ เท buffer ที่เหลืออีก 450 มิลลิลิตร ลงไปให้ท่วม gel สูงประมาณ 1-3 มิลลิเมตร เตรียม loading dye ที่เข้มข้นประมาณ 10 เท่า ผสมกับ ethidium bromide ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อต้องการใช้จะผสมกับ PCR product ในอัตราส่วน 1 ต่อ 5 แล้วนำไปหยดลงในหลุมบน agarose gel ที่เตรียมไว้แต่ละหลุม โดยมีตัวเปรียบเทียบคือ DNA มาตรฐานซึ่งหยดลงในหลุม agarose gel ด้านใดด้านหนึ่งหรือทั้งสองด้าน ใช้ไฟฟ้าคงที่ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 50 นาที แล้วนำถาด gel ไปตรวจสอบภายใต้รังสี ultraviolet ด้วยเครื่อง Gel Photodocumentation System ซึ่งสามารถมองเห็นแถบสีของ RNA product ซึ่งเคลื่อนที่ไปจากขั้วลบไปยังขั้วบวกแล้ว จากนั้นทำการบันทึกภาพ และ นำไปวิเคราะห์ผล



ภาพที่ 6 แสดงอุปกรณ์การเตรียม gel electrophoresis ประกอบด้วย การเตรียม agarose gel ซึ่งประกอบด้วยหวี (comb) (a); และ gel chamber (ตามลูกศรชี้) ชุดสำหรับการ run gelectrophoresis (b)

### 3.3 การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด ( seed transmission )

ศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ดโดยการนำเมล็ดพันธุ์แพสชันฟรุ้ดที่มีการจำหน่ายในท้องตลาด มาทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ โดยใช้เมล็ดพันธุ์จำนวน 100 เมล็ด มาเพาะในกระถางโดยใช้ดินที่ปราศจากเชื้อ รดน้ำทุกวัน และเก็บไว้ในโรงเรือนป้องกันแมลง หลังจากนั้นสังเกตอาการของเชื้อไวรัสในต้นพืช ตั้งแต่ระยะต้นกล้าจนกระทั่งต้นกล้ามีอายุ 1 เดือน

### 3.4 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไวรัสโดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope)

ตรวจสอบด้วยกล้องอิเล็กตรอน Hitachi Model HU-12A ในฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง) สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์บางเขน โดยวิธี Leaf dip technique โดยการบดตัวอย่างใบพืชที่เป็นโรคในสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1 M pH 7.5 ที่แช่เย็น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 (w/v) แยกตะกอนเศษพืชออกแล้วหยดน้ำคั้นของพืชเป็นโรคที่ต้องการทดสอบลงบนแผ่น parafilm ที่สะอาด นำกริด (grid) ขนาด 300 mesh ที่เคลือบด้วยสารละลาย formvar ที่ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ใน chloroform (w/v) และ carbon coat ซึ่งทำลายประจุผิวหน้ากริดแล้ว วางกริดคว่ำลงบนหยดน้ำคั้นประมาณ 10 นาที หลังจากนั้นล้างกริดด้วยสารละลาย phosphate buffer ความเข้มข้น 0.1M pH 7.5 ประมาณ 1.5 มิลลิลิตร ซับขอบกริดด้วยกระดาษกรองให้แห้งพอหมาด ย้อมสีด้วย uranyl acetate (UA) 2 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 0.3 มิลลิลิตร ซับขอบกริดให้แห้งอีกครั้งก่อนนำไปตรวจดูด้วยกล้อง electron microscope (EM) เพื่อตรวจหาอนุภาคของเชื้อไวรัส ขนาด และรูปร่างของอนุภาค

### 3.5 การใช้วิธีการแบบผสมผสานในการป้องกันกำจัดโรคไวรัสของแพสชันฟรุ้ด

ทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไวรัสในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกรเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยเปรียบเทียบ 3 วิธีการ คือ 1) การใช้วิธีแบบผสมผสาน 2) การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงเพียงอย่างเดียว และ 3) แปลงปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งพื้นที่แปลงทดลองแต่ละแปลงมีขนาด 3 ไร่ และแปลงทดลองแต่ละแปลงตั้งอยู่ในบริเวณที่แตกต่างกันคือ แปลงที่ 1 ตั้งอยู่บริเวณเชิงเขา โดยพื้นที่แปลงครึ่งหนึ่งเป็นพื้นที่ราบ และอีกครึ่งหนึ่งลาดเทขึ้นบนเนินเขา แปลงที่ 2 ตั้งอยู่บนภูเขา คือพื้นที่แปลงปลูกทั้งหมดตั้งอยู่บนภูเขา และแปลงที่ 3 เป็นแปลงปลูกที่ตั้งอยู่บนพื้นที่ราบทั้งหมด เริ่มทำการทดลองหลังจากการย้ายต้นกล้าแพสชันฟรุ้ดลงแปลงปลูก ขณะแพสชันฟรุ้ดมีอายุประมาณ 2 เดือนไปจนถึงการเก็บเกี่ยวผลผลิต โดยวางแผนการทดลองแบบ RCBD (Randomized Complete Block Design) มี 10 ซ้ำ (ซ้ำละ 20 ต้น) ประกอบด้วย 3 วิธีการดังแสดงในภาพที่ 3.7 ซึ่งแต่ละวิธีการ มีการจัดการที่แตกต่างกันดังนี้คือ

### วิธีที่1 การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงเพียงอย่างเดียว

ใช้สาร imidacloprid ควบคุมแมลงพาหะพวกเพลี้ยอ่อนในอัตรา 20 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ผสมกับสารจับใบฉีดพ่นทางใบ 5 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นให้ทั่วแปลงทุกๆ 15 วัน

### วิธีที่2 การใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน

วิธีการนี้ใช้หลายวิธีการร่วมกันคือ การใช้กับดักกาวเหนียว การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลง และการใช้น้ำมันปิโตรเลียมป้องกันกำจัดศัตรูพืช โดยการผูกกับดักกาวเหนียวสีเหลืองซึ่งเป็นสีที่มีการทดสอบ และรายงานว่าเป็นสีที่ดึงดูดแมลงพวก เพลี้ยอ่อน และแมลงหวี่ขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในการติดตามประเมินคุณภาพแน่นอนของประชากรแมลง ผูกติดกับค้างต้นแพศชั่นฟรุ้ดกระจายทั่วแปลงปลูกเฉพาะแปลงที่ใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานเท่านั้น โดยทาขาวเหนียวใหม่ทุกๆ 15 วัน สำหรับน้ำมันปิโตรเลียมป้องกันกำจัดศัตรูพืช (White oil) ใช้ในอัตรา 5 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ใช้ร่วมกับสารเคมีกำจัดแมลง imidacloprid ที่อัตรา 20 ซีซี ต่อน้ำ 20 ลิตร และสารจับใบอัตรา 5 ซีซีต่อน้ำ 20 ลิตร ฉีดพ่นให้ทั่วแปลงทุกๆ 15 วัน

### วิธีที่3 แปลงปลูกตามธรรมชาติ (Control)

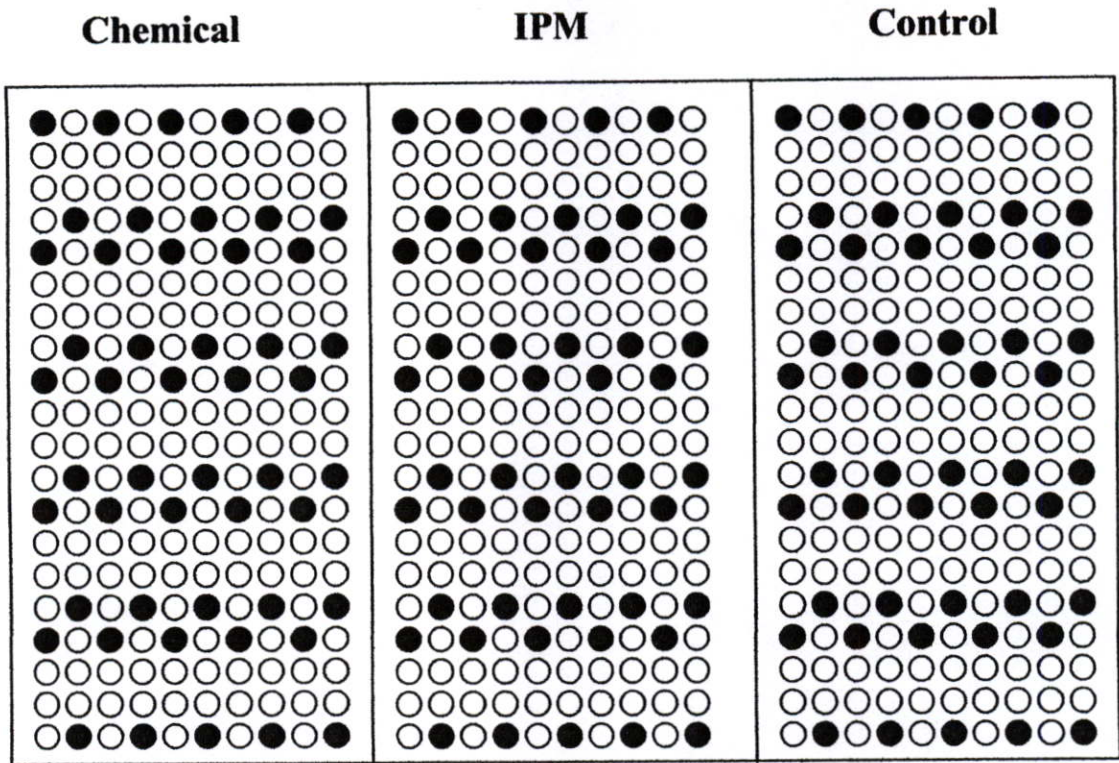
เป็นแปลงปลูกที่ใช้เปรียบเทียบ โดยการปลูกตามธรรมชาติ และให้น้ำตามปกติ

## 3.6 การประเมินระดับความรุนแรงของโรค เฮอร์เชินต์การเกิดโรค และผลผลิตที่ได้

ประเมินระดับความรุนแรงของโรค และเฮอร์เชินต์การเกิดโรคในทุกวิธีการ โดยการสุ่มประเมิน อย่างมีระบบวิธีการละ 50 ต้น ทุกๆ 30 วัน กำหนดระดับการเกิดโรคแบ่งเป็น 5 ระดับ คือ ระดับ 0 ถึง ระดับ 4 (ดังแสดงในข้อ 3.1.1) แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อแพศชั่นฟรุ้ดให้ผลผลิต เก็บผลผลิตที่ได้ในแต่ละวิธีการ มาชั่งบันทึกข้อมูลจำนวนน้ำหนักของผลผลิต และนำข้อมูลไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างแปลงที่ใช้สารเคมีกำจัดแมลงเพียงอย่างเดียว แปลงที่ใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน และแปลงปลูกตามธรรมชาติ ดังแสดงในภาพที่3.8



ภาพที่3.7 แสดงขนาดพื้นที่ 1 ไร่ ซึ่งมีจำนวนต้นแพะชันฝรั่งประมาณ 200 ต้นและ ระยะปลูก ขนาด 2 X 2 เมตร และการวางแผนผังการทดลองแต่ละวิธีการในสภาพพื้นที่แต่ละ แปลงทดลอง



ภาพที่ 3.8 แสดงการวางแผนผังในการสุ่มต้นพืชชั้นฟรุ้ดอย่างมีระบบในการประเมินระดับความรุนแรงของโรคและเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคแต่ละวิธีการในสภาพพื้นที่แต่ละแปลงทดลอง

### 3.7 ตำรวจชนิดของแมลงพาหะในแปลงปลูกแพสชันฟรุต

ตำรวจชนิดของแมลงที่พบในแปลงปลูกแพสชันฟรุต ของเกษตรกรในพื้นที่แปลง 3 สภาพพื้นที่ คือ แปลงปลูกเชิงเขา แปลงปลูกบนภูเขา และแปลงปลูกบนพื้นที่ราบในวิธีการที่ใช้การจัดการแบบผสมผสานที่มีการใช้กับดักกาวเหนียว โดยสุ่มตรวจนับจำนวนของแมลงที่ติดอยู่บนกับดักกาวเหนียวจำนวน 15 กับดักต่อแปลง ทุกๆ 30 วัน

### 3.8 สถานที่ทำการทดลอง

1. ห้องปฏิบัติการ โรคพืชวิทยา ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2. โรงเรือนเพาะเลี้ยงของภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
3. ห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์เนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
4. ห้องปฏิบัติการ ADB คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
5. ฝ่ายเครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์กลาง) สถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

### 3.9 ระยะเวลาในการทดลอง

2 ปี

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การสำรวจโรคไวรัสในแปลงปลูกแพศชันฟรุ้ต และการถ่ายทอดเชื้อ

##### 4.1.1 ผลการสำรวจอาการ และประเมินระดับความรุนแรงของโรคไวรัส (disease assesment)

##### ในแปลงปลูกแพศชันฟรุ้ต

จากการสำรวจพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกรในอำเภอปะทิว จำนวน 15 แปลงพบว่าพืชแสดงอาการของโรคไวรัสที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 อาการ คือ 1) อาการใบด่างจุดเหลืองรุนแรง 2) ใบด่างสีเขียวเข้ม และ 3) ใบด่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding

**อาการที่1 ใบด่างจุดเหลืองรุนแรง** ซึ่งลักษณะอาการโดยรวมคือแผลจะเป็นจุดด่างสีเหลืองเข้ม มีขนาดค่อนข้างเล็กกระจายอยู่ทั่วไปเกือบทั้งใบขอบแผลค่อนข้างกลม บริเวณที่จุดแผลเกิดขึ้นอยู่นานาแน่นจะทำให้มีการแห้งตายซึ่งจะมีสีเหลืองถึงสีน้ำตาล ใบอ่อนที่แสดงอาการรุนแรงจะหยุดการเจริญเติบโตและหลุดร่วงไป และในที่สุดทำให้ยอดตายดังแสดงในภาพที่4.1

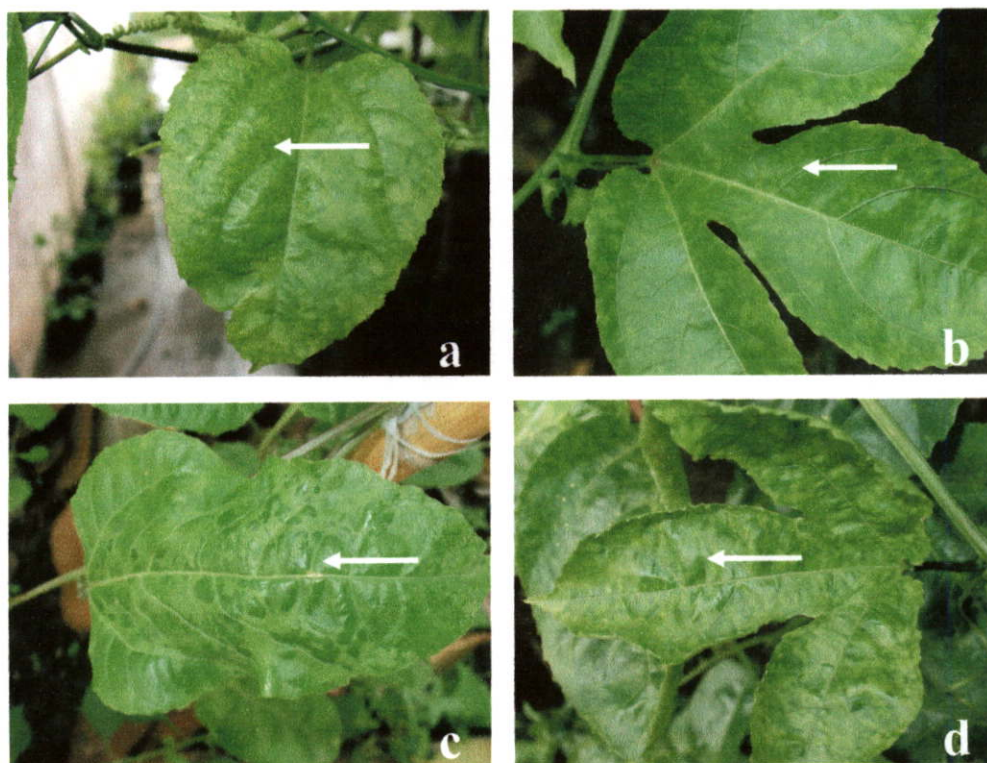
**อาการที่2 ใบด่างสีเขียวเข้มของแพศชันฟรุ้ต** พบมากที่ใบอ่อนซึ่งแสดงอาการด่างสีเขียวเข้ม สลับกับสีเขียวอ่อนบริเวณขอบรอบๆ อาการด่างจะเปลี่ยนแปลงไม่แน่นอน ตรงกลางบริเวณที่ด่างจะมีลักษณะแข็งกระด้าง และทำให้ใบบิดเบี้ยวเป็นคลื่น ใบอ่อนที่แสดงอาการรุนแรงจะชะงักการเจริญเจริญเติบโตดังแสดงในภาพที่4.2

**อาการที่3 อาการใบด่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding** ใบโปร่งเป็นคลื่น บิดเบี้ยวหรือม้วนงอ บางครั้งม้วนงอรุนแรงจนเกือบจะเป็นวงกลม ซึ่งบริเวณเส้นใบจะมารวมกันเป็นแถบใหญ่ๆ ดังแสดงในภาพที่4.3

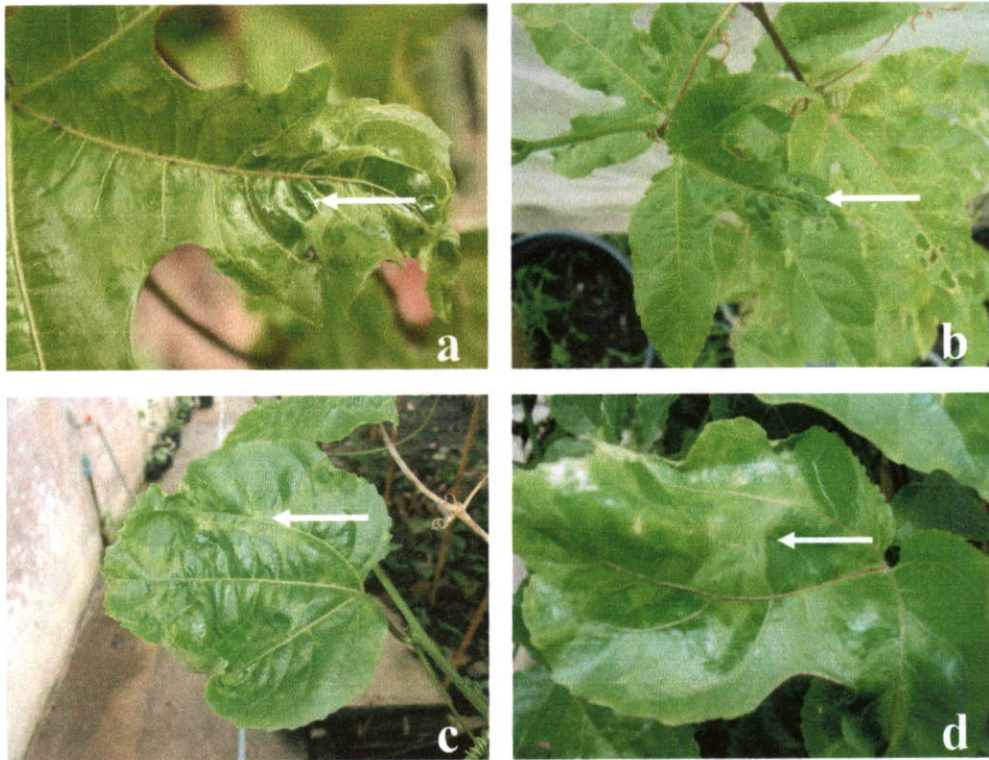
จากการสุ่มสำรวจแปลงปลูกแพศชันฟรุ้ตในอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร จำนวน 15 แปลง ซึ่งเริ่มในช่วงเดือนกรกฎาคม 2546 ถึงเดือนกรกฎาคม 2547 ดังแสดงในตารางที่4.1 พบว่าแปลงปลูกแพศชันฟรุ้ตทุกแปลงมีอาการของโรคไวรัส ซึ่งระดับความรุนแรงของโรคในแต่ละแปลงมีความแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ที่สำรวจ ผลการประเมินระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ย (disease assesment) เท่ากับ 2.2 คือ พบอาการใบอ่อนของแพศชันฟรุ้ตแสดงอาการทั้งด่าง และหงิกเล็กน้อยหรือพื้นที่ใบเป็น โรคประมาณ 26 - 50 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่4.4 และพบจำนวนต้นของการเกิดโรคเฉลี่ย (disease incidence) เท่ากับ 89.06 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่4.5



**ภาพที่ 9** อาการใบด่างจุดเหลืองรุนแรง ยอดอ่อนที่แสดงอาการไม่รุนแรงยังมีการเจริญเติบโต (ตามลูกศรชี้) (a); ยอดอ่อนที่แสดงอาการรุนแรง ใบยอดด่างเหลืองรุนแรงไม่มีการเจริญเติบโต ในที่สุดใบจะหลุดร่วง และยอดตาย (ตามลูกศรชี้) (b); ใบอ่อนแสดงอาการจุดเหลืองในระยะแรก ซึ่งอาการไม่รุนแรง (ตามลูกศรชี้) และ (c); ใบแก่ที่แสดงอาการด่างจุดเหลืองอย่างชัดเจน ผลจะเป็นจุดด่างสีเหลืองเข้ม มีขนาดค่อนข้างเล็กกระจายอยู่ทั่วไปเกือบทั้งใบ (ตามลูกศรชี้) (d)



