บทที่ 3
วิธีการทดลอง

1. การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุ

1.1 การเก็บตัวอย่างถั่วเหลืองที่แสดงอาการโรคฝักหดในถั่วเหลืองฝักสด

เก็บตัวอย่างต้นถั่วเหลืองฝักสดที่แสดงอาการโรคฝักหด จากแปลงปลูกของเกษตรกรในเขต บ้านสันจำปา อ.แม่สรวย จ.เชียงราย ช่วงเดือนพฤษภาคม 2544 มาศึกษาและบันทึกลักษณะอาการของโรค จากนั้นนำตัวอย่างใบพืชของต้นถั่วเหลืองที่แสดงอาการมาล้างด้วยน้ำเปล่าให้สะอาดทิ้งไว้จนแห้ง ชั่งใบถั่วเหลืองหนัก 5 g นำไปเก็บในกล่องเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ –80 °C เพื่อทำการสกัด DNA และ RNA ต่อไป

1.2 การตรวจวินิจฉัยหาเชื้อไวรัสสาเหตุโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

1.2.1 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่มที่มีโครงสร้าง dSDNA การสกัด DNA โดยวิธีการ minipreparation วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Dellaporta *et al.* (1994)

1. นำตัวอย่างใบพืชบดละเอียด 0.5 g เพื่อทำให้เซลล์แตกมากที่สุด ใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml
2. เติม extraction buffer 500 µl (0.1M Tris pH8.0, 0.05M EDTA, 0.5M NaCl, 0.01M β- mercaptoethanol) ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer
3. เติม 20% SDS 33 µl ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer และ incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 10 นาที
4. เติม 5M potassium acetate 160 µl ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่อง Hettich Zentrifugen ERA 12 R
5. เทสารละลายใสด้านบนใส่ลงใน Eppendorf tube ใหม่ให้ได้ปริมาณ 450 ml ระวังเศษตะกอนหรือเศษขยะติดมาด้วย
6. ถ้ามีชิ้นพืชหรือเศษตะกอนติดมาอาจทำให้เกิดปัญหาควรทำซ้ำในขั้นตอนที่ 4 และ 5 อีกครั้งเพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนและเศษขยะออกจากส่วนของสารละลายใส

7. เติม 0.5 isopropanol ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาทีเทสารละลายทิ้ง
8. ล้างตะกอนด้วย 70 % ethyl alcohol 500 µl นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีจากนั้นเทสารละลายทิ้ง ซึ่งจะเห็นเป็นตะกอนของ DNA มีสีขาวขุ่น
9. ทิ้งไว้ให้แห้ง (air dry) ประมาณ 1ชั่วโมง
10. ละลายตะกอน DNA ในน้ำ 200 µl เก็บสารละลายไว้ที่ – 20 °C เพื่อใช้ในการทำ PCR ต่อไป

ขั้นตอนการทำ PCR

1. Template		5	µl
2. 10 x PCR buffer		10	µl
3. 10 mM dNTP		8	µl
4. Primer TV 1		3	µl
Primer TV 2		3	µl
5. *Taq* polymerase		0.5	µl
6. 25 mM $MgCl_2$		2	µl
7. distilled water		68.5	µl
	รวม	100	µl

การเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR โดยมี PCR cycle ดังนี้คือ

cycle ที่ 1 : 94 °C เป็นเวลา 2 นาที 1 ครั้ง

cycle ที่ 2 : 94 °C เป็นเวลา 1 นาที
50 °C เป็นเวลา 2 นาที
72 °C เป็นเวลา 3 นาที
: ทำปฏิกิริยาใน cycle ที่ 2 ทั้งหมด 35 ครั้ง

cycle ที่ 3 : 72 °Cเป็นเวลา 10 นาที 1 ครั้ง

โดยเครื่องของ Perkin Elmer Gene Amp® PCR System 2400

จากนั้นทำการตรวจผลของ PCR ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยเครื่องของ Pharmacia Biotech Electrophoresis Supply-EPS 600

1.2.2 การตรวจหาเชื้อไวรัสในกลุ่มที่มีโครงสร้าง ssRNA การสกัด RNA โดยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Luan *et al.* (1994)