**ภาพที่ 10** อาการด่างสีเขียวเข้ม ใบด้านล่างรูปร่างรีเป็นรูปไข่ขณะยังเป็นต้นอ่อน (a); และใบด้านบนขณะเจริญเติบโตมีรูปร่างเป็น 3 แฉก แสดงอาการด่างไม่รุนแรง ด่างเป็นจุดเล็กเล็ก สีเขียวเข้มกระจายอยู่ทั่วไป ซึ่งใบยังคงรูปร่างเดิม (ตามลูกศรชี้) (b); ใบด้านล่างรูปร่างรีเป็นรูปไข่ขณะยังเป็นต้นอ่อน และ (c); ใบด้านบนขณะเจริญเติบโตรูปร่างเป็น 3 แฉก แสดงอาการด่างรุนแรง ซึ่งอาการด่างจะเปลี่ยนแปลงไม่แน่นอน ตรงกลางบริเวณที่ ด่างจะมีลักษณะแข็งกระด้าง และทำให้ใบบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง (ตามลูกศรชี้) (d)



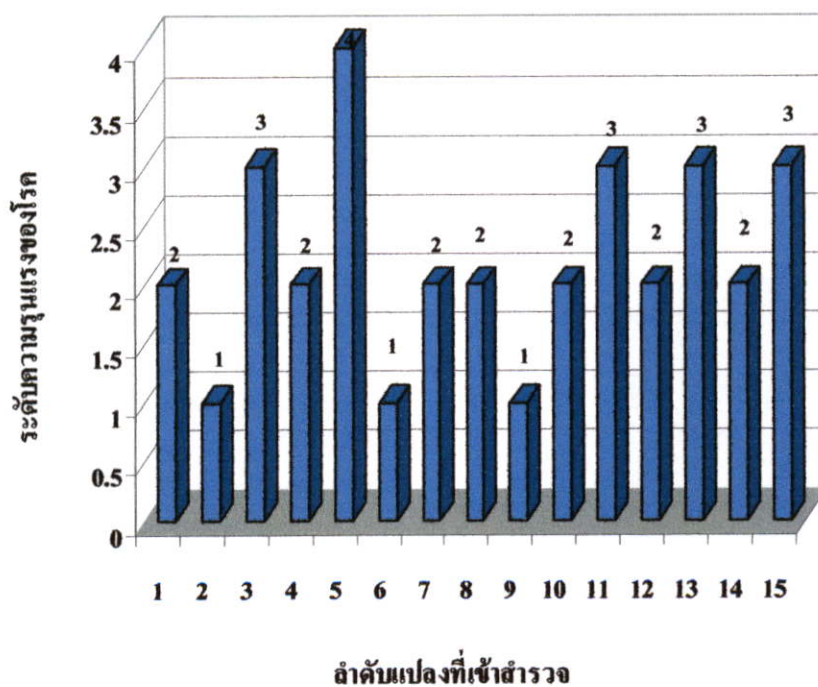
**ภาพที่ 11** อาการใบด่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding ใบด้านบนรูป 3 แฉก แสดงอาการเฉพาะบริเวณปลายใบซึ่งใบโป่งเป็นคลื่น บิดเบี้ยวหรือม้วนงอ (ตามลูกศรชี้) (a) และ (b); ใบด้านล่างรูปไข่ แสดงอาการเส้นใบมารวมกันเป็นแถบใหญ่ (ตามลูกศรชี้) (c); และ ใบด้านบนรูป 3 แฉก แสดงอาการบิดเบี้ยวหรือม้วนงอรุนแรง เส้นใบจะมารวมกันเป็นแถบใหญ่ๆ (ตามลูกศรชี้)(d)

**ตารางที่ 2** การประเมินระดับความรุนแรงของโรค (disease assessment) และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (disease incidence) ของเพศชั้นฟรุ้ดที่สำรวจจำนวน 15 แปลง

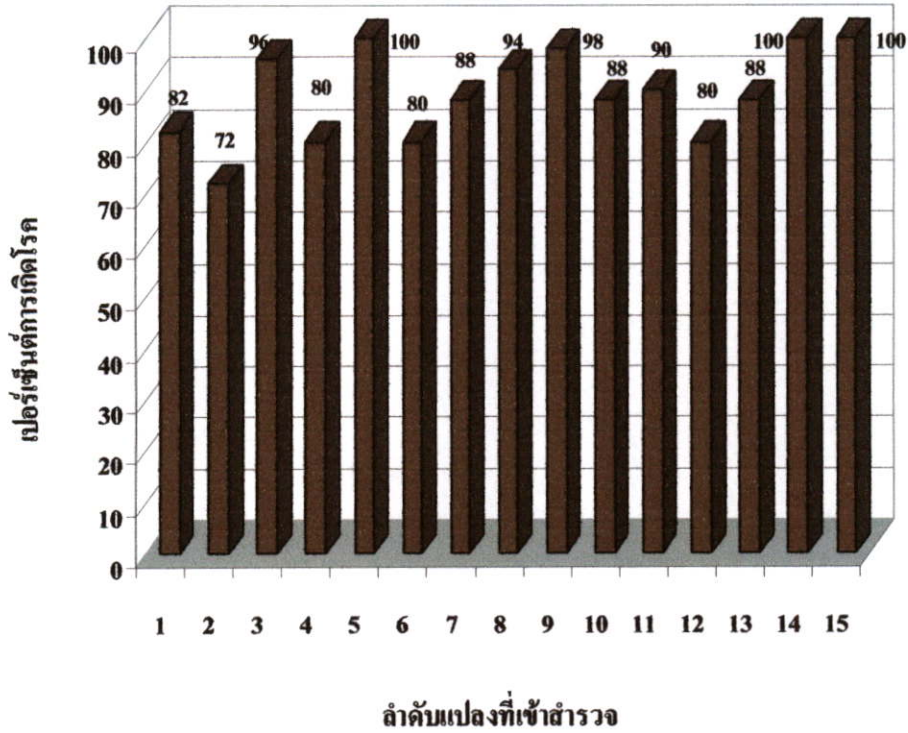
แปลงที่	ขนาดของพื้นที่ (ไร่)	ระดับความรุนแรงของโรค <sup>1/</sup> (disease assesment)	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรค <sup>2/</sup> (disease incidence)
1	5	2.0	82.00
2	1	1.0	72.00
3	1	3.0	96.00
4	4	2.0	80.00
5	5	4.0	100.00
6	2	1.0	80.00
7	2	2.0	88.00
8	2	2.0	94.00
9	5	1.0	98.00
10	4	2.0	88.00
11	10	3.0	90.00
12	5	2.0	80.00
13	2	3.0	88.00
14	3	2.0	100.00
15	6	3.0	100.00
<b>รวม</b>	<b>57</b>	<b>33.0</b>	<b>1336.00</b>
<b>เฉลี่ย</b>	<b>3.8</b>	<b>2.2</b>	<b>89.06</b>

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 50 ต้น

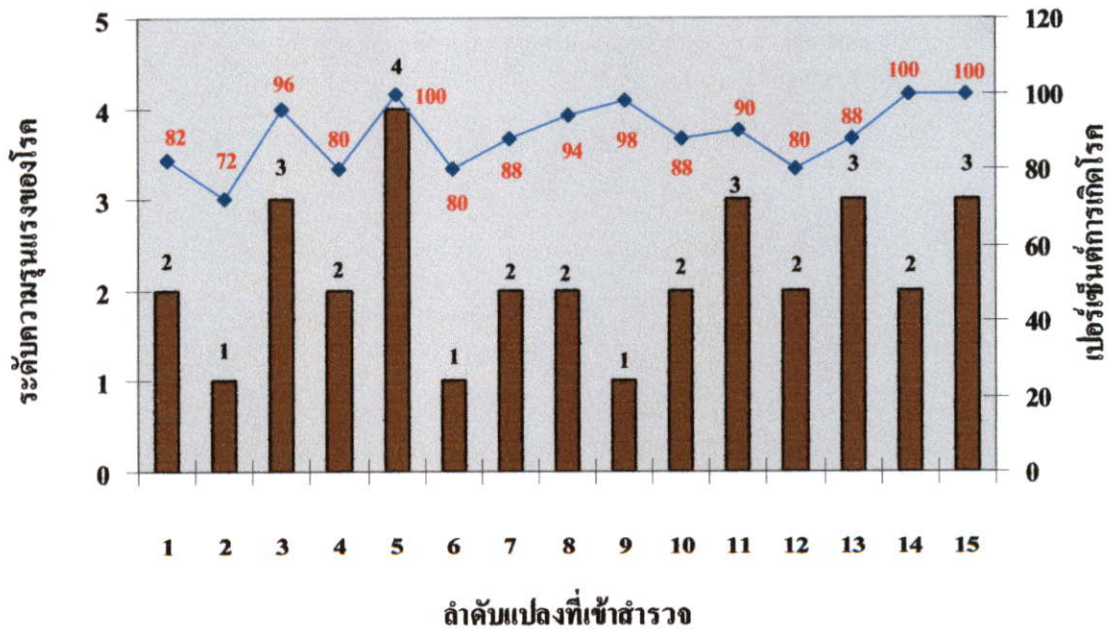
2/ ค่าเฉลี่ยจาก 50 ต้น



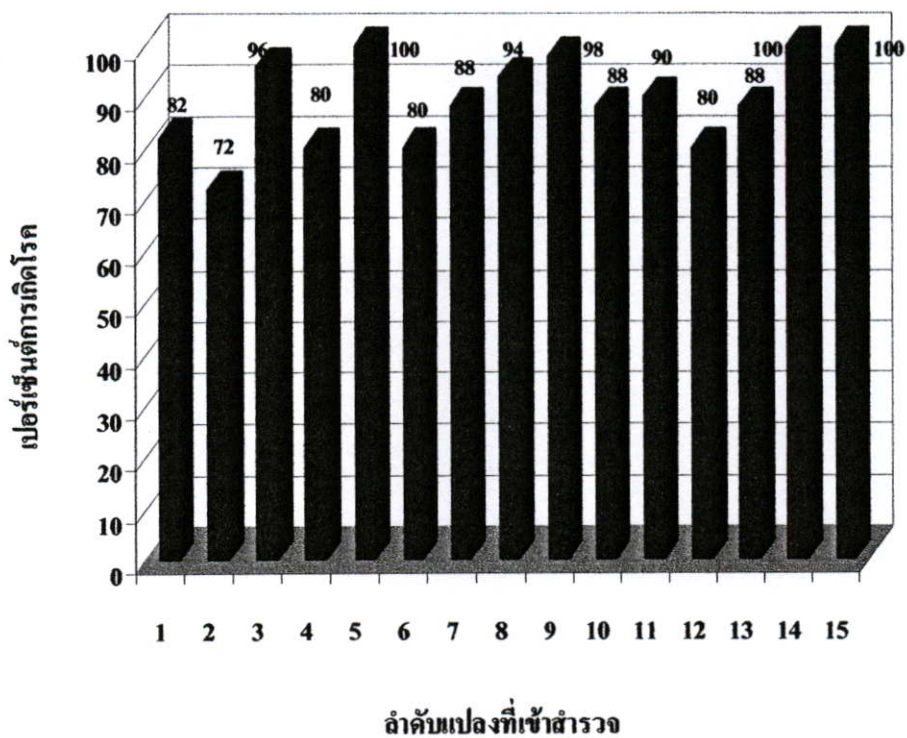
**ภาพที่ 12** การประเมินระดับความรุนแรงของโรคไวรัส (disease assesment) ในแปลงปลูกเพศชั้นฟรุ้ดของเกษตรกรจำนวน 15 แปลง



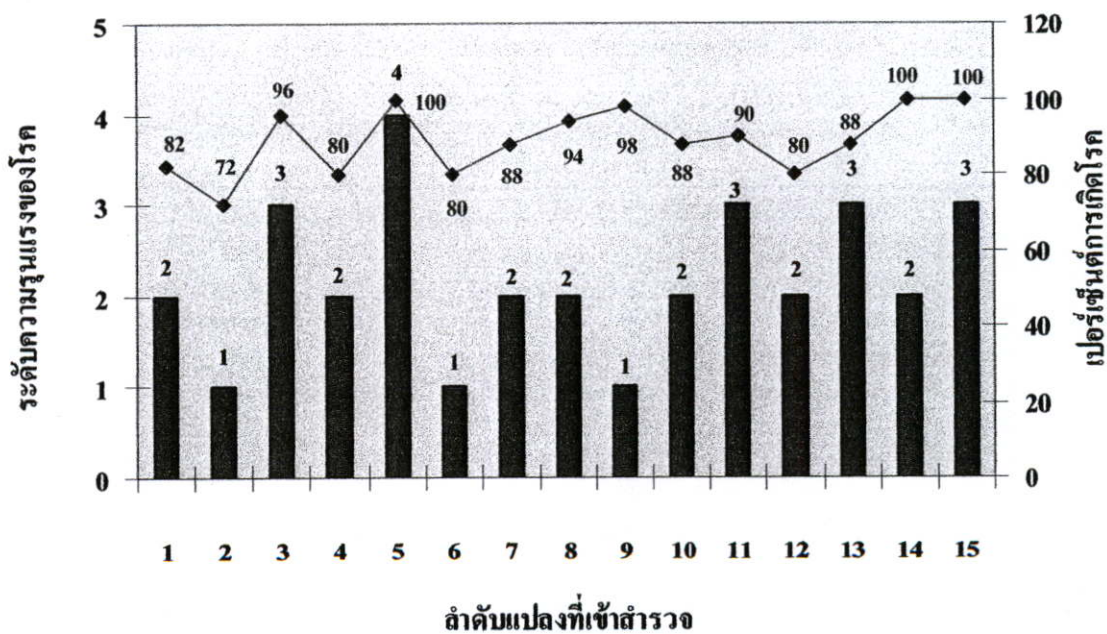
ภาพที่ 13 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัส (disease incidence) ในแปลงปลูก  
แพสชันฟรุตของเกษตรกรจำนวน 15 แปลง



ภาพที่ 14 การประเมินระดับความรุนแรงของโรค (disease assesment) และเปอร์เซ็นต์การเกิด  
โรค (disease incidence) ของแพสชันฟรุตที่สำรวจจำนวน 15 แปลง



ภาพที่ 4.5 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัส (disease incidence) ในแปลงปลูกแพสชันฟรุตของเกษตรกรจำนวน 15 แปลง



ภาพที่ 4.6 การประเมินระดับความรุนแรงของโรค (disease assesment) และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค (disease incidence) ของแพสชันฟรุตที่สำรวจจำนวน 15 แปลง

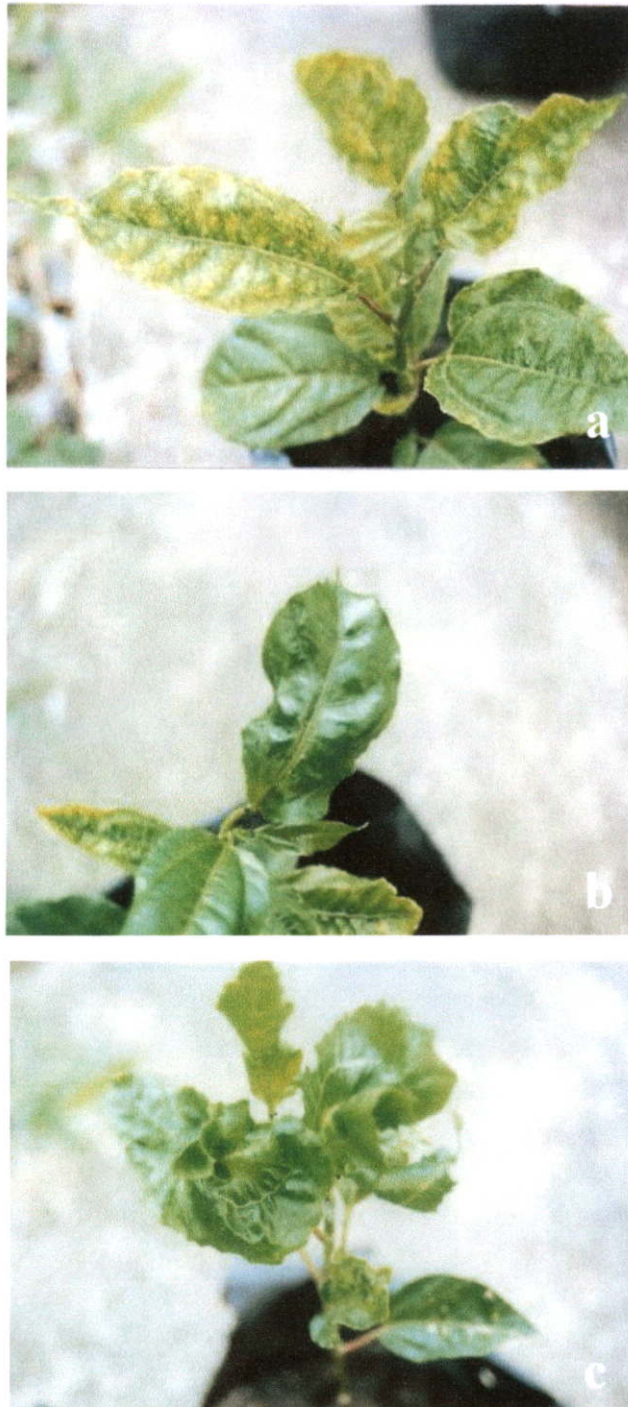
#### 4.1.2 ผลการถ่ายทอดเชื้อและ เพิ่มจำนวนเชื้อ

การเก็บตัวอย่างใบที่แสดงอาการโรคไวรัสของแพศชันฟรุ้ดในแปลงเกษตรกรมาถ่ายทอดโดยใช้น้ำคั้น (mechanical sap transmission) ลงในต้นกล้าแพศชันฟรุ้ดที่มีอายุ 40 วัน ดังแสดงในภาพที่4.7

1) อาการใบด่างจุดเหลืองรุนแรง หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน ต้นกล้าแพศชันฟรุ้ดเริ่มปรากฏอาการจุดแผลเล็กๆ (local lesion) จุดแผลค่อนข้างกลม มีสีเหลืองในใบที่ถูกปลูกเชื้อ ต่อมาอาการจุดเหลืองจะลุกลามแพร่กระจายไปยังใบยอด (systemic lesion) และจุดแผลเริ่มขยายใหญ่ขึ้นทำให้ใบพืชเหลืองเกือบทั้งใบ ใบโปร่งและบิดเบี้ยวผิดรูปร่าง ซึ่งจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อ 28 วัน ดังแสดงในภาพที่4.7a

2) อาการใบด่างสีเขียวเข้ม หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน ต้นกล้าแพศชันฟรุ้ดเริ่มปรากฏอาการจุดแผลสีน้ำตาลเล็กๆ (local lesion) และ ใบที่ถูกปลูกเชื้อจะบิดเบี้ยว ต่อมาอาการจะปรากฏชัดเจนที่ใบยอด (systemic lesion) ซึ่งมีอาการด่างเป็นจุดสีเขียวเข้มจำนวนมาก บริเวณที่ด่างจะมีลักษณะแข็งกระด้างและ ทำให้ใบบิดเบี้ยวเป็นคลื่น ซึ่งจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อ 28 วัน ดังแสดงในภาพที่4.7b

3) อาการใบด่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding หลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน ใบที่ถูกปลูกเชื้อจะบิดเบี้ยวเป็นคลื่น (local lesion) ต่อมาอาการจะปรากฏชัดเจนที่ใบยอด (systemic lesion) ซึ่งมีอาการด่างเป็นจุดสีเขียวอ่อน บริเวณที่ด่างจะมีลักษณะแข็งกระด้าง เส้นใบจะมารวมกันเป็นแถบใหญ่ๆทำให้ใบบิดเบี้ยวม้วนงอ ซึ่งจะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนหลังจากปลูกเชื้อ 28 วัน ดังแสดงในภาพที่4.7c



**ภาพที่ 15** อาการของโรคไวรัสหลังจากปลูกเชื้อ 28 วันในต้นกล้าแพสชันฟรุตที่มีอายุ 40 วัน ซึ่งเก็บตัวอย่างอาการโรคไวรัสจากแปลงปลูกแพสชันฟรุตของเกษตรกรมาถ่ายทอดโดยการใช้น้ำคั้นใบต่างจุดเหลืองรุนแรง (ตามลูกศรชี้) (a); ใบค่างเขียวเข้ม (ตามลูกศรชี้) (b); และ ใบค่างเส้นใบเป็น vein banding (ตามลูกศรชี้) (c)

## 4.2 การจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายพืชชั้นฟรุ้ด

### 4.2.1 ผลการทดสอบพืชอาศัยของเชื้อไวรัส

ผลการทดสอบพืชอาศัยชนิดต่างๆ ใน 5 วงศ์ คือ Chenopodiaceae, Leguminosae, Cucurbitaceae, Amaranthaceae และ Passifloraceae โดยนำใบพืชชั้นฟรุ้ดที่แสดงอาการของโรคไวรัส มาถ่ายทอดลงในพืชทดสอบโดยใช้มีด (mechanical sap transmission) แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะอาการการเกิดโรคไวรัสของพืชชั้นฟรุ้ดจากการถ่ายทอดลงในพืชทดสอบ จำนวน 5 วงศ์ โดยการใช้มีด (mechanical sap transmission)

วงศ์และชื่อ วิทยาศาสตร์	ลักษณะอาการที่นำมาทดสอบ อาการที่เกิดในพืชอาศัย และ ระยะเวลาที่เกิดอาการหลังปลูกเชื้อ		
	จุดเหลืองรุนแรง	ค้างเขียวเข้ม	ค้างเส้นใบ vein banding
<b>Chenopodiaceae</b>			
<i>C. amaranticolor</i>	L, 3-4 วัน	L-S, 7-10 วัน	L-S, 7-10 วัน
<b>Leguminosae</b>			
<i>P. aureus</i> Roxb	L, 3-4 วัน	-	-
<i>V. sesquipedalis</i> Wight	S, 14 วัน	-	-
<b>Cucurbitaceae</b>			
<i>C. sativus</i> L	-	-	-
<b>Amaranthaceae</b>			
<i>G. globosa</i>	-	S, 14 วัน	S, 14 วัน
<b>Passifloraceae</b>			
<i>P. edulis</i> Sims	L-S, 10-14 วัน	L-S, 10-14 วัน	L-S, 10-14 วัน
<i>P. foetida</i> L	L-S, 10-14 วัน	L-S, 10-14 วัน	L-S, 10-14 วัน

L พืชทดสอบแสดงอาการจุดแผลแบบเฉพาะแห่ง (local lesion)

S พืชทดสอบแสดงอาการแบบกระจายทั่วทั้งต้น (systemic lesion)

- พืชทดสอบไม่แสดงอาการของโรคไวรัส

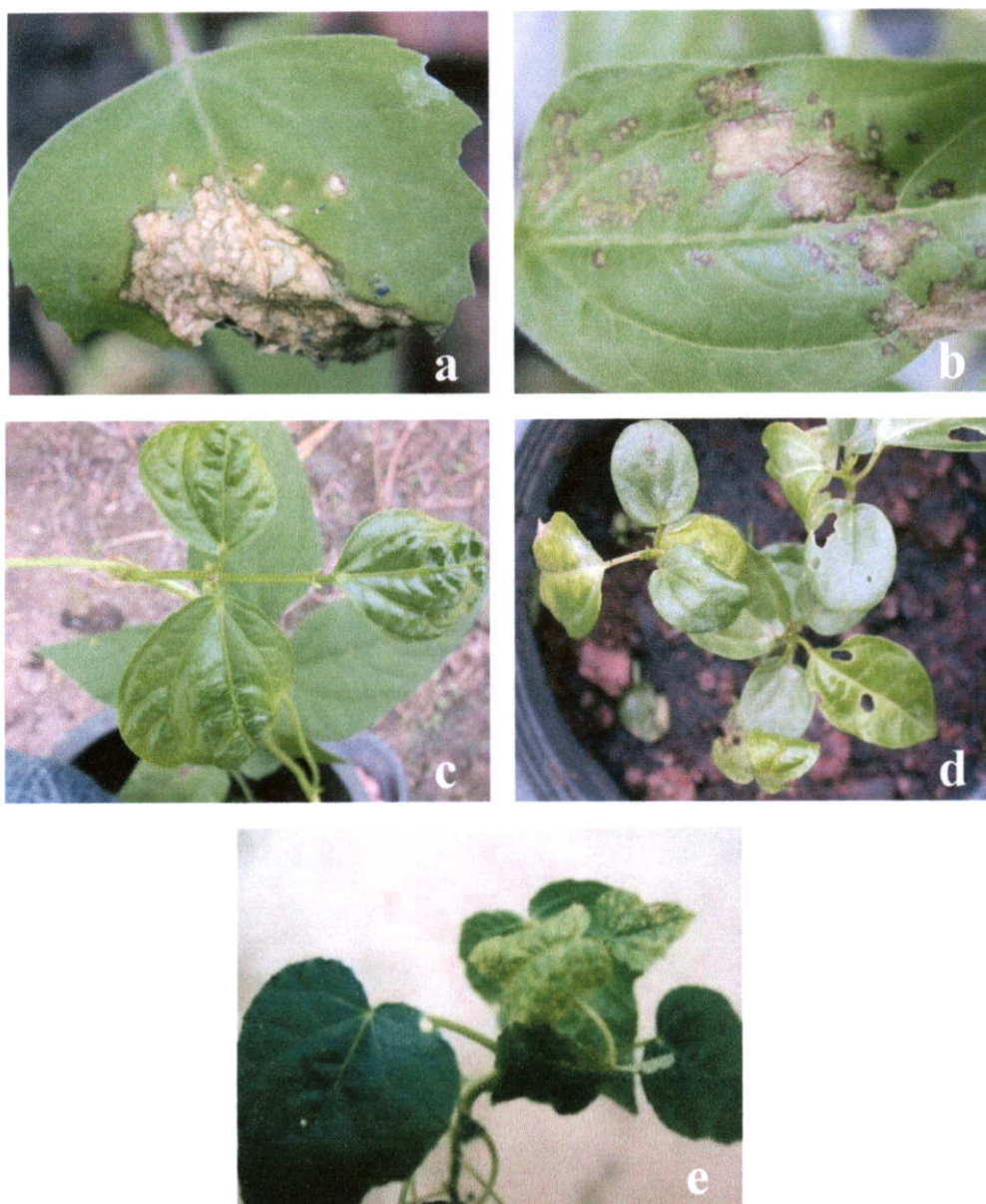
หลังจากถ่ายทอดอาการใบค้างจุดเหลืองรุนแรงลงในพืชทดสอบในวงศ์ต่างๆ พบว่าเชื้อไวรัสแสดงอาการดังในภาพที่ 4.8 คืออาการในต้นกล้า *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลเฉพาะแบบ local lesion หลังจากถ่ายทอดเชื้อ 3 - 4 วันซึ่งจุดแผลค่อนข้างกลม มีสีน้ำตาล และใบที่ถูกถ่ายทอดเชื้อไวรัสลงไปจะหลุดร่วงไปภายใน 7 วันดังแสดงในภาพที่ 4.8a ในต้นกล้าถั่วเขียวแสดงอาการแผลเฉพาะแบบ local lesion หลังจากถ่ายทอดเชื้อ 3 - 4 วันซึ่งจุดแผลค่อนข้างกลม มีสีน้ำตาลเข้ม และใบที่ถูกถ่ายทอดเชื้อไวรัสลงไปจะหลุดร่วงไปภายใน 14 วันดังแสดงในภาพที่ 4.8b

ในต้นกล้าถั่วฝักยาวแสดงอาการแบบ systemic lesion ที่ยอดอ่อนหลังจากถ่ายทอคเชื้อ 14 วัน ซึ่งใบอ่อนจะค้ำสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน และใบโป่งเป็นคลื่นค้งแสดงในภาพที่4.8c ในต้นกล้าแพศชั่นฟรุ้ตแสดงอาการทั้งแบบ local lesion และ systemic lesion หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 10 - 14 วัน ซึ่งใบแสดงอาการค้ำจุดเหลืองรุนแรง ในที่สุดใบที่ถูกถ่ายทอคเชื้อไวรัสจะหลุดร่วงไป และต้นกล้าจะตายภายใน 30 วันค้งแสดงในภาพที่4.8d ในต้นกล้ากะทกรกป่าแสดงอาการทั้งแบบ local lesion และ systemic lesion หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 10-14 วัน ซึ่งใบจะค้ำสีเขียวอ่อนหงิกงอ และฝิดรูปร่างค้งแสดงในภาพที่4.8e ในต้นกล้าแดงกวา และบานไม่รู้โรยไม่พบการแสดงอาการของเชื้อไวรัสหลังการถ่ายทอคเชื้อ

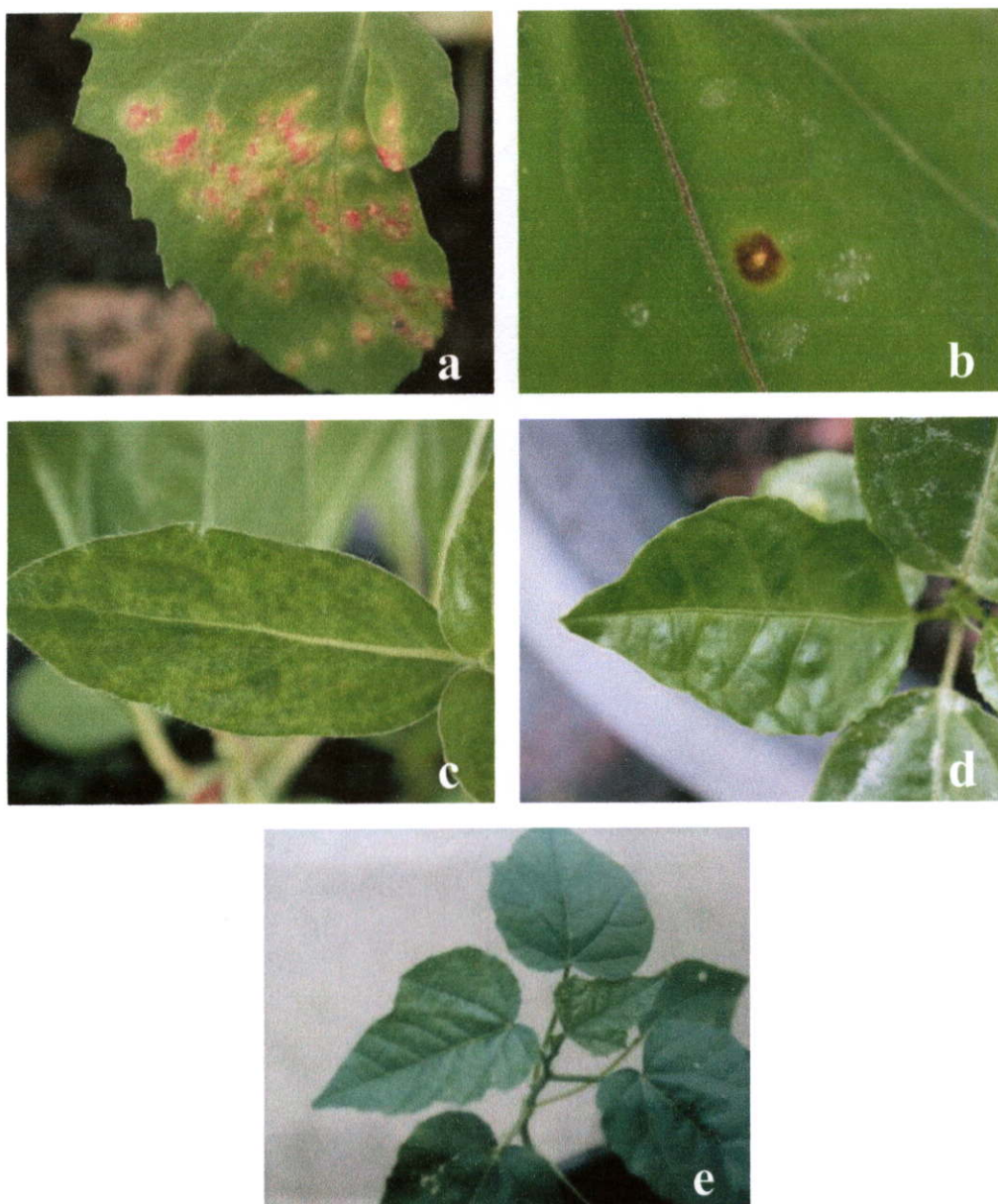
หลังจากถ่ายทอคอาการใบค้ำสีเขียวเข้มลงในพืชทดสอบในวงศ์ต่างๆ พบว่าเชื้อไวรัสแสดงอาการค้งในภาพที่4.9 คือพบอาการในต้นกล้า *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลทั้งแบบ local lesion ค้งแสดงในภาพที่4.9a และ systemic lesion ค้งแสดงในภาพที่4.9b หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 7 - 10 วัน ซึ่งจุดแผลค้งก่อนข้างกลมสีชมพู ตรงกลางจุดแผลเป็นน้ำตาล และใบที่ถูกถ่ายทอคเชื้อไวรัสลงไปจะหลุดร่วงไปภายใน 14 วัน ในต้นกล้าบานไม่รู้โรยแสดงอาการแบบ systemic lesion หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 14 วันค้งแสดงในภาพที่4.9c ทำให้ใบค้ำเป็นจุดสีเขียวอ่อน จุดค้งก่อนข้างกลมกระจายอยู่ทั่วไป และแสดงอาการชัดเจนในใบอ่อน ในต้นกล้าแพศชั่นฟรุ้ตแสดงอาการทั้งแบบ local lesion และ systemic lesion หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 10 - 14 วัน ซึ่งใบแสดงอาการค้ำสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ตรงกลางบริเวณที่ค้ำจะมีลักษณะแข็งกระด้าง และทำให้ใบบิดเบี้ยวเป็นคลื่น ค้งแสดงในภาพที่4.9d ในต้นกล้ากะทกรกป่าแสดงอาการทั้งแบบ local lesion และ systemic lesion หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 10-14 วัน ซึ่งใบจะค้ำสีเขียวอ่อนหงิกงอและ ฝิดรูปร่างค้งแสดงในภาพที่4.9e สำหรับในต้นกล้าถั่วเขียว ถั่วฝักยาว และในต้นกล้าแดงกวาไม่พบการแสดงอาการของเชื้อไวรัสหลังการถ่ายทอคเชื้อ

หลังจากถ่ายทอคอาการใบค้ำเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding ลงในพืชทดสอบในวงศ์ต่างๆ พบว่าเชื้อไวรัสแสดงอาการค้งในภาพที่4.10 คือพบอาการในต้นกล้า *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลทั้งแบบ local lesion ค้งแสดงในภาพที่4.10a และ systemic lesion ค้งแสดงในภาพที่4.10b หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 7 - 10 วันซึ่งจุดแผลค้งก่อนข้างกลมสีชมพู ตรงกลางจุดแผลเป็นน้ำตาล และใบที่ถูกถ่ายทอคเชื้อไวรัสลงไปจะหลุดร่วงไปภายใน 14 วัน ในต้นกล้าบานไม่รู้โรยแสดงอาการแบบ systemic lesion หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 14 วัน ทำให้ใบค้ำเป็นจุดสีเขียวอ่อนสลับสีเขียวแก่กระจายอยู่ทั่วไป และแสดงอาการชัดเจนในใบอ่อน ค้งแสดงในภาพที่4.10c ในต้นกล้าแพศชั่นฟรุ้ตแสดงอาการทั้งแบบ local lesion และ systemic lesion หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 10-14 วัน ซึ่งใบแสดงอาการค้ำสีเขียวเข้มสลับสีเขียวอ่อน ใบโป่งเป็นคลื่น บิดเบี้ยวหรือม้วนงอ ถ้าอาการรุนแรงเส้นใบจะมีลักษณะเป็น vein banding ค้งแสดงในภาพที่4.10d ในต้นกล้ากะทกรกป่าแสดงอาการทั้งแบบ local lesion และ systemic lesion หลังจากถ่ายทอคเชื้อ 10 - 14 วัน ซึ่งใบจะค้ำสี

เชื้อวุ้นหนังกงอ และฝักรูปร่างคั่งแควงในภาพที่4.10e ในต้นกล้าถั่วเขียว ถั่วฝักยาว และในต้นกล้า  
แตงกวาไม่พบการแสดงอาการของเชื้อไวรัสหลังการถ่ายทอดเชื้อ

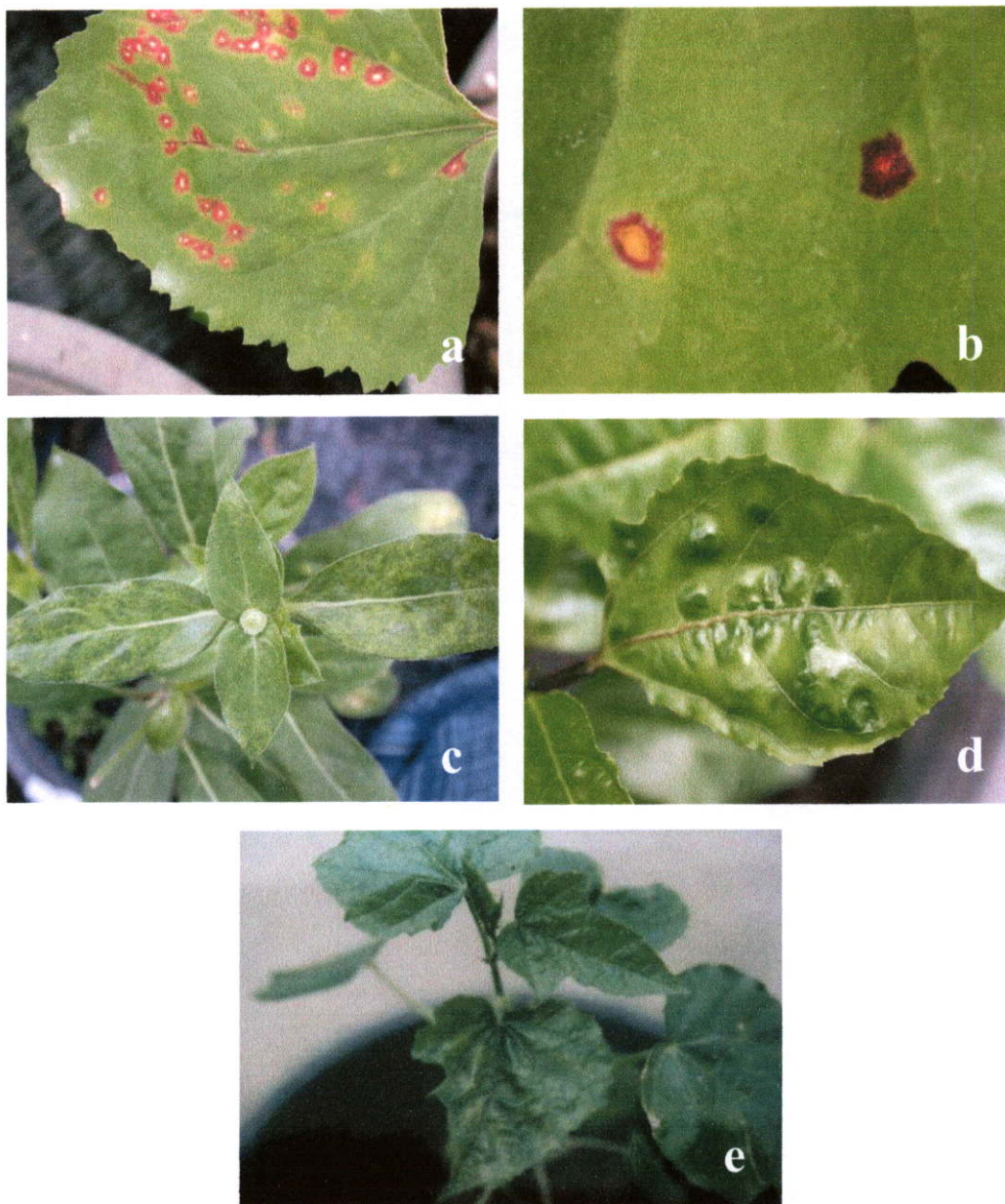


**ภาพที่ 16** ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดจากอาการใบด่างจุดเหลืองรุนแรงในพืชทดสอบชนิดต่างๆ ต้น *C. amaranticolor* (a); ต้นถั่วเขียว (b); ต้นถั่วฝักยาว (c); ต้นกล้าเพศชั้นฟรุ้ต (d) และ ต้นกล้ากะทกรกป่า (e)

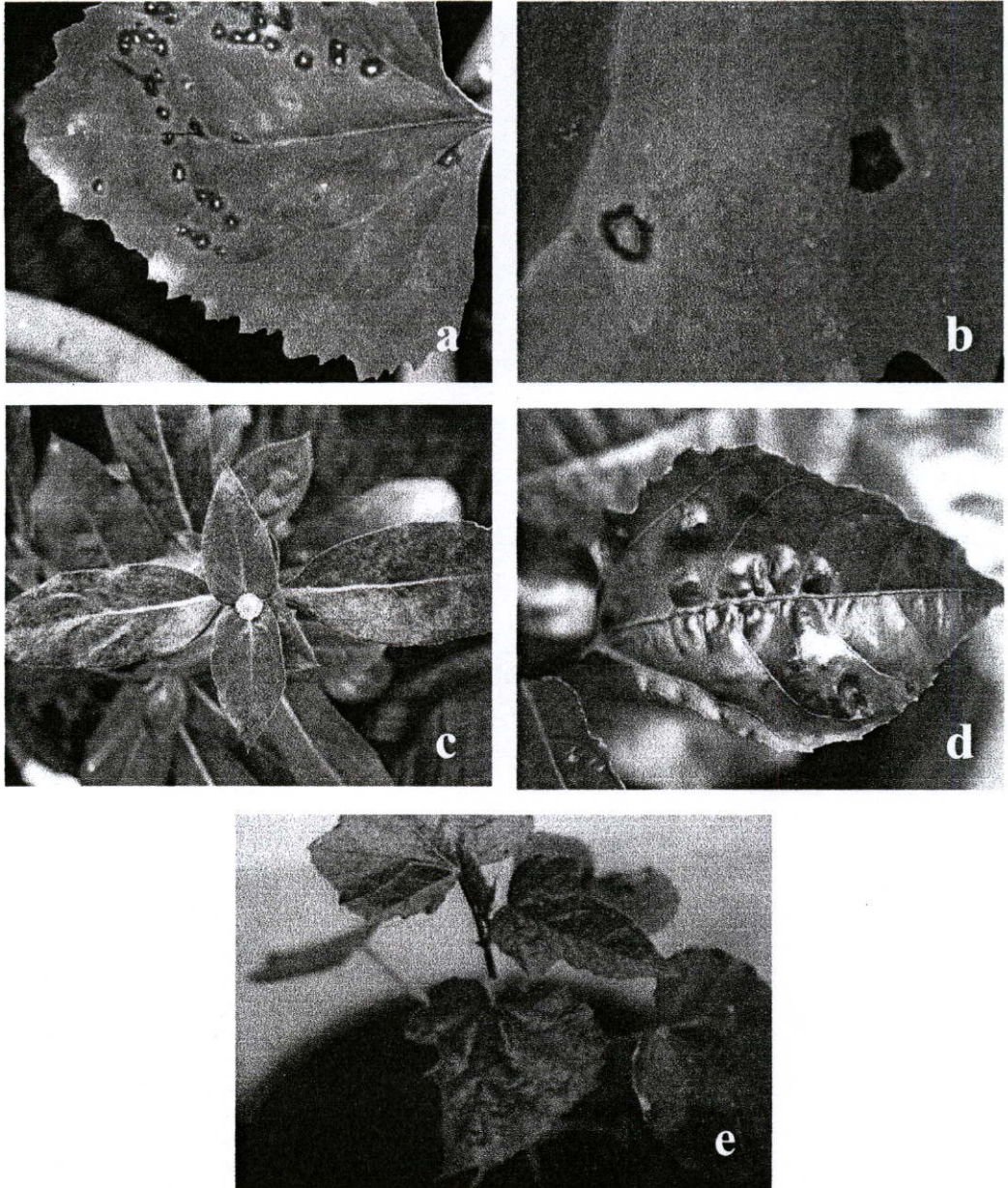


ภาพที่ 17 ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดจากอาการอาการใบด่างสีเขียวเข้มในพืชทดสอบชนิดต่างๆ