1. นำตัวอย่างที่บดละเอียด 0.1 – 0.3 g ใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 1.5 ml เติม extraction buffer 600 µl และ phenol : chloroform (1:1) ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
2. ถ่ายสารละลายใสด้านบนใส่ลงใน Eppendorf tube ใหม่ เพื่อสกัดแยกโปรตีนและไขมันออกจาก RNA ด้วย 600 µl ของ phenol : chloroform (1 : 1) อีกครั้ง จากนั้นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีที่ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที
3. ถ่ายสารละลายใสด้านบนใส่ลงใน Eppendorf tube ใหม่ ตกตะกอน RNA ด้วย 600 µl 6 M lithium chloride และ 600 µl น้ำ (ที่ผ่านการ treat ด้วย DEPC แล้ว) ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง
4. ละลายตะกอน RNA ด้วย 600 µl 6 M lithium chloride และ 600 µl น้ำ (ที่ผ่านการ treat ด้วย DEPC แล้ว) หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง
5. ล้างตะกอน RNA ด้วย 250 µl น้ำ (ที่ผ่านการ treat ด้วย DEPC แล้ว) หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง
6. ล้างตะกอนด้วย 25 µl 6 M sodium acetate และ 400 µl ethyl alcohol นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายทิ้ง
7. ล้างตะกอนด้วย 200 µl 70% ethyl alcohol นำไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทสารละลายทิ้งและคว่ำ tube เพื่อให้อยู่ในสภาพ air dry
8. เติม 10 µl น้ำ (ที่ผ่านการ treat ด้วย DEPC แล้ว) เก็บสารละลายไว้ที่ –20°C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

หมายเหตุ

สารเคมีที่นำมาใช้เป็น extraction buffer และน้ำที่ใช้เป็นตัวทำละลายในการทดลองจะต้องผ่านการ treat ด้วย DEPC และ autoclave เท่านั้น (ภาคผนวก)

1.2.3 การทำ RT-PCR จะเริ่มจากการสังเคราะห์ cDNA สายแรกของ CP gene ของแต่ละเชื้อ โดยใช้ total RNA ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อพืช 8 µl เติม primer สำหรับสังเคราะห์ cDNA สายแรกของ CP gene (first strand cDNA) ของเชื้อ โดยใช้ 3 µl (35 pmol/µl) นำหลอดไปไว้ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นใส่ลงในน้ำแข็งโดยทันที แล้วเติมด้วย

1. 10 x AMV buffer	2	µl
2. RNasin (40 u/µl)	1	µl
3. 10 mM dNTP	2	µl
4. distilled water	3	µl
5. AMV reverse transcriptase	1	µl

แล้วนำหลอดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 42°C นาน 45 นาที cDNA สายแรกที่ได้นำไปใช้ในการทำ PCR ในขั้นต่อไป

ขั้นตอนการทำ PCR

1. Distilled water	25	µl
2. 10 x PCR buffer	5	µl
3. 10 mM dNTP	5	µl
4. Primer 1	3	µl
Primer 2	3	µl
5. *Taq* polymerase	0.5	µl
6. 25 mM $MgCl_2$	2	µl
7. 1% Triton X – 100	2.5	µl
8. DNA (จากข้อ 2.1.3)	4	µl
รวม	50	µl

การเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค PCR โดยมี PCR cycle ดังนี้คือ

cycle ที่ 1 : 94 °C เป็นเวลา 3 นาที 1 ครั้ง

cycle ที่ 2 : 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที

55 °C เป็นเวลา 1 นาที

72 °C เป็นเวลา 2 นาที

: ทำปฏิกิริยาใน cycle ที่ 2 ทั้งหมด 35 ครั้ง

cycle ที่ 3 : 72 °C เป็นเวลา 10 นาที 1 ครั้ง

จากนั้นทำการตรวจผลของ PCR ด้วย 1% agarose gel electrophoresis

1.2.4 nucleotide sequence ของ primer ที่ใช้

1. TV1 5′ GAA TTC ATG TCG AAG CGT CCA GCA 3′
2. TV2 5′ CGG ATC CTT AAT TCG TCA CTG AGT 3′
3. Carla-Uni 5′ GGA GTA ACT GAG GTG ATA CC 3′
4. CN47 5′ TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT G 3′
5. CN54 5′ TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT A 3′
6. CN55 5′ TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT C 3′