ต้น *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลแบบ local lesion (a); ต้น *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลแบบ systemic lesion (b); ต้นบานไม่รู้รุ่ย (c); ต้นกล้าแพสชันฟรุ้ต (d) และต้นกล้ากะทกรกป่า (e)



**ภาพที่ 18** ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดจากอาการใบด่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding ในพืชตด สอบชนิดต่างๆ ต้น *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลแบบ local lesion (a); ต้น *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลแบบ systemic lesion (b); ต้นบานไม่รู้รุ่ย (c); ต้นกล้าแพสชันฟรุ้ต (d) และต้นกล้ากะทกรกป่า (e)



ภาพที่4.10 ลักษณะอาการของโรคไวรัสที่ถ่ายทอดจากอาการใบด่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding ในพืชทดสอบชนิดต่างๆ ต้น *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลแบบ local lesion (a); ต้น *C. amaranticolor* แสดงอาการแผลแบบ systemic lesion (b); ต้นบานไม่รู้รุ่ย (c); ต้นกล้าแพสชันฟรุ้ต (d) และต้นกล้ากะทกรกป่า(e)

## 4.2.2 การวินิจฉัยเชื้อไวรัสโดยการตรวจสอบกรดนิวคลีอิก

### 4.2.2.1 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสโดยการตรวจสอบ dsRNA

จากการแยกสกัด Total RNA คือ การใช้ชุด UltraClean™ Plant RNA Isolation Kit และ การใช้ Plant concert solution จนได้สารสกัด RNA ทั้งหมด (total RNA) จากนั้นจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสโดยการตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อไวรัส (Double-stranded RNA detection) ด้วย วิธี gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างทั้ง 3 อาการของแพศชั้นฝรั่งคือ 1) ใบค่างจุดเหลืองรุนแรง 2) ใบค่างสีเขียวเข้ม และ 3) ใบค่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding พบ pattern ของเชื้อ CMV แยกตัวอย่างชัดเจนโดยเฉพาะ RNA4 และ RNA5 คือ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ  $1.32 \times 10^6$  และ  $0.8 \times 10^6$  คาลตัน ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.11 และ ตารางที่ 4.3

### 4.2.2.2 การตรวจสอบเชื้อโดยใช้เทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction)

ผลการศึกษา temperature gradient PCR ในช่วงอุณหภูมิ 45 - 65 องศาเซลเซียส จำนวน 5 อุณหภูมิ คือที่ 45, 51.5, 56.2, 60.9 และ 65 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเพิ่มทวีจำนวนของชิ้น DNA พบว่า ที่อุณหภูมิ 56.2 - 65 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มจำนวนของ DNA ของเชื้อไวรัสใบค่างเส้นใบเป็น vein banding ได้ดีที่สุดดังแสดงในภาพที่ 4.12

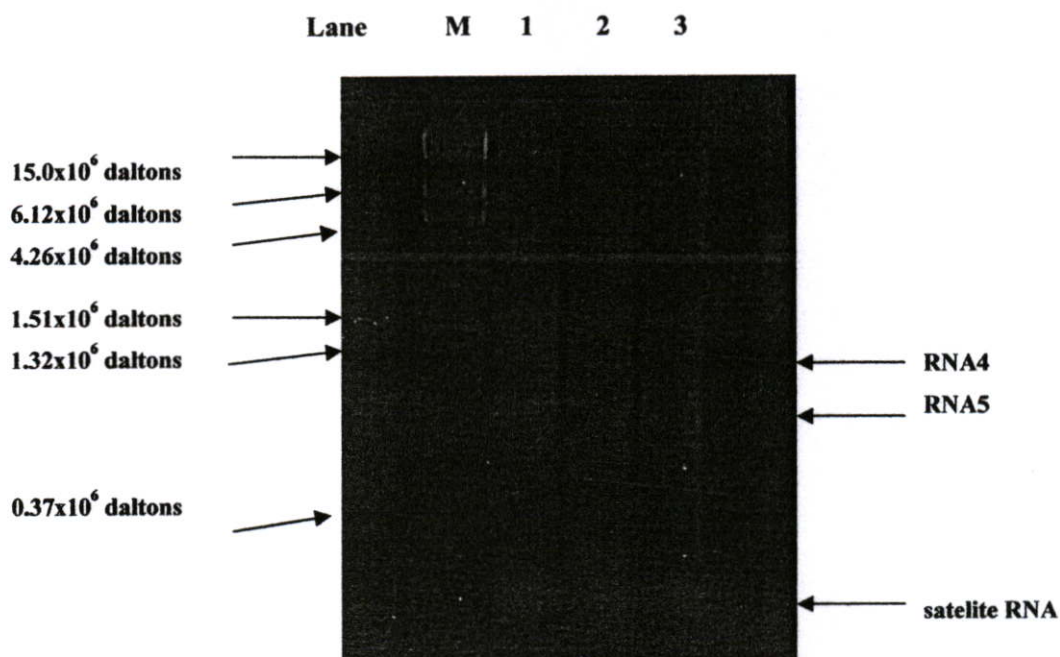
ผลการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก RT-PCR product (gel electrophoresis) ของอาการโรคไวรัส เพื่อทดสอบกลุ่ม potyvirus พบว่า RT-PCR product ของทั้ง 3 อาการมี genome size ประมาณ 1,200 bp ซึ่งขนาดของ genome size และความจำเพาะกับ primer ของ potyvirus group ทำให้สามารถจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus ดังแสดงในภาพที่ 4.13

## 4.3 การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ด (seed transmission)

ผลการศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ดโดยให้นำเมล็ดพันธุ์มาปลูกทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ไม่พบว่ามีโรคเกิดโรคเลยกับต้นอ่อนที่มีอายุ 1 เดือน

## 4.4 การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope)

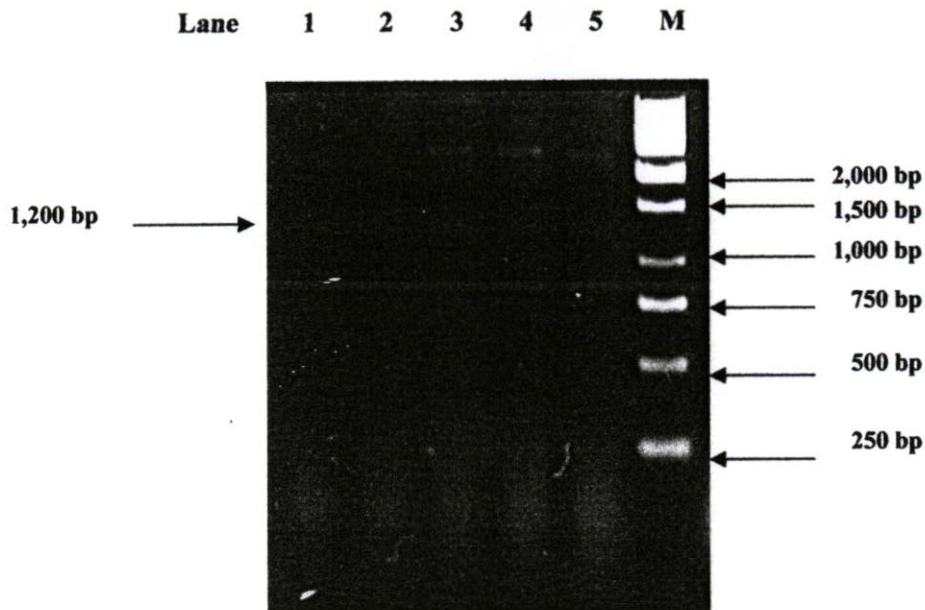
ผลการตรวจสอบอนุภาคของเชื้อไวรัสจากใบแพศชั้นฝรั่งที่แสดงอาการใบค่างเขียวเข้มและใบค่างเส้นใบเป็นแบบ vein banding พบว่าใบที่แสดงอาการค่างสีเขียวอ่อนตรวจพบลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสเป็นแบบ flexuous มีขนาดยาวเฉลี่ยประมาณ 756 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4.14a และ อาการใบค่างเส้นใบเป็นแบบ vein banding ตรวจพบลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสเป็นแบบ flexuous เหมือนกันซึ่งมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 529.14 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4.14b



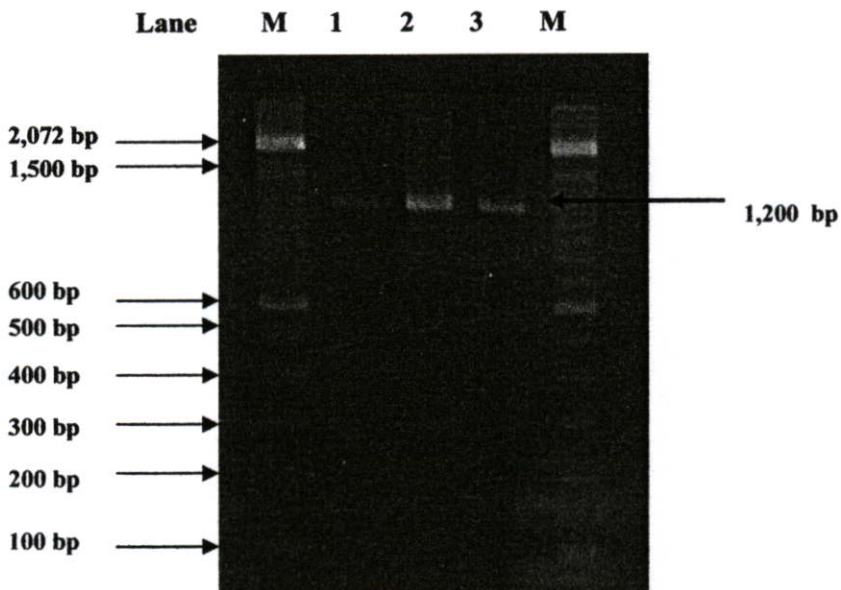
ภาพที่ 4.11 การตรวจสอบ dsRNA ของอาการตัวอย่างพืชชั้นฟรุ้ดที่แสดงอาการ โรคไวรัสประกอบด้วย 3 อาการคือ ใบด่างจุดเหลืองรุนแรง (1); ใบด่างสีเขียวเข้ม (2) และ ใบด่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding (3) ด้วยวิธี gel electrophoresis (agarose gel) ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ คือ คิวเปรียบเทียบ (lambda DNA Hind III double digest) (Lane M); อาการใบด่างจุดเหลืองรุนแรง (Lane1); อาการใบด่างสีเขียวเข้ม (Lane2) และ อาการใบด่างเส้นใบมีลักษณะ vein banding (Lane3)

ตารางที่ 4.3 น้ำหนักโมเลกุล dsRNA ของเชื้อไวรัสที่แสดงอาการ ใบด่างจุดเหลืองรุนแรง (1); ใบด่างสีเขียวเข้ม (2) และ ใบด่างเส้นใบมีลักษณะ vein banding (3); เปรียบเทียบกับตัวมาตรฐาน คือ lambda DNA Hind III double digest

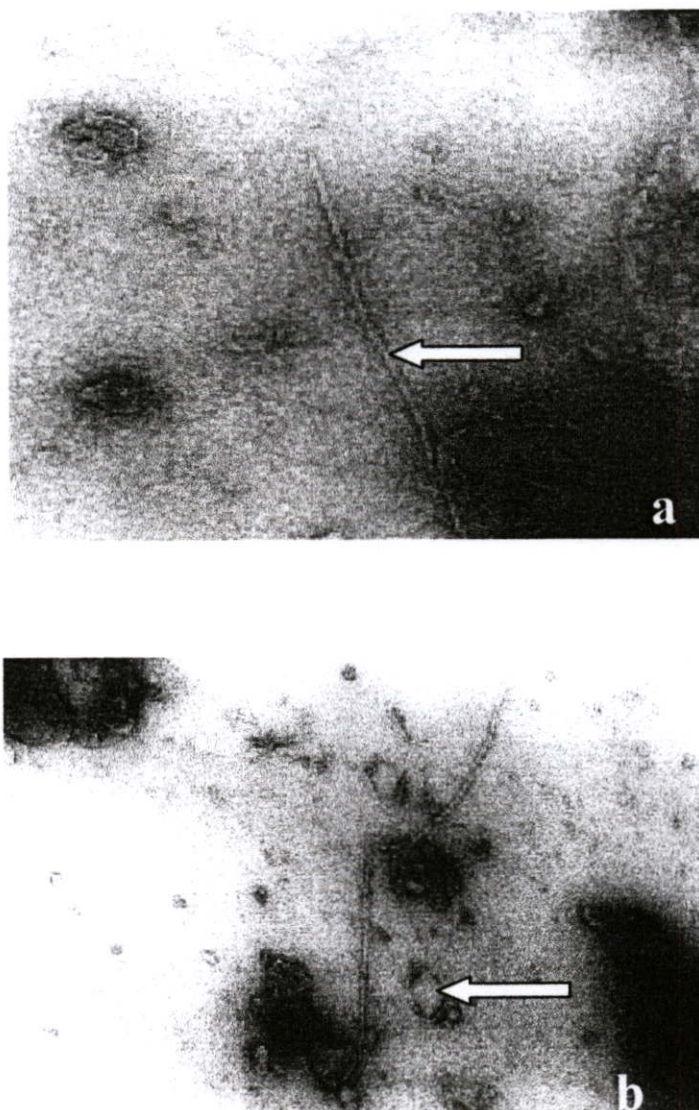
ชนิดของ ds RNA	ขนาดน้ำหนักโมเลกุล (daltons)					
	band ที่					
	1	2	3	4	5	6
lambda DNA Hind III	15.0x10 <sup>6</sup>	6.12x10 <sup>6</sup>	4.26x10 <sup>6</sup>	2.83x10 <sup>6</sup>	1.51x10 <sup>6</sup>	1.32x10 <sup>6</sup>
double digest						
CMV	3.2x10 <sup>6</sup>	2.8x10 <sup>6</sup>	2.4x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>6</sup>	0.8x10 <sup>6</sup>	-
ใบด่างจุดเหลือง	-	-	-	1.32x10 <sup>6</sup>	0.8x10 <sup>6</sup>	-
ใบด่างเขียวเข้ม	-	-	-	1.32x10 <sup>6</sup>	0.8x10 <sup>6</sup>	-
ใบด่างเส้นใบ vein banding	-	-	-	1.32x10 <sup>6</sup>	0.8x10 <sup>6</sup>	-



ภาพที่ 4.12 การใช้วิธี gel electrophoresis ตรวจสอบ temperature gradient PCR จำนวน 5 อุณหภูมิ จากแพตช์พันธุ์ที่แสดงอาการโรคไวรัสใบด่างเส้นใบมีลักษณะ vein banding 45 องศาเซลเซียส (Lane 1); 51.5 องศาเซลเซียส (Lane 2); 56.2 องศาเซลเซียส (Lane 3); 60.9 องศาเซลเซียส (Lane 4); 65 องศาเซลเซียส (Lane 5) และ DNA ladder 1 kb (Lane M)



ภาพที่ 4.13 การใช้วิธี gel electrophoresis ตรวจสอบ Reverse transcription – polymerase chain reaction (RT – PCR) ของเชื้อกลุ่ม potyvirus จากแพตช์พันธุ์ที่แสดงอาการโรคไวรัสที่เก็บรวบรวมจากแปลงปลูกของเกษตรกรประกอบด้วย 3 อาการคือ ใบด่างจุดเหลืองรุนแรง (Lane 1); ใบด่างสีเขียวเข้ม (Lane 2) และ ใบด่างเส้นใบมีลักษณะ vein banding (Lane 3) และ DNA ladder 100 bp (Lane M)



ภาพที่4.14 ลักษณะของอนุภาคของเชื้อไวรัสจากน้ำคั้นแพสชันฟรุต อาการใบค่างเขียวเข้ม ตรวจพบอนุภาคมีลักษณะยาวคดงอ (flexuous rod) ความยาว 756 นาโนเมตร (ตามลูกศรชี้) (a); โคยวีธี leaf dip ที่กำลังขยาย 48,000 และ อาการใบค่างเส้นใบเป็นแบบ vein banding ตรวจพบอนุภาคมีลักษณะยาวคดงอ (flexuous rod) ความยาว 529.14 นาโนเมตร (ตามลูกศรชี้) (b) โคยวีธี leaf dip ที่กำลังขยาย 48,000

#### 4.5 การประเมินเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคของ แพลนช์นฟรุต เมื่อใช้วิธีการแบบผสมผสาน และการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวในการ ป้องกันกำจัดโรคไวรัส

ผลการประเมินระดับความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัส ใน 3 แหล่ง สภาพพื้นที่เพาะปลูก คือ แปลงปลูกเชิงเขา แปลงปลูกบนภูเขา และแปลงปลูกบนพื้นที่ราบ พบว่า ในแต่ละพื้นที่ การใช้วิธีการแบบผสมผสาน และการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว มีระดับความรุนแรง และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสมีความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยพื้นที่ 2 แหล่งจาก 3 แหล่ง ที่ ทดสอบการใช้วิธีการผสมผสานพบระดับความรุนแรงของโรคต่ำที่สุด รองลงมาคือการใช้สารเคมี เพียงอย่างเดียว และพบระดับความรุนแรงในการเกิดโรคสูงที่สุดในแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติ เช่น เดียวกับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรค พบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสานช่วยชะลอในการเกิดโรคได้ดีที่ สุด รองลงมาคือการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบการเกิดโรคสูงที่สุด

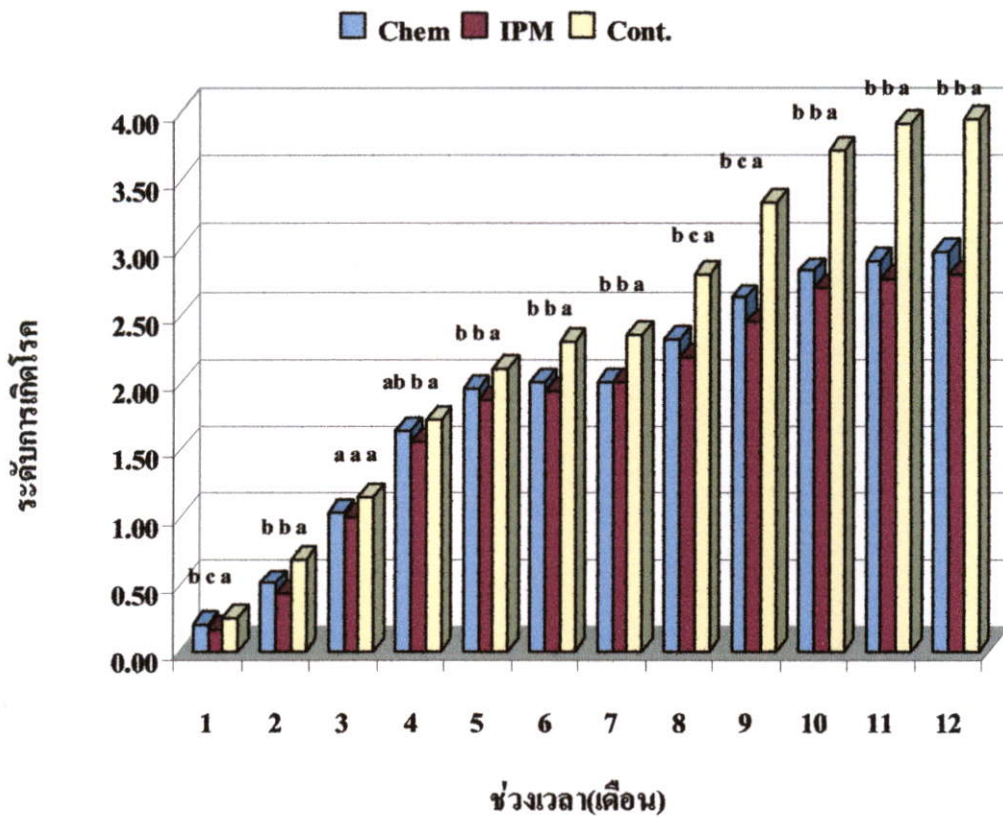
ในแปลงปลูกเชิงเขา ระดับความรุนแรงของโรคไวรัส พบว่าส่วนใหญ่การใช้วิธีการแบบ ผสมผสาน และการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว มีระดับความรุนแรงของโรคที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งไม่มี ความแตกต่างกันในทางสถิติ แต่จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับแปลงที่ปลูก ตามธรรมชาติซึ่งพบระดับความรุนแรงของโรคสูงที่สุดดังแสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสโดยใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้ สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกเชิงเขา

วิธีการ	ระดับความรุนแรงของโรคไวรัสในแต่ละเดือน <sup>1/</sup>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Chem.</b>	0.20b <sup>2/</sup>	0.50b	1.02a	1.63ab	1.95ab	2.00b	2.00b	2.32b	2.62b	2.82b	2.90b	2.96b
<b>IPM</b>	0.16c	0.43b	0.99a	1.55b	1.87b	1.94b	2.00b	2.18c	2.44c	2.70b	2.76b	2.80b
<b>Cont.</b>	0.24a	0.68a	1.14a	1.72a	2.10a	2.30a	2.35a	2.80a	3.32a	3.70a	3.90a	3.94a

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 50 ต้น

2/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อ ทดสอบโดยวิธี Duncan's new multiple range test



ภาพที่ 4.15 เปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกเชิงเขา



ในเดือนที่ 11 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีระดับความรุนแรงของโรคไม่มีความแตกต่างกัน ในทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวคือ 2.76 และ 2.90 แต่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญซึ่งทางสถิติกับแปลงปลูกตามธรรมชาติซึ่งมีระดับความรุนแรงของโรคเท่ากับ 3.90

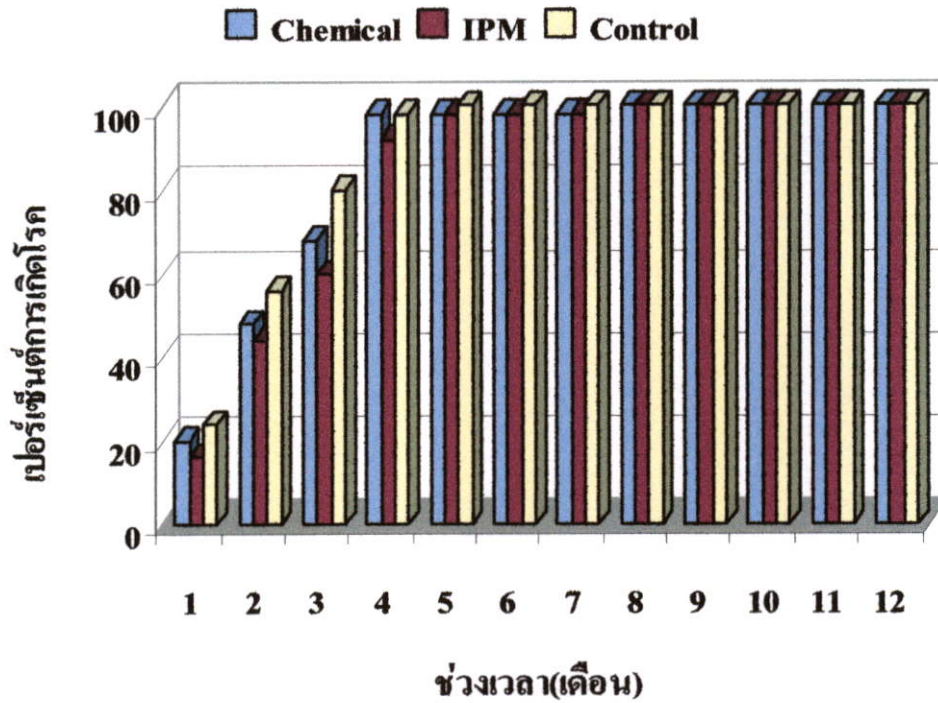
ในเดือนที่ 12 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีระดับความรุนแรงของโรคไม่มีความแตกต่างกัน ในทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวคือ 2.80 และ 2.96 แต่จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญซึ่งทางสถิติกับแปลงปลูกตามธรรมชาติซึ่งมีระดับความรุนแรงของโรคเท่ากับ 3.94

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสในแปลงปลูกเชิงเขา พบว่าการเกิดโรคไวรัสในการใช้วิธีการแบบผสมผสานและ การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวมีเปอร์เซ็นต์การชะลอช่ระยะเวลาในการเกิดโรคไวรัสที่ 100 เปอร์เซ็นต์ได้ใกล้เคียงกันคือ 7 เดือน ในขณะที่แปลงปลูกตามธรรมชาติสามารถช่ระยะเวลาในการเกิดโรคได้เพียงแค่ 4 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกเชิงเขา

วิธีการ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสในแต่ละเดือน <sup>1</sup>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Chem.	20	48	68	98	98	98	98	100	100	100	100	100
IPM	16	44	60	92	98	98	98	100	100	100	100	100
Cont.	24	56	80	98	100	100	100	100	100	100	100	100

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 50 ต้น



ภาพที่4.16 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสแสดงด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสานการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกเชิงเขา

ในเดือนที่ 1 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรคต่ำที่สุด 16 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวมีการเกิดโรค 20 เปอร์เซ็นต์ และแปลงปลูกตามธรรมชาติมีการเกิดโรคสูงที่สุดคือ 24 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 2 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรคต่ำที่สุด 44 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวมีการเกิดโรค 48 เปอร์เซ็นต์ และแปลงปลูกตามธรรมชาติมีการเกิดโรคสูงที่สุดคือ 56 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 3 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรคต่ำที่สุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์รองลงมาคือ การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวมีการเกิดโรค 68 เปอร์เซ็นต์ และแปลงปลูกตามธรรมชาติมีการเกิดโรคสูงที่สุดคือ 80 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 4 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรค 92 เปอร์เซ็นต์ การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบมีการเกิดโรคเท่ากันคือ 98 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 5 เดือนที่ 6 และ เดือนที่ 7 การใช้วิธีการแบบผสมผสานและการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวมีการเกิดโรค 98 เปอร์เซ็นต์ และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบมีการเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 8 ถึง เดือนที่ 12 พบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบมีการเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์

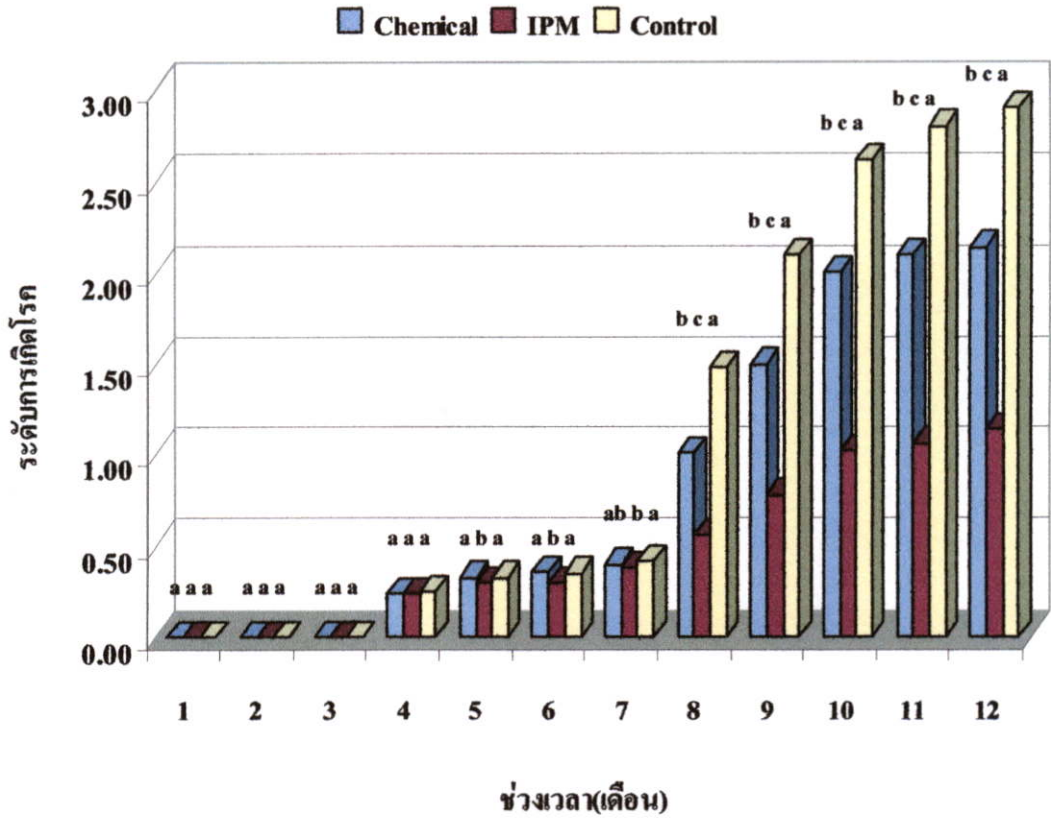
ในแปลงปลูกบนภูเขา ระดับความรุนแรงของโรคไวรัส พบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสานมีระดับการเกิดโรคต่ำที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา

วิธีการ	ระดับความรุนแรงของโรคไวรัส ในแต่ละเดือน <sup>1/</sup>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Chem.	0a <sup>2/</sup>	0a	0a	0.24a	0.33a	0.36a	0.40ab	1.04b	1.50b	2.00b	2.10b	2.14b
IPM	0a	0a	0a	0.24a	0.30b	0.30b	0.38b	0.56c	0.78c	1.02c	1.06c	1.14c
Cont.	0a	0a	0a	0.25a	0.33a	0.35a	0.42a	1.48a	2.10a	2.62a	2.80a	2.90a

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 50 ต้น

2/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวดิ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อทดสอบโดยวิธี Duncan's new multiple range test



ภาพที่ 4.17 แสดงการเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวและแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา

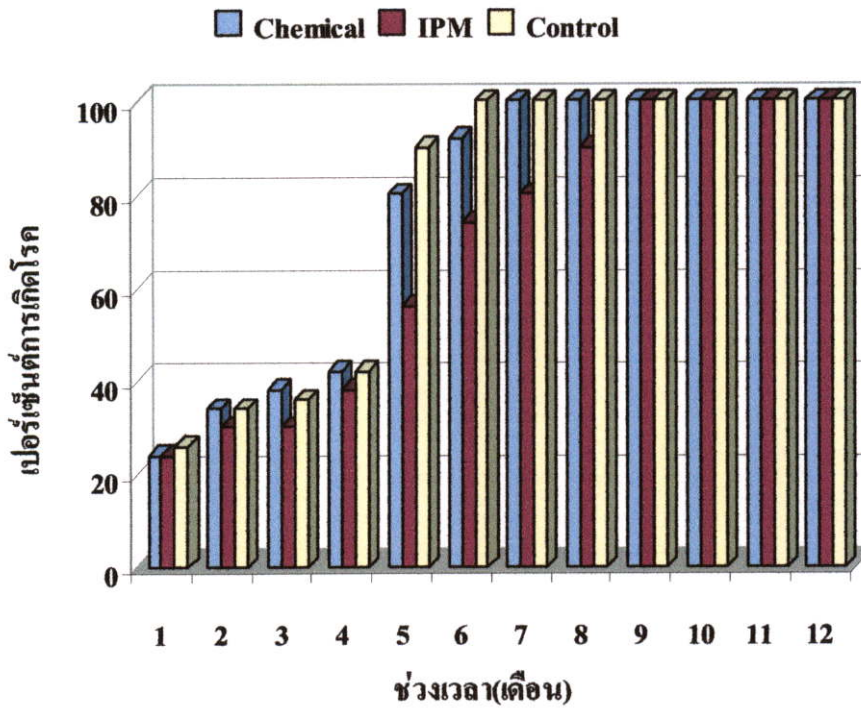


แปลงปลูกตามธรรมชาติสามารถยื้อระยะเวลาในการเกิดโรคได้เพียงแค่ 5 เดือนเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา

วิธีการ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัส <sup>1/</sup>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Chem.</b>	24	34	38	42	80	92	100	100	100	100	100	100
<b>IPM</b>	24	30	30	38	56	74	80	90	100	100	100	100
<b>Cont.</b>	26	34	36	42	90	100	100	100	100	100	100	100

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 50 ต้น



ภาพที่ 4.18 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา

ในเดือนที่ 1 การใช้วิธีการแบบผสมผสาน และการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวมีการเกิดโรค 24 เปอร์เซ็นต์ และแปลงปลูกตามธรรมชาติมีการเกิดโรคเท่ากับ 26 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 2 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรคต่ำที่สุด 30 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติมีการเกิดโรคเท่ากันคือ 34 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 3 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรคต่ำที่สุดคือ 30 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือแปลงปลูกตามธรรมชาติ 36 เปอร์เซ็นต์ และการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวมีการเกิดโรคเท่ากับ 38 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 4 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรค 38 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบมีการเกิดโรคเท่ากันคือ 42 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 5 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรค 56 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวพบ 80 เปอร์เซ็นต์ และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบมีการเกิดโรคเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 6 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรค 74 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวพบ 92 เปอร์เซ็นต์ และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบมีการเกิดโรคเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 7 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรค 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบมีการเกิดโรคเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 8 การใช้วิธีการแบบผสมผสานมีการเกิดโรค 90 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบมีการเกิดโรคเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ในเดือนที่ 9 ถึง 12 พบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบมีการเกิดโรค 100 เปอร์เซ็นต์

ในแปลงปลูกบนพื้นที่ราบ ระดับความรุนแรงของโรคไวรัส พบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสาน มีระดับการเกิดโรคต่ำที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งพบระดับความรุนแรงของโรคสูงที่สุดดังแสดงในตารางที่ 4.8

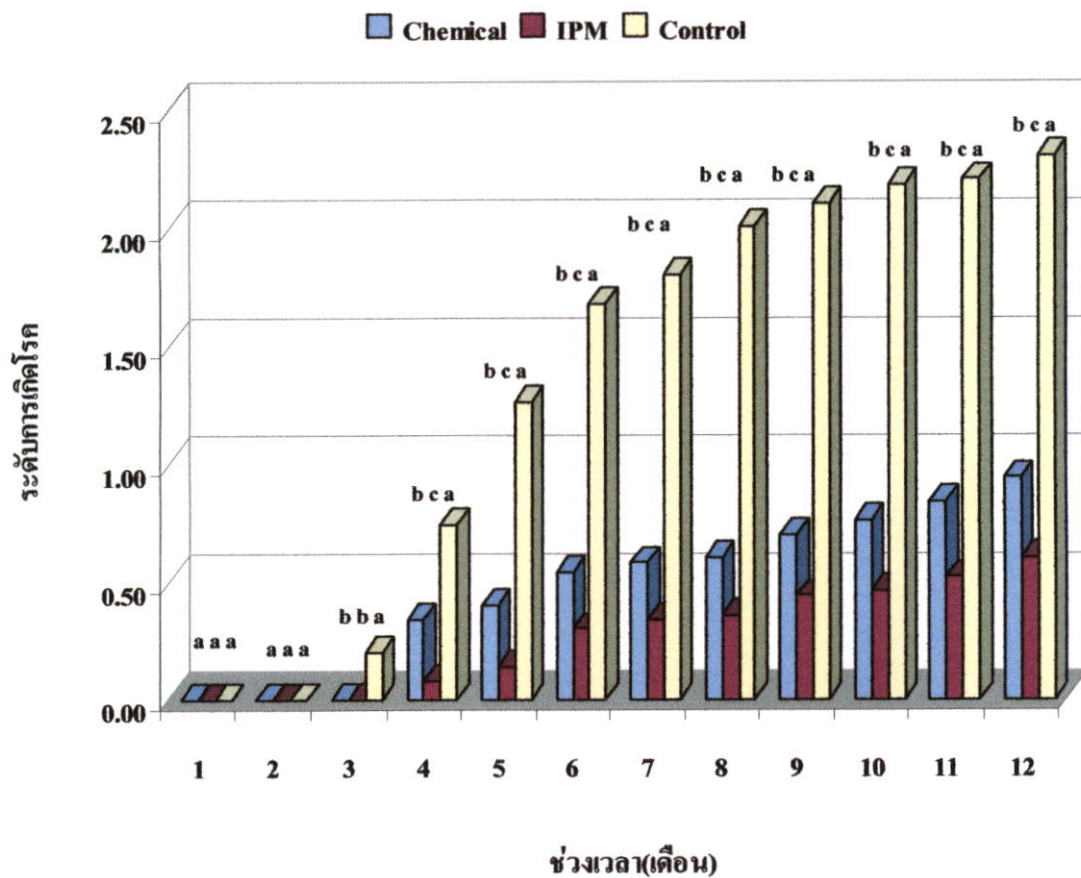
**ตารางที่ 4.8** แสดงการเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนที่ราบ

วิธีการ	ระดับความรุนแรงของโรคไวรัส <sup>1/</sup>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>Chem.</b>	0a <sup>2/</sup>	0a	0b	0.34b	0.40b	0.54b	0.58b	0.60b	0.70b	0.76b	0.84b	0.94b
<b>IPM</b>	0a	0a	0b	0.08c	0.14c	0.30c	0.34c	0.36c	0.44c	0.46c	0.52c	0.60c
<b>Cont.</b>	0a	0a	0.20a	0.74a	1.26a	1.68a	1.80a	2.00a	2.10a	2.18a	2.20a	2.30a

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 50 ต้น

2/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันตามแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเชิงทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อทดสอบ

โดยวิธี Duncan's new multiple range test



ภาพที่ 4.19 แสดงการเปรียบเทียบระดับความรุนแรงของโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนที่ราบ

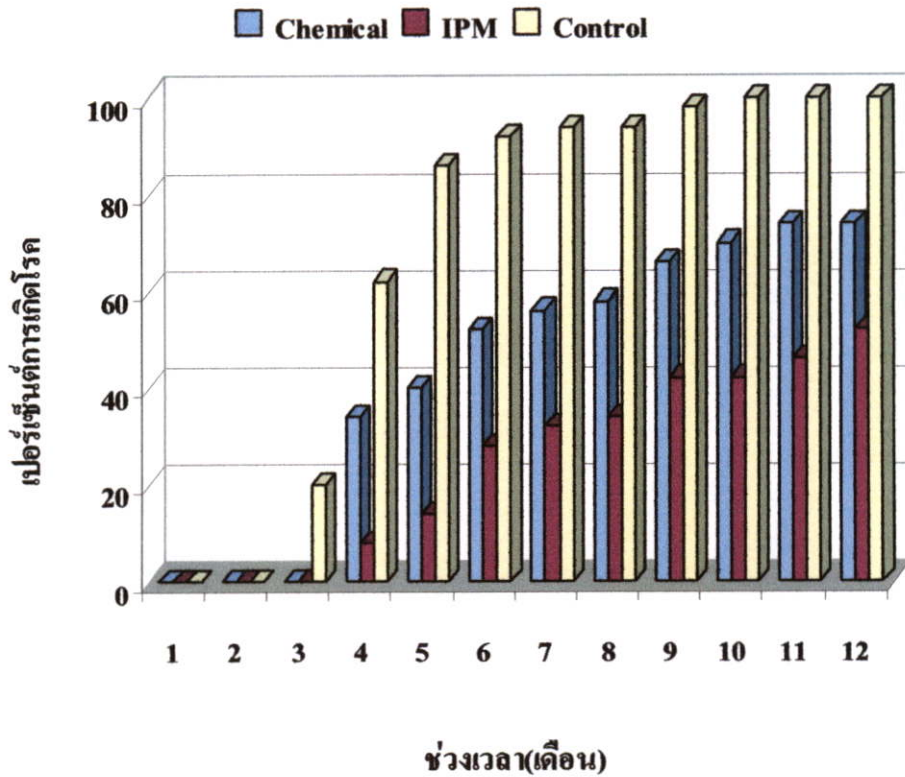


ที่สุดเกิน 12 เดือน ในขณะที่แปลงปลูกตามธรรมชาติสามารถยืระยะเวลาในการเกิดโรคได้เพียง  
แค่ 9 เดือนเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน  
การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา

วิธีการ	เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัส <sup>1/</sup>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Chem.	0	0	0	34	40	52	56	58	66	70	74	74
IPM	0	0	0	8	14	28	32	34	42	42	46	52
Cont.	0	0	20	62	86	92	94	94	98	100	100	100

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 50 ต้น



ภาพที่ 4.20 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสด้วยวิธีการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติในพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา



สำหรับระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยต่อปีของทั้ง 3 วิธีการใน 3 สภาพพื้นที่แปลงทดลอง พบว่าวิธีการผสมผสานมีระดับความรุนแรงของโรคต่ำที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติคือ มีระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยเท่ากับ 0.85 1.07 และ 1.60 ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 4.21

เปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยต่อปีของทั้ง 3 วิธีการใน 3 สภาพพื้นที่แปลงทดลอง พบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสานมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยต่ำที่สุดคือ 58.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียวซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ย 67.94 เปอร์เซ็นต์ และแปลงปลูกตามธรรมชาติมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยสูงที่สุดคือ 78.61 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในภาพที่ 4.22

เมื่อแพสชันฟรุ้ตให้ผลผลิตก็เก็บผลผลิตที่ได้ในแต่ละวิธีการใน 3 สภาพพื้นที่การทดลอง มาบันทึกข้อมูลจำนวนน้ำหนักของผลผลิตที่ได้ในระยะเวลา 3 เดือนหลังจากการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งพบว่าในทุกพื้นที่แปลงทดลองผลผลิตที่ได้รับมีความแตกต่างกันในทางสถิติดังแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 แสดงน้ำหนักผลผลิตของแปลงที่ใช้การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานเปรียบเทียบกับ การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ

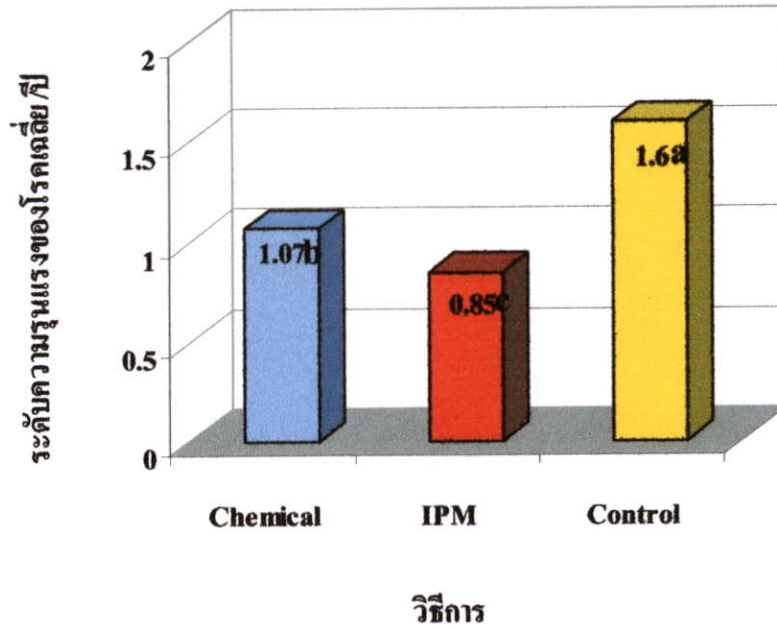
เดือน	น้ำหนักผลผลิต(กิโลกรัม) <sup>1/</sup>								
	แปลงปลูกเชิงเขา			แปลงปลูกบนภูเขา			แปลงปลูกบนที่ราบ		
	Chem.	IPM	Cont.	Chem.	IPM	Cont.	Chem.	IPM	Cont.
1	17.33 <sup>2/</sup> b	23.33a	9.33c	12.66b	17.33a	6.33c	34.00b	50.66a	16.00c
2	21.00 b	31.00a	6.00c	14.33b	34.00a	8.33c	111.33b	166.66a	51.66c
3	ns	ns	ns	4.66b	12.00a	2.66c	206.66b	458.66a	93.66c
รวม	38.33	54.33	15.33	31.65	63.33	17.32	351.99	675.98	161.32
เฉลี่ย	19.16b	27.16a	7.66c	10.55b	21.11a	5.77c	117.33b	225.32a	53.77c

1/ น้ำหนักเฉลี่ยจากการเก็บผลผลิตในระยะเวลา 1 เดือน

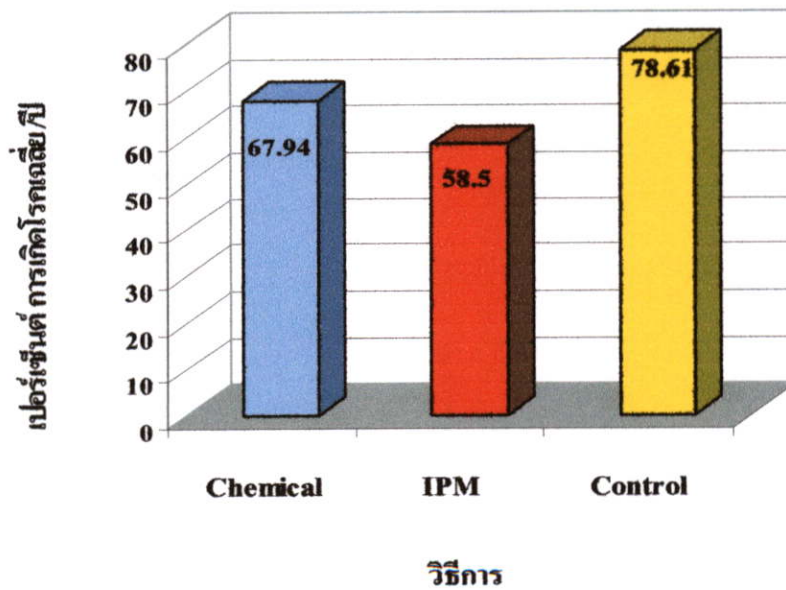
2/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรต่างกันตามแนวนอนในแต่ละแปลง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

( $P \leq 0.05$ ) เมื่อทดสอบโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ns ไม่สามารถเก็บข้อมูลได้เพราะแพสชันฟรุ้ตไม่มีผลผลิต



ภาพที่ 4.21 แสดงการเปรียบเทียบระดับการเกิดโรคเฉลี่ยต่อปีในการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ



ภาพที่ 4.22 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยต่อปีในการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ

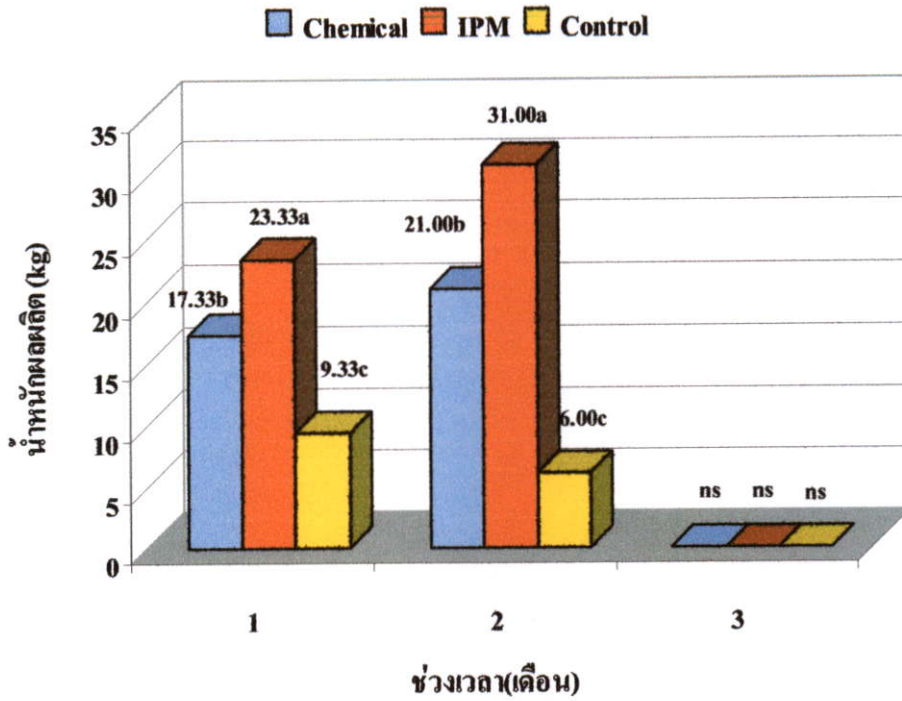
สำหรับพื้นที่แปลงปลูกที่เชิงเขา พบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสานได้รับผลผลิตเฉลี่ยสูงสุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติดังแสดงในภาพที่4.23

ในเดือนที่ 1 การใช้วิธีการแบบผสมผสานได้รับผลผลิตสูงสุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ คือ ได้รับน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 23.33, 17.33 และ 9.33 กิโลกรัม ตามลำดับ

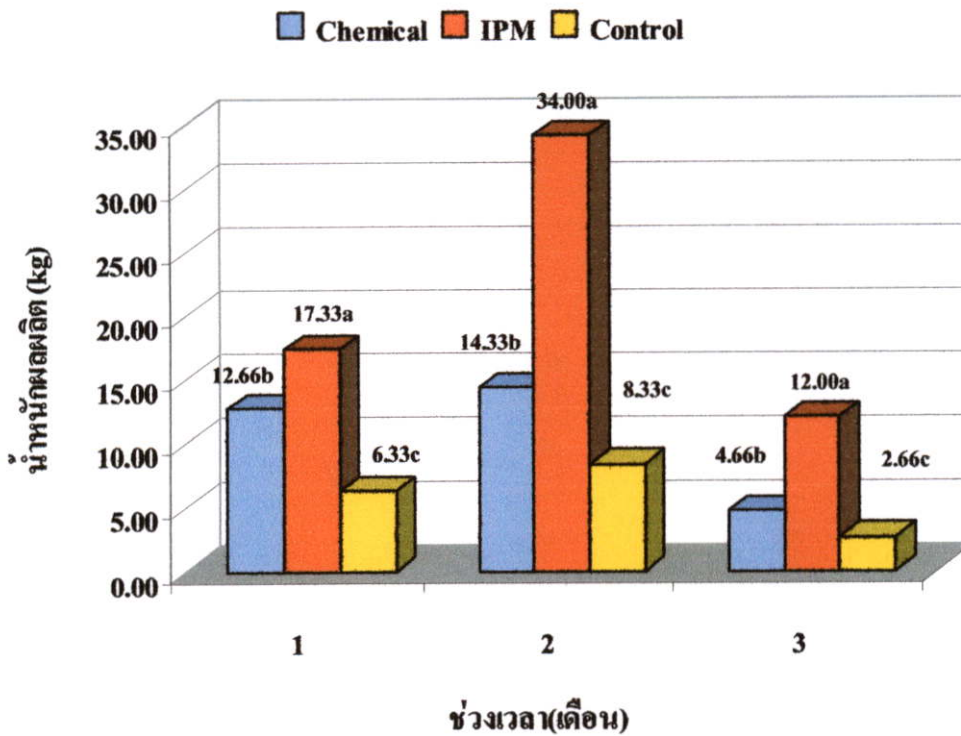
ในเดือนที่ 2 การใช้วิธีการแบบผสมผสานได้รับผลผลิตสูงสุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ กับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ คือ ได้รับน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 31.00, 21.00 และ 6.00 กิโลกรัม ตามลำดับ

ในเดือนที่ 3 ไม่มีผลผลิตเลยไม่สามารถเก็บบันทึกผลน้ำหนักได้

สำหรับพื้นที่แปลงปลูกบนภูเขาที่พบว่า การใช้วิธีการผสมผสานได้รับผลผลิตสูงสุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ ดังแสดงในภาพที่4.24



ภาพที่ 4.23 แสดงน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยของพืชชั้นฟรุ้ดในช่วง 3 เดือนที่เก็บเกี่ยวผลผลิตในพื้นที่แปลงปลูกที่เชิงเขา



ภาพที่ 4.24 แสดงน้ำหนักผลผลิตของพืชชั้นฟรุ้ดด้วยการใช้การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสานเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติในแปลงปลูกบนภูเขา

ในเดือนที่ 1 การใช้วิธีการแบบผสมผสานได้รับผลผลิตสูงที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติก็ได้รับน้ำหนักรวมผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 17.33, 12.66 และ 6.33 กิโลกรัม ตามลำดับ

ในเดือนที่ 2 การใช้วิธีการแบบผสมผสานได้รับผลผลิตสูงที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติก็ได้รับน้ำหนักรวมผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 34.00, 14.33 และ 8.33 กิโลกรัม ตามลำดับ

ในเดือนที่ 3 การใช้วิธีการแบบผสมผสานได้รับผลผลิตสูงที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติก็ได้รับน้ำหนักรวมผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 12.00, 4.66 และ 2.66 กิโลกรัม ตามลำดับ

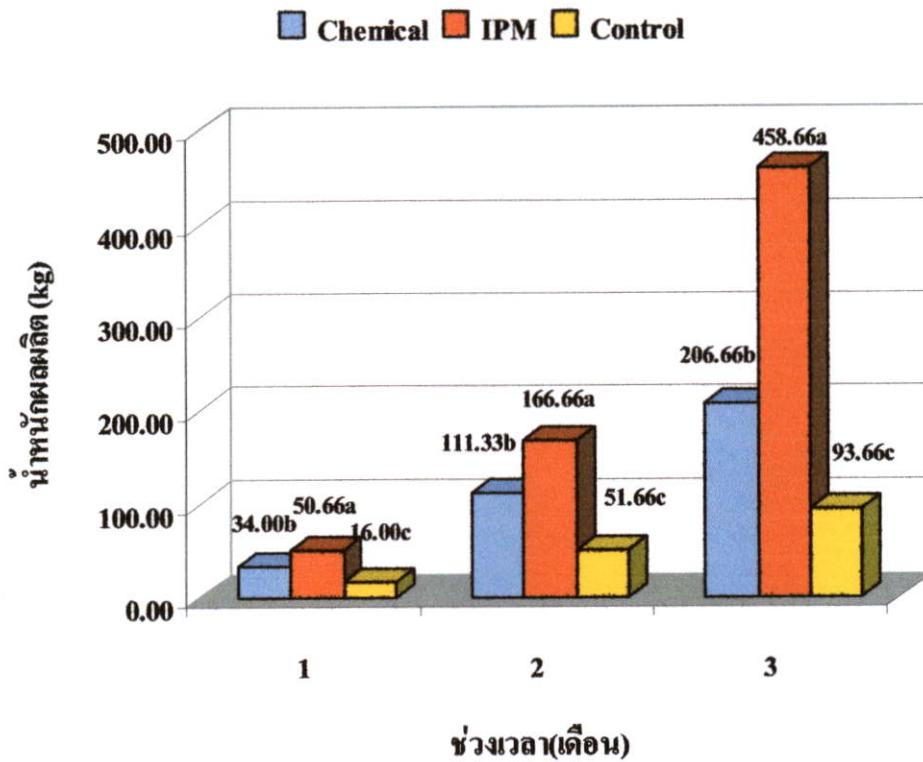
สำหรับพื้นที่แปลงปลูกบนพื้นที่ราบ พบว่าการใช้วิธีการผสมผสานได้รับผลผลิตสูงที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติดังแสดงในภาพที่ 4.25

ในเดือนที่ 1 การใช้วิธีการแบบผสมผสานได้รับผลผลิตสูงที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติก็ได้รับน้ำหนักรวมผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 50.66, 34.00 และ 16.00 กิโลกรัม ตามลำดับ

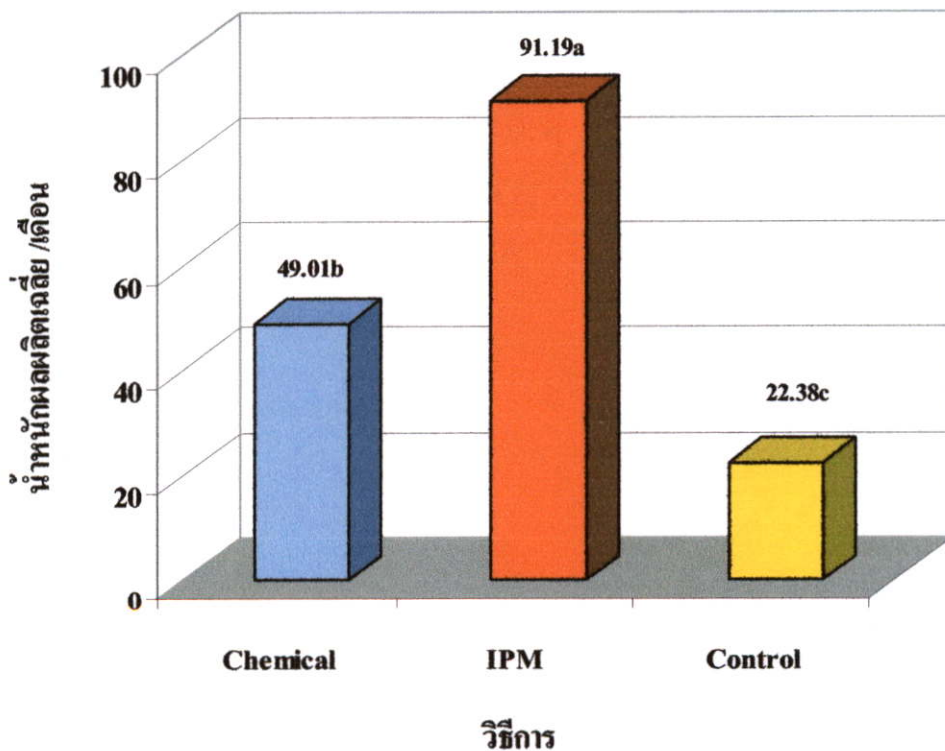
ในเดือนที่ 2 การใช้วิธีการแบบผสมผสานได้รับผลผลิตสูงที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติก็ได้รับน้ำหนักรวมผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 166.66, 111.33 และ 51.66 กิโลกรัม ตามลำดับ

ในเดือนที่ 3 การใช้วิธีการแบบผสมผสานได้รับผลผลิตสูงที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติก็ได้รับน้ำหนักรวมผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 458.66, 206.66 และ 93.66 กิโลกรัม ตามลำดับ

น้ำหนักรวมผลผลิตที่ได้รับเฉลี่ย 3 เดือนเปรียบเทียบกันของ 3 วิธีการใน 3 สภาพพื้นที่แปลงทดลอง พบว่าการใช้วิธีการผสมผสานได้รับน้ำหนักรวมผลผลิตเฉลี่ยสูงที่สุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติก็ได้รับน้ำหนักรวมผลผลิตเฉลี่ย 91.19, 49.01 และ 22.38 กิโลกรัม ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 4.26



ภาพที่4.25 แสดงน้ำหนักผลผลิตของแพสชันฟรุตด้วยการใช้การจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน เปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติในแปลงปลูกบนพื้นที่ราบ



ภาพที่4.26 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยต่อเดือนในการใช้วิธีการแบบผสมผสาน การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติ

#### 4.6 ตำรวจชนิดและจำนวนของแมลงพาหะ

ผลการตรวจนับจำนวนแมลงที่ติดอยู่บนกับดักกาวเหนียวจำนวน 7 เดือน ตั้งแต่ย้ายต้นลงในแปลงปลูกเมื่อมีอายุ 2 เดือนจนกระทั่งเริ่มให้ผลผลิต พบว่าในวิธีการที่ใช้วิธีการแบบผสมผสานมีแมลง 2 ชนิด คือ ค้างค่อม และเพลี้ยอ่อน สำหรับเพลี้ยอ่อนที่พบประกอบด้วย เพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* และ *Aphis gossypii* โดยปริมาณที่พบมีความแตกต่างกันซึ่งจะพบปริมาณเพลี้ยอ่อน และ ค้างค่อมเฉลี่ยในปริมาณที่สูง ในช่วงเดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคมในทุกพื้นที่การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 ผลการสำรวจตรวจนับชนิด และจำนวนของแมลงที่ติดกับกับดักกาวเหนียวในวิธีการที่ใช้วิธีการจัดการศัตรูพืชแบบผสมผสาน

เดือน	ชนิดของแมลง <sup>1/</sup>					
	เพลี้ยอ่อน			ค้างค่อม		
	แปลงปลูก เชิงเขา	แปลงปลูก บนภูเขา	แปลงปลูก บนที่ราบ	แปลงปลูก เชิงเขา	แปลงปลูก บนภูเขา	แปลงปลูก บนที่ราบ
ก.ย	11.45a <sup>2/</sup>	4.00a	15.00a	5.50a	2.00a	2.00b
ต.ค	8.20ab	3.00ab	8.20ab	4.00a	1.50ab	2.00b
พ.ย	9.00ab	2.00b	5.50b	2.50ab	1.00b	4.00a
ธ.ค	5.55b	0c	0c	1.00c	1.20ab	0c
ม.ค	0c	0c	0c	2.00b	0c	0c
ก.พ	0c	2.00b	0c	2.00b	2.00a	0c
มี.ค	5.50b	2.50b	4.00b	2.50ab	2.00a	2.50ab
รวม	39.70	13.50	32.70	19.50	9.70	10.50
เฉลี่ย	5.67	1.92	4.67	2.78	1.38	1.50

1/ คือ ค่าเฉลี่ยจากการตรวจนับแมลงที่ติดอยู่บนกับดักกาวเหนียวจำนวน 15 แผ่น

2/ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) เมื่อทดสอบโดยวิธี Duncan's new multiple range test

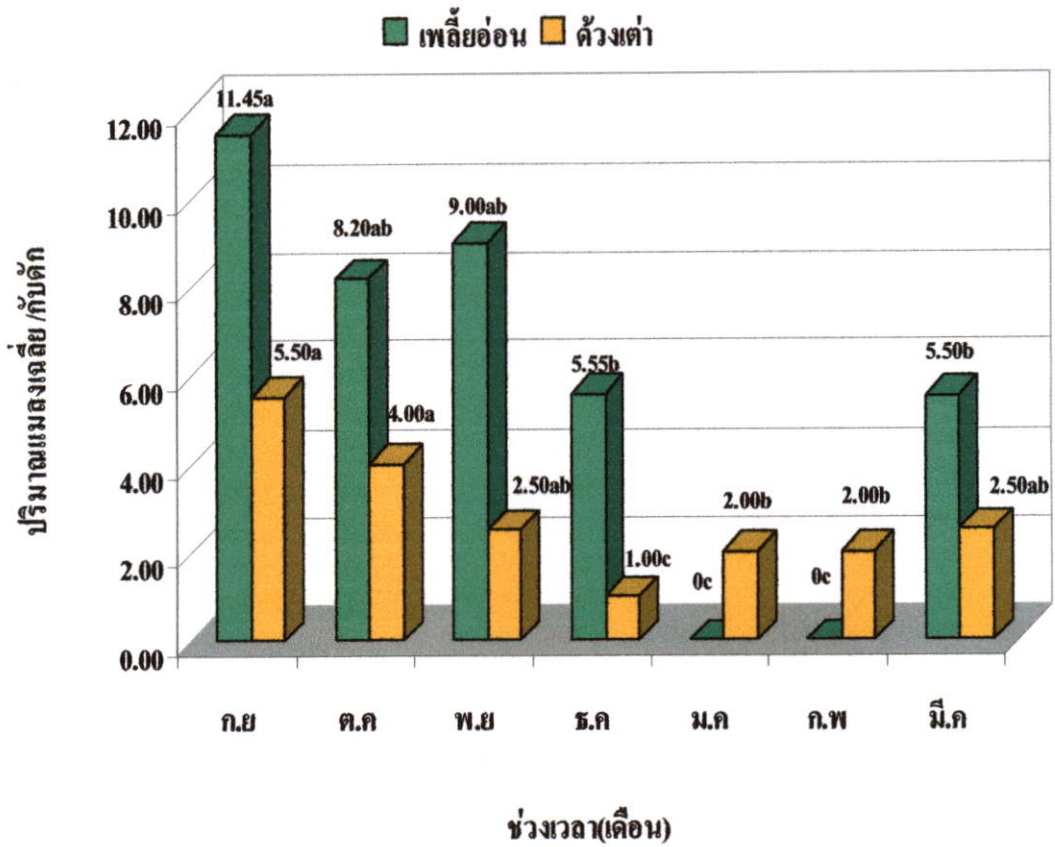
พื้นที่แปลงปลูกเชิงเขา ดังแสดงในภาพที่ 4.27 ตรวจพบปริมาณเพลี้ยอ่อน และค้างค่อมมีความหนาแน่นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกันในแต่ละเดือน ซึ่งพบว่าในเดือนกันยายนพบมีความหนาแน่นสูงที่สุด 11.45 ตัว/กับดัก รองลงมาคือเดือนพฤศจิกายน 9.00 ตัว/กับดัก เดือนตุลาคม 8.20 ตัว/กับดัก ธันวาคม 5.55 ตัว/กับดัก มีนาคม 5.50 ตัว/กับดัก และไม่พบว่ามีเพลี้ยอ่อนเลย

✓  
 ในเดือนมกราคมและ กุมภาพันธ์ สำหรับด้วงเต่าพบว่าในเดือนกันยายนพบมีปริมาณความหนาแน่น  
 สูงที่สุด 5.50 ตัว/กับดัก รองลงมาคือเดือนตุลาคม 4.00 ตัว/กับดัก พฤศจิกายนและ มีนาคม 2.50 ตัว/กับ  
 ดัก มกราคมและ กุมภาพันธ์ 2.00 ตัว/กับดักและ พบว่ามีปริมาณต่ำสุดในเดือนธันวาคม 1.00 ตัว/กับดัก

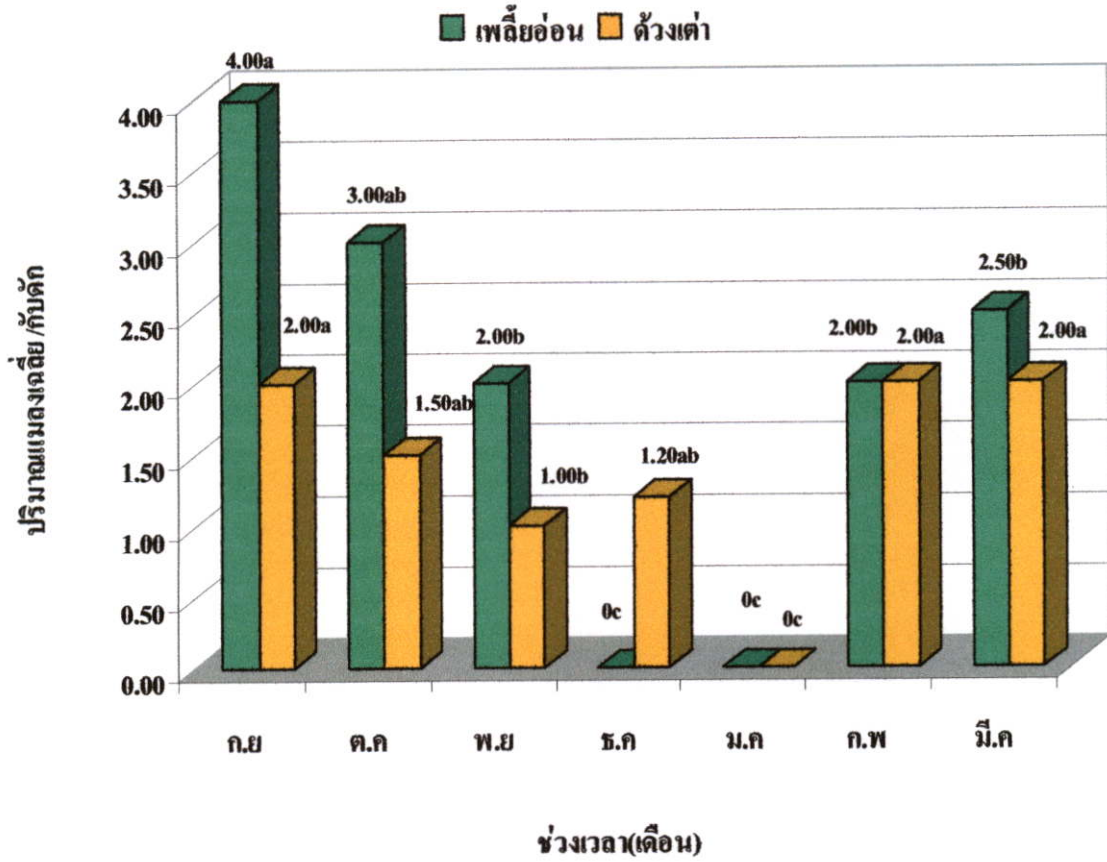
✓  
 พื้นที่แปลงปลูกบนภูเขา ดังแสดงในภาพที่4.28 ตรวจสอบปริมาณเพลี้ยอ่อน และด้วงเต่ามีความ  
 หนาแน่นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกันในแต่ละเดือน ซึ่งพบว่าในเดือนกันยายนพบมีความ  
 หนาแน่นสูงที่สุด 4.00 ตัว/กับดัก รองลงมาคือเดือนตุลาคม 3.00 ตัว/กับดัก มีนาคม 2.50 ตัว/กับดัก  
 พฤศจิกายนและ กุมภาพันธ์ 2.00 ตัว/กับดัก 5.55 และไม่พบว่ามีเพลี้ยอ่อนเลยในเดือนธันวาคม และ  
 มกราคม สำหรับด้วงเต่าพบว่าในเดือนกันยายน กุมภาพันธ์ มีนาคม พบมีปริมาณความหนาแน่นสูง  
 ที่สุด 2.00 ตัว/กับดัก รองลงมาคือเดือนตุลาคม 4.00 ตัว/กับดัก ธันวาคม และพฤศจิกายนพบ 1.50, 1.20  
 และ 1.00 ตัว/กับดัก ตามลำดับ และไม่พบด้วงเต่าเลยในเดือนมกราคม

พื้นที่แปลงปลูกบนพื้นที่ราบ ดังแสดงในภาพที่4.29 ตรวจสอบปริมาณเพลี้ยอ่อน และด้วงเต่ามี  
 ความหนาแน่นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกันในแต่ละเดือน ซึ่งพบว่าในเดือนกันยายนพบมี  
 ความหนาแน่นสูงที่สุด 15.00 ตัว/กับดัก รองลงมาคือเดือนตุลาคม 8.20 ตัว/กับดัก พฤศจิกายน 5.50  
 ตัว/กับดัก มีนาคม 4.00 ตัว/กับดัก และไม่พบว่ามีเพลี้ยอ่อนเลยในเดือนธันวาคม เดือนมกราคม และ  
 กุมภาพันธ์ สำหรับด้วงเต่าพบว่าในเดือนพฤศจิกายนมีปริมาณความหนาแน่นสูงที่สุด 4.00 ตัว/กับดัก  
 รองลงมาคือเดือนมีนาคม กันยายน และตุลาคมพบ 2.50, 2.00 และ 2.00 ตัว/กับดัก ตามลำดับ และไม่  
 พบด้วงเต่าเลยในเดือนธันวาคม มกราคม และกุมภาพันธ์

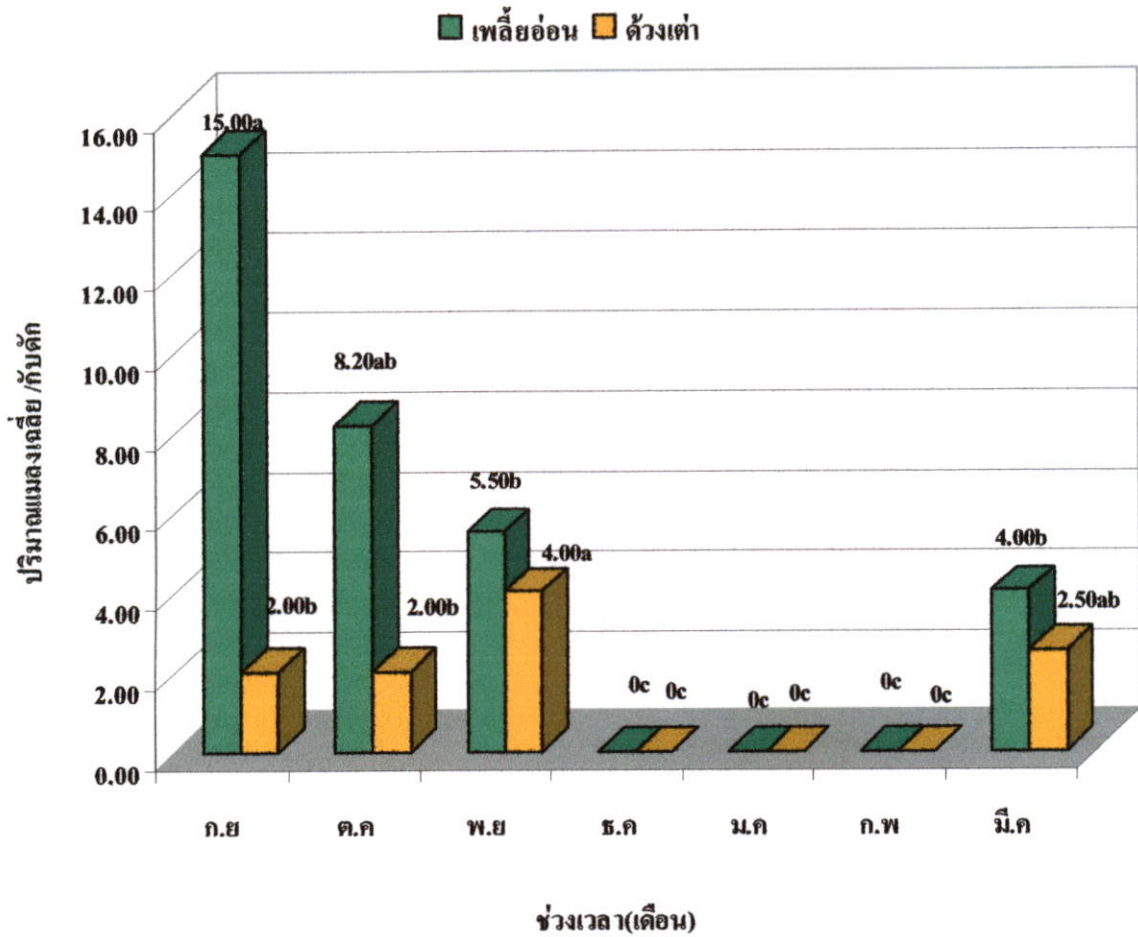
สำหรับปริมาณแมลงเฉลี่ยทั้งปีในการใช้วิธีการแบบผสมผสานในทุกพื้นที่แปลงปลูก (แปลงปลูก  
 เจริงเขา แปลงปลูกบนภูเขา และแปลงปลูกบนพื้นที่ราบ พบเพลี้ยอ่อนเฉลี่ย 4.08 และด้วงเต่า 1.88 ตัว/  
 กับดัก ดังแสดงในภาพที่4.30



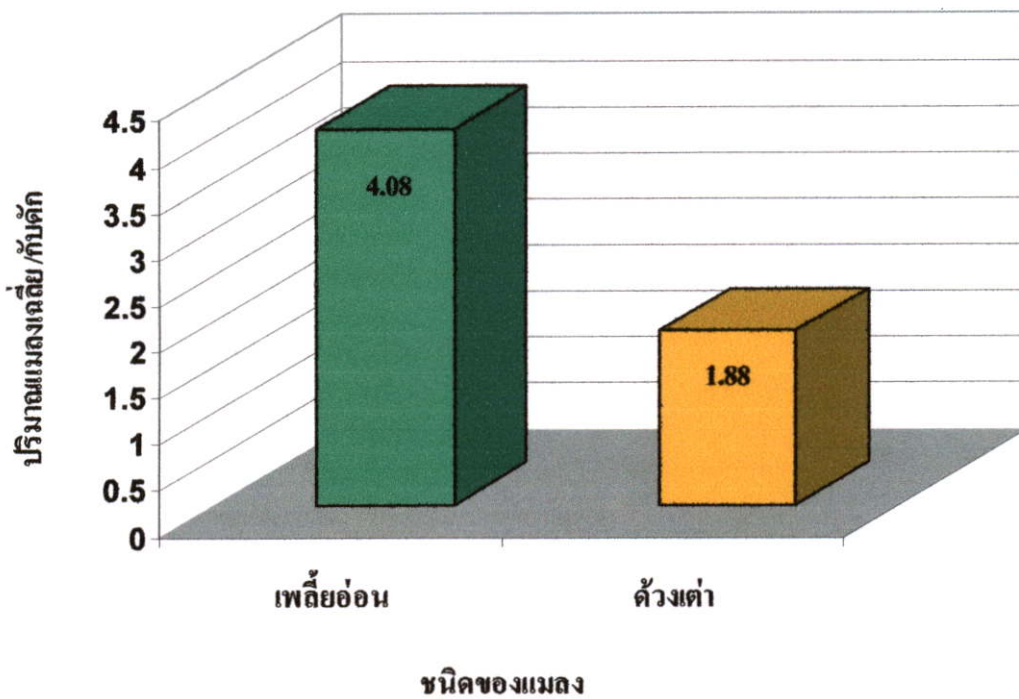
ภาพที่4.27 เปรียบเทียบจำนวนแมลงที่ตรวจนับจากกับดักกาวเหนียวในวิธีการผสมผสานในแปลงปลูกเชิงเขา



ภาพที่4.28 เปรียบเทียบจำนวนแมลงที่ตรวจนับจากกับดักกาวเหนียวในวิธีการผสมผสานในแปลงปลูกบนภูเขา



ภาพที่4.29 เปรียบเทียบจำนวนแมลงที่ตรวจนับจากกับดักกาวเหนียวในวิธีการผสมผสานในแปลงปลูกบนพื้นที่ราบ



ภาพที่ 4.30 เปรียบเทียบจำนวนแมลงที่ตรวจนับจากกับดักกาวเหนียวในวิธีการแบบผสมผสาน  
ใน 3 สภาพพื้นที่แปลงเพาะปลูกเฉลี่ยต่อปี

## บทที่ 5

### วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง

จากการสำรวจพื้นที่แปลงปลูกของเกษตรกรซึ่งเริ่มในช่วงเดือนกรกฎาคม 2546 ถึงเดือนกรกฎาคม 2547 ในอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร จำนวน 15 แปลงพบว่าพืชแสดงอาการของโรคไวรัสที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 อาการ คือ 1) อาการใบค่างจุดเหลืองรุนแรง 2) ใบค่างสีเขียวเข้ม และ 3) ใบค่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding ซึ่งอาการที่พบทั้งหมดนี้ใกล้เคียงกับการสำรวจของดวงใจ ชูปัญญา และคณะ (2531) ซึ่งสำรวจโรคใบค่างแพสชันฟรุ้ดตามแหล่งที่สำคัญในประเทศไทย พบอาการของโรคไวรัสจำนวน 2 อาการคือ อาการใบค่างเหลืองสลับเขียว และอาการใบค่างเป็นจุดเหลือง ผลการประเมินระดับความรุนแรงของโรคไวรัสเฉลี่ยทุกแปลงเท่ากับ 2.2 คือพบอาการใบอ่อนของแพสชันฟรุ้ดแสดงอาการทั้งค่าง และหงิกเล็กน้อยหรือพื้นที่ใบเป็น โรคประมาณ 26-50 เปอร์เซ็นต์ และพบเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยเท่ากับ 89.06 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Xu (1999) พบว่า *Passiflora* spp เป็นโรคไวรัส 30 - 40 เปอร์เซ็นต์ บางครั้งพบ 90 เปอร์เซ็นต์ และดวงใจ ชูปัญญา และคณะ (2531) พบว่าแพสชันฟรุ้ดของบริษัทสยามอุตสาหกรรมที่จังหวัดระยอง ในปี 2528 - 2529 เป็นโรคใบค่างถึง 100 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ผลผลิตลดลงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

ดวงใจ ชูปัญญา และคณะ (2531) ศึกษาโรคไวรัสของแพสชันฟรุ้ดในประเทศไทย พบเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายประกอบด้วย 2 ชนิด คือ PWV และ CMV ซึ่งพืชอาศัยของเชื้อไวรัส 2 ชนิดนี้อยู่ในวงศ์ Leguminosae, Chenopodiaceae, Cucurbitaceae และ Passifloraceae จึงได้นำข้อมูลพืชอาศัยนี้มาทดสอบโรคไวรัสจากแหล่งปลูก อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร ว่ามีการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสทั้ง 2 ชนิดเหมือนกับที่พบในแหล่งอื่นๆ หรือเปล่า ซึ่งก็พบว่าอาการโรคไวรัสทั้ง 3 อาการ จากแหล่งปลูก อำเภอปะทิว คือ 1) อาการใบค่างจุดเหลืองรุนแรง 2) ใบค่างสีเขียวเข้ม และ 3) ใบค่างเส้นใบมีลักษณะเป็น vein banding สามารถถ่ายทอดลงในต้น *C. amaranticolor* ทำให้เกิดจุดแผลสีน้ำตาลแบบเฉพาะแห่ง (local lesion) ในใบที่ถูกปลูกเชื้อหลังจาก 7 วัน แต่ในอาการที่ 2) และ 3) มีการเกิดจุดแผลแบบกระจายทั่วต้นอีกด้วย (systemic lesion) สำหรับถั่วเขียว และถั่วฝักยาว พบว่าเฉพาะอาการที่ 1) เท่านั้นที่ทำให้เกิดอาการจุดแผลเฉพาะแห่งสีน้ำตาลในถั่วเขียวหลังปลูกเชื้อ 3 วัน และทำให้เกิดอาการค่างเหลืองแบบกระจายทั่วทั้งต้นในถั่วฝักยาวหลังจากปลูกเชื้อ 14 วัน ซึ่งอาการของเชื้อไวรัสที่แสดงในต้นถั่วเขียว และต้น *C. amaranticolor* สอดคล้องกับเชื้อ cucumber mosaic virus (CMV) ซึ่งรายงานโดยธีระ สูตะบุตร (2535) พบว่าเชื้อ CMV ทำให้เกิดอาการจุดแผลแห้งตายสีน้ำตาล หลังจากปลูกเชื้อ 3-4 วัน เฉพาะบนใบที่ปลูกเชื้อเท่านั้น ต่อมาอีก 5-6 วันใบจะหลุดร่วง อาการในต้นแพสชันฟรุ้ด (*P. edulis*) และกะทกรกป่า (*P. foetida*) จะใกล้เคียงกันคือ

หลังปลูกเชื้อ 10 วัน จะเกิดจุดแผลสีน้ำตาลในใบที่ถูกปลูกเชื้อ (local lesion) และต่อมาจะกระจายไปยังใบยอด (systemic lesion) ทำให้ใบยอดค่าง หัก และเปลี่ยนแปลงรูปร่างซึ่งเหมือนกับควงใจ ชูปัญญา และคณะ (2531) รายงานว่าเชื้อ passionfruit woodiness virus เข้าทำลายต้นแพศชันฟรุต และกะทกรกป่าทำให้เกิดอาการใบค่างเหลือง ผิวใบไม่เรียบ ใบยอดหักงอ ถ้าอาการรุนแรงใบจะซีดเหลืองและร่วงหล่น และอาการในต้นบานไม่รู้โรยพบว่า เฉพาะอาการที่ 2 ) และ 3) เท่านั้นที่แสดงอาการค่างเหลืองแบบกระจายทั่วต้นหลังปลูกเชื้อ 14 วัน ซึ่งในต้นบานไม่รู้โรยที่ถูกเชื้อ PWV เข้าทำลายจะแสดงอาการเฉพาะอาการค่างเหลืองแบบกระจายทั่วต้นเท่านั้น สำหรับอาการที่ 1) ไม่พบการแสดงอาการค่างเหลือง ทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะว่าความเข้มข้นของเชื้อ PWV มีน้อย จึงไม่สามารถถ่ายทอดลงในต้นบานไม่รู้โรยได้

การแยกสกัด Total RNA และจำแนกชนิดของเชื้อไวรัสโดยการตรวจสอบ dsRNA ของเชื้อไวรัส ด้วย วิธี gel electrophoresis พบว่าตัวอย่างทั้ง 3 อาการของแพศชันฟรุตคือ ใบค่างเหลือง รุนแรง ใบค่างสีเขียวเข้ม และใบค่างเส้นใบมีลักษณะ vein banding พบลักษณะการเคลื่อนที่ของ dsRNA เชื้อไวรัส มีรูปแบบ pattern ของ RNA4 และ RNA5 คล้ายคลึงกับเชื้อ CMV ซึ่งจากการคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละอาการของเชื้อไวรัส พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลที่ใกล้เคียงกับเชื้อ CMV มีน้ำหนักโมเลกุล RNA4 เท่ากับ  $1.32 \times 10^6$  คาลตัน และ RNA5 เท่ากับ  $0.8 \times 10^6$  คาลตัน แสดงให้เห็นว่าทั้ง 3 อาการที่เกิดขึ้นพบการเข้าทำลายของเชื้อ CMV

การตรวจสอบรูปร่าง และขนาดอนุภาคเชื้อไวรัสของแพศชันฟรุตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจำนวน 2 อาการ คืออาการใบค่างเขียวเข้มพบลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสเป็นแบบ flexuous มีขนาดยาวเฉลี่ยประมาณ 756 นาโนเมตร และใบค่างเส้นใบเป็นแบบ vein banding ตรวจพบลักษณะอนุภาคของเชื้อไวรัสเป็นแบบ flexuous เหมือนกันซึ่งมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 529.14 นาโนเมตร