1.3 การตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบฉายแสงส่องผ่าน (transmission electron microscopy : TEM)

เก็บตัวอย่างใบถั่วเหลืองฝักสดที่แสดงอาการโรคฝักหดจากแปลงเกษตรกร ไปส่งตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM ที่มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยวิธีการ dip preparation

2. การถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุ

2.1 การถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์

เก็บเมล็ดถั่วเหลืองที่แก่เต็มที่แล้วจากต้นถั่วเหลืองที่แสดงอาการโรคฝักหด นำเมล็ดที่ได้มาปลูกในกระถางจนอายุประมาณ 18 วัน ซึ่งเป็นระยะ (V3) คือมีใบจริง 3 ใบคลี่ออกเต็มที่และใบจริงสามใบบนข้อถัดไป มีขอบใบแยกออกจากกัน นำใบถั่วเหลืองในระยะ (V3) ตรวจดูอาการและตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโดยเทคนิค PCR

2.2 การถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุโดยการปลูกเชื้อด้วยวิธีกล

นำใบถั่วเหลืองจากต้นถั่วเหลืองที่แสดงอาการโรคฝักหดมาบดในโกร่งบดยาที่สะอาดเติม 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.8 บดให้ละเอียด จากนั้นโรยด้วยผง carborundum ขนาด 600 mesh ลงบนพืชทดสอบจำนวน 6 ชนิดได้แก่ ถั่วเหลือง (*Glycine max*) บานไม่รู้โรย (*Gomphrena globosa*) ยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) พิทูเนีย (*Petunia hybrida*) บานชื่น (*Zinnia elegans*) และ ถั่วเขียว (*Vigna unguiculata*) ปลูกเชื้อโดยใช้หัวแม่มือแตะน้ำคั้นจากใบถั่วเหลืองที่เป็นโรคมาถูเบา ๆ บนใบพืชทดลองบริเวณที่โรยผง carborundum ไว้แล้ว ถูไปมา 5 ครั้งต่อใบ ระวังอย่าให้ใบพืชช้ำ หลังจากปลูกเชื้อแล้วประมาณ 1 นาที ล้างใบบริเวณที่ปลูกเชื้อด้วยน้ำสะอาด นำพืชทดสอบที่ปลูกเชื้อแล้วไปเก็บไว้ในเรือนกันแมลง เพื่อตรวจดูอาการและตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโดยเทคนิค PCR ต่อไป

2.3 การถ่ายทอดโรคโดยแมลงหวี่ขาว

เตรียมแมลงหวี่ขาวที่ปลอดโรค โดยเพาะต้นกล้าถั่วเหลืองฝักสดในกรงปลูกที่บุด้วยตาข่ายละเอียดเป็นเวลา 20 วัน นำแมลงหวี่ขาวมาปล่อยให้แมลงเพิ่มปริมาณในกรงเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 1 – 2 เดือนจึงย้ายแมลงในกรงที่ 1 ไปเลี้ยงต่อในกรงปลูกพืชกรงที่ 2 ที่เตรียมไว้ เพื่อให้แน่ใจว่าทั้งแมลงและพืชปราศจากเชื้อไวรัสที่เป็นสาเหตุโรคถั่วเหลืองฝักหด จากนั้นนำแมลงหวี่ขาวที่ปลอดเชื้อโรคปล่อยกินใบถั่วเหลืองที่แสดงอาการโรคฝักหดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้แมลง 20 ตัวต่อ 1 ต้น แล้วย้ายไปดูดกินบนต้นยาสูบปกติอายุ 20 วัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ประมาณ 14 วัน หรือเมื่อต้นพืชเริ่มแสดงอาการ จากนั้นจึงถ่ายทอดเชื้อไวรัสสาเหตุทั้ง 2 ชนิดคือ 1. SCLV (*Geminivirus*) ที่ได้จากการถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาวไปยังต้นยาสูบและ 2. CPMMV (*Carlavirus*) ที่ได้จากการถ่ายทอดโดยวิธีกลไปยังต้นถั่วเขียว ถ่ายทอดเชื้อ ไวรัสสาเหตุทั้ง 2 ชนิดไปยังต้นถั่วเหลืองโดยใช้แมลงหวี่ขาวที่ปลอดเชื้อถ่ายทอดโรคจากต้นยาสูบ และ ต้นถั่วเขียวที่เป็นโรคดังกล่าว ใช้แมลงหวี่ขาว 20 ตัวต่อ 1 ต้น ดูดกินต้นที่เป็นโรค 24 ชั่วโมง แล้วดูดกินต้นถั่วเหลืองที่ปกติอายุ 14 วัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นฉีดพ่นสารเคมีกำจัดแมลง และบันทึกอาการของโรคที่ปรากฏในระยะเวลาต่อมา

2.4 การสำรวจวัชพืชในแปลงปลูกถั่วเหลืองฝักสด

สำรวจชนิดของวัชพืชที่อยู่ในแปลงถั่วเหลืองฝักสดที่แสดงอาการโรคฝักหดในแหล่งปลูกบ้านสันจำปา อ.แม่สรวย จ. เชียงราย ในช่วงเดือน มิถุนายน 2544 ทำการบันทึกผล

3. แนวทางการควบคุมและการป้องกันโรค

3.1 การตรวจหาระยะในการระบาดของโรคฝักหดในถั่วเหลืองฝักสดที่ก่อให้เกิดความเสียหาย

นำเมล็ดพันธุ์ถั่วเหลืองฝักสดมาปลูกในกระถางทดลองจำนวน 20 กระถางต่อ 1 การทดลอง โดยการปลูกถั่วเหลืองระยะห่างกัน 6 วัน ซึ่งจะมีต้นถั่วเหลืองที่มีอายุ 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 วัน ตามลำดับ จากนั้นนำต้นถั่วเหลืองที่มีอายุต่างกันทั้ง 6 กลุ่มไปรับการถ่ายทอดเชื้อโดยการนำไปไว้ในแปลงเกษตรกร หมู่บ้านสันจำปา อ.แม่สรวย จ. เชียงราย ที่มีการระบาดของโรคฝักหดอย่างรุนแรงโดยมีแมลงหวี่ขาวเป็นพาหะ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำต้นถั่วทั้ง 6 ตัวอย่างกลับมา แล้วฉีดพ่นด้วยสารเคมีกำจัดแมลง อย่างสม่ำเสมอเพื่อป้องกันการเข้าดูดกินของแมลงซ้ำอีก ดูแลต้นถั่วเหลืองจนครบระยะเก็บเกี่ยว คือเมื่อต้นถั่วอายุได้ 65 วัน บันทึกผล และจำนวนฝักที่ได้

3.2 ทดสอบสารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงหวี่ขาวที่เป็นพาหะของไวรัสสาเหตุโรคฝักหด

เตรียมสารเคมีให้มีความเข้มข้นตามที่ฉลากกำหนด (ตาราง 1) เก็บตัวอย่างใบ ถั่วเหลืองที่มีจำนวนไข่ของแมลงหวี่ขาวที่ติดอยู่ใต้ใบ โดยเลือกใบถั่วที่มีปริมาณไข่เท่าๆ กัน ทดสอบสารเคมีทั้ง 6 ชนิด โดยนำใบถั่วที่เตรียมไว้ชุบสารเคมีดังกล่าวให้ทั่วทั้งใบ จากนั้นนำใบที่มีไข่แมลงหวี่ขาวไปบ่มไว้ในตู้กระจกเลี้ยงบนโอเอซีส (floral foam) ชุบน้ำจนชุ่มและเก็บไว้ใน ตู้กระจกนาน 5 วัน นับจำนวนแมลงหวี่ขาวที่ฟักจากไข่เทียบกับชุดควบคุม

ตาราง 1 รายชื่อสารเคมีและอัตราที่ใช้ในการทดลอง

ชื่อการค้า	ชื่อสามัญ	อัตราที่ใช้ต่อน้ำ 20 ลิตร
1.แอพรอน (Apron)	buprofezin	20-30 g
2. ฮอสตาไธออน (Hostathion)	triazophos	30-60 cc
3.คาราเต้ (Karate)	cyhalothrin	20-30 cc
4.ทามารอน (Tamaron)	methamidaphos	20-40 cc
5.แลนเนท (Molan)	methomyl	6-18 g
6.โมแลน (Lannate)	scetamiprid	5-10 g