ผลการศึกษา temperature gradient PCR เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาเพิ่มทวีจำนวนของชิ้น DNA โดยใช้ degenerate primer ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อไวรัสสมาชิกในกลุ่ม potyvirus พบว่า ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 56.2 - 65 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มจำนวนของ DNA ของเชื้อไวรัสใบค่างเส้นใบเป็น vein banding ได้ดีที่สุด และผลการใช้กระแสไฟฟ้าในการแยก RT-PCR product ( gel electrophoresis) ตรวจสอบกลุ่ม potyvirus ของอาการโรคไวรัส พบว่า RT-PCR product ทั้ง 3 อาการมี genome size ประมาณ 1,200 bp ซึ่งขนาดของ genome size และความจำเพาะกับ primer ของ potyvirus group ทำให้สามารถจำแนกได้ว่าเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายแพศชันฟรุตที่ทำให้เกิดอาการทั้ง 3 เป็นเชื้อไวรัสในกลุ่ม potyvirus

การศึกษาวิจัยจำแนกโรคไวรัสของแพศชันฟรุต จากอาการที่สังเกตพบบนใบแพศชันฟรุต การศึกษาชนิด และอาการของพืชอาศัย การตรวจสอบรูปร่าง และลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน รวมทั้งการวิเคราะห์ dsRNA และ ขนาดของ PCR product ทำให้สามารถ

สรุปได้ว่าเชื้อสาเหตุโรคใบด่างของแพสชันฟรุตมี 2 ชนิด คือ cucumber mosaic virus (CMV) และ passionfruit woodiness virus (PWV) ซึ่งตรงกับรายงานของดวงใจ ชูปัญญา และคณะ (2531) รายงานว่าเชื้อสาเหตุโรคใบด่างของแพสชันฟรุตมี 2 ชนิด คือ cucumber mosaic virus และ passionfruit woodiness virus จากการสำรวจโรคใบด่างแพสชันฟรุตตามแหล่งที่สำคัญในประเทศไทย ได้แก่ จังหวัดเชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ชัยนาท ขอนแก่น และ ระยอง แต่ก็ไม่พบว่ามีอาการการเกิดจุดแผลในพืชทดสอบที่แตกต่างกันอยู่บ้าง คืออาการในต้น *C. amaranticolor* ของดวงใจ ชูปัญญา และคณะ (2531) เกิดอาการจุดแผลเฉพาะแห่ง (local lesion) เพียงอย่างเดียว แต่จากการสำรวจในอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร คือ เกิดอาการจุดแผลทั้งแบบเฉพาะแห่ง (local lesion) และ กระจายทั่วทั้งต้นค้ำย (systemic lesion) จากตัวอย่างใบแพสชันฟรุตที่แสดงอาการใบด่างสีเขียวเข้ม และใบด่างเส้นในเป็นแบบ vein banding ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก strain ของเชื้อไวรัสในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกัน นอกจากนี้ความเข้มข้นของเชื้อก็แตกต่างกัน อาการที่แสดงออกในแต่ละอาการมีอัตราส่วนความเข้มข้นของเชื้อไวรัส 2 ชนิด ที่เข้าทำลายแตกต่างกัน จึงทำให้อาการที่แสดงออกที่สำรวจพบมีความแตกต่างกัน

การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ดโดยการนำเมล็ดพันธุ์มาปลูกทดสอบการถ่ายทอดเชื้อไวรัสที่ติดมากับเมล็ดพันธุ์ไม่พบว่ามีอาการเกิดโรคเลยกับต้นอ่อนที่มีอายุ 1 เดือนซึ่งสอดคล้องกับ Brunt *et al.* (1996) ซึ่งไม่พบการรายงานว่าเชื้อไวรัสสามารถถ่ายทอดได้ทางเมล็ดของแพสชันฟรุต

จากการศึกษาทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไวรัสของแพสชันฟรุตในสภาพแปลงปลูกของเกษตรกรเป็นระยะเวลา 1 ปี โดยเปรียบเทียบ 3 วิธีการ คือ 1) การใช้วิธีแบบผสมผสาน 2) การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดแมลงเพียงอย่างเดียว และ 3) แปลงปลูกตามธรรมชาติ ซึ่งแปลงทดลองแต่ละแปลงตั้งอยู่ในบริเวณที่แตกต่างกันคือ แปลงที่ 1 ตั้งอยู่บริเวณเชิง แปลงที่ 2 ตั้งอยู่บนภูเขา และแปลงที่ 3 ตั้งอยู่บนพื้นที่ราบ พบว่าระดับความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสใน 3 สภาพพื้นที่เพาะปลูก ทุกสภาพพื้นที่การใช้วิธีการแบบผสมผสาน และ การใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว มีระดับความรุนแรง และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคไวรัสมีความแตกต่างกันในทางสถิติโดยพื้นที่ 2 ใน 3 แปลงที่ทดสอบการใช้วิธีการผสมผสานพบระดับความรุนแรงของโรคต่ำที่สุด รองลงมาคือการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และพบระดับความรุนแรงในการเกิดโรคสูงที่สุดในแปลงที่ปลูกตามธรรมชาติ เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคพบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสานช่วยชะลอการเกิดโรคได้ดีที่สุด รองลงมาคือการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติพบการเกิดโรคสูงที่สุด สำหรับระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยต่อปี พบว่าวิธีการผสมผสาน มีระดับความรุนแรงของโรคต่ำที่สุด มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยังทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติคือ มีระดับความรุนแรงของโรคเฉลี่ยเท่ากับ 0.85, 1.07 และ 1.60 ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยต่อปี พบว่าการใช้วิธีการแบบผสมผสานมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยต่ำที่สุดคือ 58.50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการใช้

ใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ย 67.94 เปอร์เซ็นต์ และแปลงปลูกตามธรรมชาติมีเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคเฉลี่ยสูงสุดคือ 78.61 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักผลผลิตที่ได้รับเฉลี่ย 3 เดือน พบว่าการใช้วิธีการผสมผสานได้รับน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ยสูงสุดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการใช้สารเคมีเพียงอย่างเดียว และแปลงปลูกตามธรรมชาติคือได้รับน้ำหนักผลผลิตเฉลี่ย 91.19, 49.01 และ 22.38 กิโลกรัม ตามลำดับ

การสำรวจแมลงพาหะพบ 2 ชนิดคือ เพลี้ยอ่อน และด้วงเต่า สำหรับเพลี้ยอ่อนพบ เพลี้ยอ่อน *Myzus persicae* และ *Aphis gossypii* จากการการตรวจนับจำนวนแมลงที่ติดอยู่บนกับดักวางเหนือในวิธีการที่ใช้วิธีการแบบผสมผสาน พบว่ามีจำนวนเพลี้ยอ่อนเฉลี่ยทั้งปี 4.08 ตัว/กับดัก และด้วงเต่า 1.88 ตัว/กับดัก แสดงให้เห็นว่าแมลงพาหะหลักที่นำเชื้อเข้าสู่แปลงปลูกคือ เพลี้ยอ่อน และชนิดของเพลี้ยอ่อนทั้ง 2 ชนิด ที่ตรวจพบเป็นพาหะของเชื้อ CMV และ PWV ในลักษณะ non-persistent ซึ่งรายงานโดย Brunt *et al.* (1996) โดยปกติแล้วเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงที่ระบาดมากในช่วงฤดูร้อนแต่จากการสำรวจในแหล่งปลูกอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพรพบว่าช่วงที่แมลงระบาดมากอยู่ในช่วงฤดูฝน (เดือนกันยายน-เดือนธันวาคม) มากกว่าฤดูร้อน(เดือนมกราคม – เดือนมีนาคม) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเพราะว่าในปีที่ทำการศึกษานั้นเป็นปีที่แห้งแล้งมาก และ ในช่วงฤดูฝนไม่ค่อยมีฝนตกจึงทำให้การระบาดของแมลงจึงไม่เป็นไปตามปกติ

สำหรับวิธีการแบบผสมผสานที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ นับว่าประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี ในการควบคุมแมลงพาหะทำให้พืชชั้นฟรุ้ด มีระดับความรุนแรงของโรค และเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคที่ต่ำกว่าการใช้สารเคมีกำจัดแมลงเพียงอย่างเดียว ทำให้ได้รับผลผลิตมากกว่าอย่างชัดเจน ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวเลือกอีกแนวทางหนึ่งให้เกษตรกรนำไปใช้ เพื่อเพิ่มคุณภาพ และปริมาณในการผลิตพืชชั้นฟรุ้ด

## บรรณานุกรม

- กรรมกรักร์ เฟ็งคัม โกวิทช์ พงษ์แสวง ศิริณี พูนไชยศรีและ วินัย จิตยั้ง. 2543. ประสิทธิภาพของกับดักกาวเหนียวสีต่างๆ ต่อเพลี้ยไฟในมันฝรั่ง. วารสารกสิกรรมและสัตววิทยา ปีที่ 22 ฉบับที่ 2. หน้า 126-137.
- กรมส่งเสริมวิชาการเกษตร. สถิติการปลูกไม้ผลและไม้ยืนต้นปี 2540-2542. หน้า 256-257.
- กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา. 2532. โครงการป้องกันกำจัดโรควิดของ Passionfruit. กลุ่มงานวิทยาศาสตร์ กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- เครือพันธุ์ กิตติปรภณ์ Chiyoiichi Noda พัน อินทร์จันทร์และ นवलจันทร์ ดีมา. 2536. การป้องกันกำจัดโรควิดของแตงโดยวิธีเขตกรรม. รายงานผลการวิจัย 2536. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กรมส่งเสริมการเกษตร. 2542. ความต้องการวัตถุดิบของโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร ปี 2540. ฝ่ายอุตสาหกรรมเกษตร กองส่งเสริมธุรกิจเกษตร.
- ฉัฐพร พรหมศร. 2546. "การสำรวจและจำแนกเชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคในเสาวรสในเขตอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร". ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ดวงใจ ชูปัญญาและ วรวรรณ ศักดิ์วงศ์. 2529ก. ศึกษาพืชอาศัยโรควิดของแพสชันฟรุต. รายงานผลการวิจัย 2529. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงการเกษตรและ สหกรณ์.
- ดวงใจ ชูปัญญาและ วรวรรณ ศักดิ์วงศ์. 2529ข. การศึกษาแมลงพาหะโรควิดของแพสชันฟรุต. รายงานผลการวิจัย 2529. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงการเกษตรและ สหกรณ์.
- ดวงใจ ชูปัญญา พรหมณี ผดุงศิริกุล บัวแก้ว พันสนอก ประสิทธิ์ เพชรแก้ว ภูเวียง สืบสิน สมหมาย บัวผันและ สุรพงศ์ ปาณะวงศ์. 2531. โครงการป้องกันกำจัดโรควิดของแพสชันฟรุตโดยวิธีผสมข้าม. รายงานผลการวิจัย 2531. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- ดวงใจ ชูปัญญา. 2534. การศึกษาความสามารถของเชื้อไวรัสโรคใบด่างชนิดอ่อนของแพสชันฟรุตในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อไวรัสชนิดรุนแรง. รายงานผลการวิจัย 2534. กลุ่มงานไวรัสวิทยา กองโรคพืชและ จุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

- ธีระ สุธะบุตร. 2532. โรคไวรัสและโรคคล้ายไวรัสของพืชสำคัญในประเทศไทย. ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- นवलพรรณ งามยี่สุน. 2539. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อไวรัสและไวรอยด์. ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 118 หน้า.
- นवलพรรณ งามยี่สุน และกิริติกุล ชิกว้าง. 2546. การวินิจฉัยเชื้อไวรัสที่เข้าทำลายมะลิโดยวิธีการวิเคราะห์ dsRNA และ วิธีการถ่ายทอดเชื้อ. วารสารโรคพืช ปีที่ 17 ฉบับที่ 1-2. หน้า 12-22.
- รุจน์ มรกต. 2541. เกร็ดความรู้ น้ำมันปิโตรเลียมกำจัดศัตรูพืช. วารสารกสิกรรมและสัตววิทยา ปีที่ 20 ฉบับที่ 3. หน้า 219-220.
- วิทย์ นามเรืองศรี. 2543. วิธีการใช้น้ำมันปิโตรเลียมกำจัดศัตรูพืช. วารสารกสิกรรมและสัตววิทยา ปีที่ 22 ฉบับที่ 4. หน้า 339-343.
- ศรีสุคา ไททองและ ปิยรัตน์ เขียนมีสุข. 2541. ประสิทธิภาพของสารฆ่าแมลงบางชนิดและสารสกัดสะเคาในการป้องกันกำจัดเพลี้ยไฟ *Thrips palmi* Kamy ในกล้วยไม้. วารสารกสิกรรมและ สัตววิทยา ปีที่ 20 ฉบับที่ 4. หน้า 229-235.
- ศรีสุคา ไททองและ ปิยรัตน์ เขียนมีสุข. 2543. สืบของกับคักกาวเหนียวที่เป็นเครื่องมือด้กเพลี้ยไฟในสวนกล้วยไม้. วารสารกสิกรรมและ สัตววิทยา ปีที่ 22 ฉบับที่ 3. หน้า 194- 201.
- Ahmed, N. E. et al. 2001. Effect of Imidacloprid on Incidence of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. **Plant Disease**. 85(1) : 84-87.
- Barbosa, C. J., Stenzel, N. M and Jaconimo, A. P. 1999. Occurrence of cucumber mosaic virus (CMV) in passionfruit in the state of Parana Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. 24(2): 193.
- Bencher, D.,Pappu, S. S., Niblett, C. L., Varon de Agudelo, F., Morales, F., Hodson, E., Alvarez, E., Acosta, O and Lee, R. F. 1996. A strains of soybean mosaic virus infecting *Passiflora* spp. in Colombia. **Plant Disease**. 80: 258-262.
- Brand, R. J., Wechmar, M. B and Von Wechmar, M. B. 1993. Characterization of two viruses implicated in the woodiness disease complex of South African passionfruit: cucumber mosaic virus and a new potyvirus. **Journal of the Southern African Society for Horticultural Sciences**. 3(1): 28-33.
- Brown, J. K., Bird, J and Fletcher, D. C. 1993. First report of passiflora leaf mottle disease caused by a whitefly transmitted geminivirus in Puerto Rico. **Plant Disease**. 77(12): 1264.

- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J and Watson, L. 1996. **Virus of plants** . Descriptions and list from the VIDE database. CAB International.Cambridge .UK, 1484 p.
- Chang, C. A. 1992. Characterization and comparison of passionfruit mottle virus, a newly recognized potyvirus, with passionfruit woodiness virus. **Phytopathology**. 82(11): 1358-1363.
- Chang, C. A., Chen, C. C., Deng, T. C and Zettler, F. W. 1996. Characterization of passion fruit crinkle potyvirus a newly found virus infecting passionfruit. **Plant Protection Bullentin Teipei**. 38(4): 339-354.
- Chagas, C. M., Rossetti, V., Colariccio, A., Lovisollo, O., Kitajima, E. W., Childers, C. C., Halliday, R. B., Walter, D. E., Proctor, H. C., Norton, R. A and Colloff, M. J. 2001. Brevipalpus miles (Acari: Tenuipalpidae) as vectors of plant viruses. **Acarology. Proceedings of the 10 th International Congress** : 369-375.
- Cigdem, U and Filiz, E. 2005. Apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) status in Turkey and sensitive detection using advanced techniques. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**. 29: 251-257.
- Cooper, V. C. 1976. Studies on the seed transmission of cheery leaf roll virus. Ph.D. Thesis, Univ. Of Birmingham.
- Crestani, O. A., Kitajima, M. A., Lin, M. T and Marinho, L. A. 1986. Passionfruit yellow mosaic virus, a new tymovirus found in Brazil. **Phytopathology**. 76: 951-955.
- Dassanayake, E. M and Hicks, R. G. T. 1992. Sri lankan passionfruit mottle virus, a potyvirus infecting golden passionfruit in Sri Lanka. **Annals of applied Biology**. 120: 459-465.
- Doomar, S., Naqvi, Q. A and Garg, I. D. 1999. A strain of cucumber mosaic cucumovirus causing mosaic in marigold in India. **Indian Phytopath**. 52(2): 114-117.
- Faten, G., Hatem, F., Colette, T., Mohamed, M and Marrakchi, M. 1999. Some biological and molecular properties of pepper veinal mottle virus isolates occurring in Tunisia. **Plant Molecular Biology Repoeter**. 17: 149-158.
- Hernandez, C. E., Riestra, D. D., Garcia, P. E., Ortega, A. L. D and Mosqueda, V. R. 2000. Response of the papaya ringspot virus (PRSV) in tree systems of management. **Manejo Integrado de Plagas**. 58: 20-27.
- Hitchborn, J. H and Hills, G. J. 1965. The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. **Virology**. 27: 528-540.

- Iwai, H., Ohmori, T., Kurokawa, Y., Muta, T and Arai, K. 1996. New record of passionfruit woodiness virus in Japan. **Annals of the Phytopathological Society of Japan**. 62(5): 459-465.
- Jayashree, K., Pun, K. B and Doraiswamy, S. 1999. Virus- vector relationships of yellow mosaic virus and whitefly (*Bemisia tabaci*) in pumpkin. **Indian Phytopath.** 52(1): 10-13.
- Kitajima, E. W., Chagas, C. M and Crestani, O. A. 1986. Virus and mycoplasma-associated diseases of passionfruit in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**. 11: 409-432.
- Kundu, J. K., Svoboda, J and Polak, J. 2003. Detection of apple stem grooving virus in different tissues of apple trees throughout the year. **Plant Protection Science**. 39(3): 93-96.
- Marinho, V. L. A., Daniels, J., Kummert, J., Chandelier, A and Lepoivre, A. 2003. RT-PCR-ELISA for deection of apple stem grooving virus in apple trees. **Fitopatologia Brasileira**. 28: 374-379.
- Mirowslawa, C. 2004. Detection of strawberry mottle virus (SMoV) using RT-PCR comparison of two RNA extraction methods. **Journal of Fruit and Ornamental Plant Research**. 12: 17-22.
- Moraes, M. C., Vieira, M. L. C., Novaes, Q. S and Rezende, J. A. M. 2002. Susceptibility of *Passiflora nitida* to passionfruit woodiness virus. **Fitopatologia Brasileira**. 27(1): 108.
- Moshe, L., Michael, F., Meir, P., Rachel, B. J and Shlomo, C. 2001. Effect of host plant resistance to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on virus Acquisition and transmission by its whitefly vector. **Phytopathology**. 91(12): 1209-1213.
- Novaes, Q. S and Rezende, J. A. M. 2000. Possible use of indirect DAS-ELISA for screening of passionfruit tolerant to passionfruit woodiness virus. **Fitopatologia Brasileira**. 24(1): 76-79.
- Pares, R. D., Gunn, L. V., Keskula, E. N., Martin, A. B and Teakle, D. S. 1997. Occurance of passiflora latent carlavirus in cultivated and wild *Passiflora* species in Australia. **Plant Disease**. 81(4):348-350.
- Redinbaugh, M. G., Seifers, D. L., Meulia, T. Abt, J. J., Anderson, W. E., Styer, W. E., Ackerman, J., Salomon, R., Houghton, W., Cremer, R., Gordon, D. T and Hogenhout, S. A. 2002. Maize fine streak virus, a new leafhopper-transmitted rhabdovirus. **Virology**. 92(11): 1167-1174.
- Rezaian, M. A., Krake, L. R., Cunying, Q and Hazzalin, C. A. 1991. Detection of virus associated dsRNA from leafroll infected grapevines. **Viol Methods**. 31(2-3): 325-334.

- Rubies Autonell, C., Bellardi, M. G., Turica, M and Pank, F. 1996. Recent findings of virus infections in medical and aromatic plants in Italy. **Proceedings International symposium**. Breeding research on medical and aromatic plants, Quedlinburg, Germany, 30 June-5 July, 1996. *Beitrage zur Zuchtungsforchang Budesanstalt for Zuchtungsforchang an Kulturpflanzen*. 2(1): 68-71.
- Satya, P., Singh, S. J., Singh, R. K and Upadhyaya. P. P . 2002. Distribution, incidence and detection of a potyvirus on chilli from eastern Uttar Pradesh. **Indian Phytopath.** 55(3): 294-298.
- Taylor, R. H and Greber, R. S. 1973. **Descriptions of plant virus**. [Online].  
Available: <http://www.dpvweb.net/dpv/showadpv.php?dpvno=122>
- Takada, H. 1995. IPM of vector aphid. Laboratory entomology, Faculty of Agriculture Kyoto Prefectural University. Extension Bulletin-ASPAC, **Food & Fertilizer Technology center**. 4(7): 1-5.
- Tomlinson, J. A and Carter, A. L. 1970. Studies in the seed transmission of cucumber mosaic virus in chickweed (*Stellaria media*) in relation to the ecology of the virus. **Ann. Appl Biol.** 66: 381-386.
- Trindade, D. R., Poltronieri, L. S., Albuquerque, F. C., Rezende, J. A. M., Novaes, Q and Kitajima, F. W. 1999. Occurrence of the passionfruit woodiness virus (PWV) in the state of Para, Brazil. **Fitopathologia Brasileira.** 24(2): 196.
- Xu, P.D., Li, M., Ke, C., Xu, P. D and Ke, C. 1999. Occurrence of virus diseases of *Passiflora* spp. And subgrouping of cucumber mosaic Cucumovirus in Fujian. **Acta Phytophy toctica sinica.** 26(1): 50-54.

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายศิริชัย ถาวร
วัน เดือน ปีเกิด	24 สิงหาคม 2521
ที่อยู่	181/68 ถ. ประชาราษฎร์ 2 ซ. สิงหนกณ์ เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานคร 10800 โทรศัพท์ 02 587-2314, 07 824-7225 122/13 หมู่ 1 ต. ปากคลอง อ. ปะทิว จ. ชุมพร 86210
ประวัติการศึกษา	2544 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์) สาขาวิชาเทคโนโลยีการ จัดการศัตรูพืช สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง