บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

เมื่อนำตัวอย่างของใบถั่วเหลืองที่แสดงอาการฝักหดมาตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุโดยการสกัด DNA โดยแบ่งลักษณะโครงสร้างของเชื้อไวรัสสาเหตุเป็น 2 กลุ่ม พวกที่มีโครงสร้างเป็น DNA สายคู่ (dsDNA) ไวรัสในกลุ่ม *Geminivirus* คือ SCLV (Soybean crinkle leaf virus) พวกที่ 2 มีโครงสร้างเป็นแบบ RNA สายเดี่ยว (ssRNA) ไวรัสในกลุ่ม *Carlavirus* คือ CPMMV (*Cowpea mild mottle virus*) (Brunt and Crabtree, 1996) โดยใช้เทคนิค PCR ในการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุไวรัส SCLV ที่มีโครงสร้างเป็น dsDNA โดยใช้ primer 1 คู่คือ TV1 และ TV2 (Pissawan, 1992) แล้วนำมาตรวจดูด้วย 0.8 % agarose gel พบแถบ DNA ที่มีขนาด 770 bp จากใบของต้น ถั่วเหลืองที่แสดงอาการฝักหดทุกตัวอย่าง ส่วนชุดควบคุมคือใบถั่วเหลืองปกติ ไม่ปรากฏแถบ DNA สอดคล้องกับการศึกษาของ พิสสวรรณ และคณะ (2532) ทำการทดลองตรวจสอบโรค ไวรัสใบยอดย่นของถั่วเหลืองในต้นพืชที่เป็นโรคในระดับยีนโดยการใช้ DNA ที่สังเคราะห์จากชิ้นส่วนของไวรัสใบหงิกเหลืองของมะเขือซึ่งเป็นไวรัสในกลุ่ม *Geminivirus* เมื่อวิเคราะห์ขนาด DNA ที่สังเคราะห์ได้จากใบถั่วเหลืองที่แสดงอาการยอดย่นด้วยเทคนิค electrophoresis พบว่า DNA ที่ได้มีขนาดประมาณ 770 bp ซึ่งใกล้เคียงกับขนาด DNA ส่วนที่เป็น CP ของ TYLCV เมื่อสกัด DNAจาก agarose gel มาวิเคราะห์ข้อมูล sequence แล้วเปรียบเทียบกับ DNA ส่วนที่เป็น CP ของ TYLCV พบว่า DNA ทั้ง 2 ชิ้น มี sequence คล้ายคลึงกันมาก ในการตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุ CPMMV ที่มีโครงสร้าง ssRNA โดยใช้ primer คือ Carla – Uni และ oligo – d (T) primer คือ CN47, CN54 และ CN 55 และนำมาตรวจดูด้วย 1 % agarose gel พบแถบ RNA ที่ขนาด 120 bp จากใบของ ต้นถั่วเหลืองที่แสดงอาการฝักหดในบางตัวอย่างเท่านั้น ส่วนชุดควบคุมใบถั่วเหลืองปกติไม่ปรากฏแถบของ RNA จากการศึกษาของ Badge et al. (1996) รายงานว่า ใช้ primer ที่เฉพาะกับกลุ่ม *Carlavirus* คือ Carla – Uni และ anchored oligo – d(T) primer CN47, CN54 และ CN 55 ทำ RT – PCR ตรวจหา CPMMV ปรากฏ correctly – sized band ขนาด 120 bp และยังพบว่าการใช้ primer Carla – Uni ในการทำ RT – PCR ตรวจหาเชื้อไวรัสพวกที่เข้าทำลายพืชพวก *Potato virus X* (PVX) ซึ่งเป็นสมาชิกของกลุ่ม *Potexvirus* และ *Potato virus* Y (PVY) type ที่เป็นสามาชิกของกลุ่ม *Potyvirus* ไม่พบแถบ RNA

จากการตรวจหาเชื้อไวรัสด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบอนุภาคของไวรัสเป็นรูป rod shape ขนาดความยาวประมาณ 700 nm จากการศึกษาของ Iwaki *et al.* (1986) พบอนุภาคของไวรัส CPMMV กลุ่มของ Carlavirus ในถั่วเหลืองมีลักษณะ เป็น slightly flexous

ลักษณะ rod shape ขนาด 10-15 x 650-700 nm จากการตรวจตัวอย่างใบถั่วเหลืองฝักสดในการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุโดยกล้องจุลทรรศน์ TEM ไม่พบอนุภาคของไวรัส SCLV เพราะอนุภาคของ SLCV มีขนาดเล็กต้องทำการแยกไวรัสให้บริสุทธิ์ก่อน (purification) หรือทำการเพิ่มปริมาณเชื้อไวรัสในพืชอาศัยก่อนนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ TEM

การศึกษาการถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์โดยนำเมล็ดพันธุ์ที่ได้จากต้นถั่วเหลืองที่แสดงอาการฝักหดมาปลูกจำนวน 800 เมล็ดงอกจำนวน 642 ต้น คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การงอก 80.23 เมื่อนำตัวอย่างใบถั่วเหลืองที่งอกมาทำการสกัด DNA และ RNA เพื่อการตรวจหาเชื้อสาเหตุด้วยเทคนิค PCR และตรวจหาขนาดของ DNA และ RNA บน agarose gel electrophoresis พบว่า ในการตรวจหาเชื้อไวรัส SCLV โดยใช้ primer TV1 และ TV2 พบว่าไม่ปรากฏแถบของ DNA เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่าเชื้อไวรัส SCLV ไม่สามารถถ่ายทอดเชื้อทางเมล็ดพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Iwaki *et al.* (1983b) กล่าวว่า เชื้อไวรัส SCLV ถ่ายทอดได้โดยมีแมลงหวี่ขาวยาสูบเป็นพาหะและไม่สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์หรือโดยเพลี้ยอ่อน จากนั้นทำการตรวจสอบหาเชื้อสาเหตุโดยใช้ primer Carla – Uni ในการตรวจหาเชื้อไวรัส CPMMV พบว่าไม่ปรากฏแถบของ RNA และเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ต้นถั่วเหลืองที่แสดงอาการโรคฝักหด แสดงว่าเชื้อไวรัส CPMMV ไม่สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์ Thongmeearkom *et al.* (1984) รายงานว่า CPMMV สามารถถ่ายทอดโดยแมลงหวี่ขาวและถ่ายทอดทางเมล็ดในอัตรา 0.54 % Brunt and Crabtree (1996) รายงานว่ามีบาง isolate เท่านั้นที่สามารถถ่ายทอดทางเมล็ดพันธุ์

การศึกษาการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุโดยวิธีกลด้วยการทาน้ำคั้นลงบนใบพืชทดสอบ ได้แก่ ถั่วเหลือง บานไม่รู้โรย ถั่วเขียว ยาสูบ พิทูเนีย บานชื่นพบว่า สามารถทำให้เกิดโรค กับพืชทดสอบคือถั่วเหลือง แสดงอาการ mosaic และ vein clearing บานไม่รู้โรย แสดงอาการ mosaic และ ถั่วเขียว แสดงอาการ chlorotic blotch ซึ่งเป็นพืชที่อ่อนแอ (susceptible host species) ต่อเชื้อไวรัส CPMMV (Iwaki *et al.*, 1986) ส่วน ยาสูบ พิทูเนีย และ บานชื่น เป็นพืชที่อ่อนแอต่อเชื้อ ไวรัส SCLV ไม่แสดงอาการของโรค เมื่อนำใบพืชทดสอบไปตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุโดยใช้เทคนิค PCR ปรากฏแถบ RNA ของเชื้อไวรัส CPMMV ขนาด120 bp จากตัวอย่างพืชทดสอบคือ ถั่วเหลือง บานไม่รู้โรย และ ถั่วเขียว เท่านั้น ส่วนในการตรวจหาเชื้อไวรัสสาเหตุ SCLV พบว่าไม่ปรากฏแถบ DNA ในพืชทดสอบทั้ง 6 ชนิด จากการถ่ายทอดเชื้อโดยวิธีกลพบว่า มีเพียงเชื้อไวรัส CPMMV เท่านั้นที่สามารถถ่ายทอดเชื้อโดยวิธีกล ส่วนเชื้อไวรัส SCLV ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกลได้ จากการทดลองของเครือพันธุ์ (2530) พบว่าคุณสมบัติในการถ่ายทอดโดยวิธีกลของ ไวรัส CPMMV เมื่อใช้ถั่วเหลืองเป็นพืชทดลองและทำการทดลองในอุณหภูมิห้องพบว่าไวรัสยังคงมีความสามารถในการทำให้เกิดโรคในน้ำคั้นหลังจากทำให้เจือจางลง 10–100 เท่า (DEP) แล้วเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 55–60 $^{\circ}$C

เป็นเวลา 10 นาที (LIV) หรือทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 27–32 °C เป็นเวลา 1–2 วัน ไวรัสชนิดนี้มีพืชอาศัยส่วนใหญ่อยู่ในตระกูลถั่ว จากการทดสอบโดย tube precipitin test พบว่า ไวรัสชนิดนี้มีความสัมพันธ์ทางเซรุ่มกับ CPMMV ที่พบบนถั่วสิสงในประเทศอินเดีย Brunt and Crabtree (1996) กล่าวว่า *Cowpea mild motte virus* สามารถถ่ายทอด โดยวิธีกล ส่วน Soybean crinkle leaf virus ไม่สามารถถ่ายทอดโดยวิธีกลได้

ในการถ่ายทอดโรคโดยแมลงหวี่ขาว โดยนำแมลงหวี่ขาวไปดูดกินใบต้นถั่วเหลืองที่เป็นโรคฝักหด และทำการถ่ายทอดไปยังต้นพืชทดสอบที่อ่อนแอต่อโรค คือยาสูบ พิทูเนีย และ บานชื่น พบว่าต้นพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด แสดงการ vein clearing และ crinkle leaf โดยต้นยาสูบแสดงอาการ crinkle leaf อย่างรุนแรง จากนั้นนำใบพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิดมาตรวจหาเชื้อสาเหตุโดยเทคนิค PCR โดยใช้ primer TV1 และ TV2 ตรวจหาแถบ DNA ของไวรัส SCLV พบปรากฏแถบที่ขนาด 770 bp จากตัวอย่างใบพืชทดสอบทั้ง 3 ชนิด จากนั้นทำการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุทั้ง 2 ชนิดคือ เชื้อ SCLV ที่ได้จากต้นยาสูบ และเชื้อ CPMMV ที่ได้จากต้นถั่วเขียว ไปยังต้นถั่วเหลืองที่ปกติ พบว่าต้นถั่วเหลืองที่ทำการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุ SCLV จากต้นยาสูบแสดงอาการใบยอดย่น ฝักที่ได้มีขนาดเล็กและย่น ลำต้นมีขนาดเล็ก ส่วนต้นถั่วเหลืองที่ได้รับการถ่ายทอดเชื้อสาเหตุ CPMMV ที่ได้จากต้นถั่วเขียว ไปยังต้นถั่วเหลืองปกติ พบอาการใบด่าง ขนาดของฝักปกติ ไม่แสดงอาการฝักหดให้เห็น แสดงว่า ต้นถั่วเหลืองที่แสดงอาการฝักหดเกิดจากเชื้อไวรัส SCLV ในกลุ่ม *Geminivirus* เท่านั้น ส่วนเชื้อไวรัส CPMMV ในกลุ่ม *Carlavirus* ทำให้เกิดโรคใบด่างในถั่วเหลืองมิใช่สาเหตุที่แท้จริงที่ทำให้เกิดโรคฝักหดในถั่วเหลืองฝักสด

ในการศึกษาสำรวจพืชอาศัยของเชื้อสาเหตุในแปลงเกษตรกรพบพืชอาศัย 9 ชนิดคือ สาบแร้งสาบกา กระทกรก ฝักโขมหนาม ฝักคราดหัวแหวน หญ้าคา หญ้างวงช้าง หญ้าตีนกา ผักเป็ดไทย และ มะแว้งนก ซึ่งจากการสำรวจพบว่ามี สาบแร้งสาบกาเพียงชนิดเดียวเท่านั้นที่แสดงอาการโรคใบด่างที่เกิดจากเชื้อไวรัส ส่วนวัชพืชชนิดอื่นไม่แสดงอาการ จากการรายงานของ Naresh and Nene (1980) กล่าวว่าแมลงหวี่ขาวมีพืชอาศัยมากว่า 74 ชนิดใน 17 ตระกูล และใน 74 ชนิดนี้รวมวัชพืชอยู่ด้วยคือ สาบแร้งสาบกา สาบเสือ ดุตซู ครามขน และ หญ้าตอบต็อก จากการทดลองเครือพันธุ์ และคณะ (2543) ตรวจพบเชื้อไวรัสกลุ่ม *Geminivirus* ในสภาพธรรมชาติโดยวิธี dot blot hybridization และใช้ DNA-A probe ของ TYLCV เป็นตัวตรวจสอบ พบกลุ่ม *Geminivirus* ในสาบแร้งสาบกา แสดงอาการใบด่าง เส้นใบเหลือง และกระทกรก แสดงอาการใบด่างเหลือง อย่างไรก็ตามวัชพืชทั้ง 9 ชนิดที่พบในแปลงปลูกถั่วเหลืองฝักสดที่แสดงอาการฝักหดครั้งนี้น่าจะมีการยืนยันว่าเกิดจากเชื้อไวรัส *Geminivirus* เช่นการใช้ DNA probe เพื่อเป็นการพิสูจน์หาสาเหตุของโรคที่แท้จริงในโอกาสต่อไป

ผลการตรวจหาระยะในการระบาดของโรคฝักหดในถั่วเหลืองฝักสด จากการปลูกต้นถั่วเหลืองให้มีอายุต่างกัน คือ อายุ 6, 12, 18, 24, 30 และ 36 วันตามลำดับ จากนั้นถ่ายทอดเชื้อโดยอาศัยแมลงหวี่ขาวในสภาพแปลงปลูก พบว่าต้นถั่วเหลืองที่อายุ 36 วัน ลักษณะของต้นถั่วเหลืองแสดงอาการปกติ ใบคลี่เต็มที่ปกติ ส่วนใบที่แตกออกมาใหม่ทางด้านข้างมีขนาดเล็กและมีอาการใบย่น ฝักที่ปรากฏมีอาการหด 60 % แต่ยังพบฝักปกติอยู่บ้าง ต้นถั่วเหลืองที่อายุ 30 วัน ในระยะนี้ใบของต้นถั่วเหลืองมีลักษณะปกติ ใบที่แตกออกมาใหม่ทางด้านข้างมีขนาดเล็กและย่น ในระยะนี้มีการติดฝักน้อย ฝักที่ปรากฏมีอาการหดอย่างเห็นได้ชัด ไม่พบฝักปกติ ต้นถั่วเหลืองที่อายุ 24 วัน ใบที่คลี่ออกมาเริ่มมีอาการย่นอย่างเห็นได้ชัดแต่ยังไม่รุนแรง ฝักที่ปรากฏมีอาการหดอย่างเห็นชัดเจนไม่พบฝักที่ปกติ ต้นถั่วเหลืองอายุ 18 วัน ในระยะนี้ใบของต้นถั่วเหลืองแสดงอาการใบยอดย่นอย่างรุนแรง ลำต้นมีขนาดเล็ก ฝักที่ปรากฏมีอาการฝักหดเห็นได้ชัด ไม่พบฝักปกติ ต้นถั่วเหลืองอายุ 12 วัน ในระยะนี้ใบของต้นถั่วเหลืองแสดงอาการใบยอดย่นอย่างรุนแรง ลักษณะของต้นถั่วเหลืองมีขนาดเล็กฝักที่ปรากฏมีอาการฝักหด อย่างเห็นได้ชัดไม่พบฝักปกติ ต้นถั่วเหลืองอายุ 6 วัน ในระยะนี้ใบของต้นถั่วเหลืองแสดงอาการใบยอดย่นอย่างรุ่นแรงเช่นกัน ลักษณะของต้นถั่วเหลืองมีขนาดเล็ก ฝักที่ปรากฏมีอาการฝักหดอย่างเห็นได้ชัดไม่พบฝักปกติ เมื่อถึงระยะเก็บฝักพบว่า มีเพียงต้นถั่วเหลืองที่อายุ 36 วันที่นำไปรับการถ่ายทอดเชื้อในแปลงปลูก มีลักษณะของฝักปกติปนอยู่กับฝักหด 40 % ที่เหลือแสดงอาการฝักหดมีบางส่วนแสดงอาการฝักลีบ ฝักเป็นโรคเกิดจากเชื้อรา และฝักมีหนึ่งเมล็ด การเก็บฝักถั่วเหลืองที่อายุ 30, 24, 18, 12 และ 6 วัน ไม่พบฝักปกติ ส่วนมากแสดงอาการฝักหดที่เหลือฝักจะลีบ ฝักมีหนึ่งเมล็ด และ ฝักเป็นโรคที่เกิดจากเชื้อรา

จากการตรวจหาระยะในการระบาดพบว่า ต้นถั่วเหลืองที่อายุ 36 วันยังพบฝักถั่วเหลืองที่ปกติอยู่บ้าง เนื่องจากในระยะที่ทำการถ่ายทอดเชื้อโดยแมลงหวี่ขาวเป็นระยะที่ต้นถั่วเหลือง เข้าสู่ระยะ R3 คือเริ่มมีการติดฝักอยู่บ้างแล้วเมื่อเชื้อเริ่มเข้าระบาดทำให้ฝักที่เจริญอยู่แล้วยังปกติ ส่วนฝักที่เริ่มพัฒนาขึ้นมาใหม่แสดงอาการฝักหด ส่วนต้นถั่วเหลืองที่อายุ 30 วัน สาเหตุที่มีการติดฝักน้อยอาจเนื่องมาจากในระยะนี้เป็นระยะที่ต้นถั่วเจริญเข้าสู่ระยะ R2 ระยะดอกบานเต็มที่ ซึ่งในการขนย้ายขณะทำการทดลองอาจทำให้ดอกร่วง จึงมีผลทำให้มีการติดฝักน้อย ส่วนต้นถั่วเหลืองที่อายุ 24 เป็นระยะ R1 ซึ่งเป็นระยะเริ่มออกดอก เมื่อเชื้อไวรัสเริ่มระบาดทำให้ฝักที่ปรากฏออกมาจึงมีการอาการฝักหด อย่างเห็นได้ชัด ส่วนต้นถั่วเหลือง อายุ 18 , 12 และ 6 วัน โดยต้นถั่วเหลืองทั้ง 3 ระยะยังอยู่ในระยะ Vn V3 และ V2 ซึ่งเป็นระยะที่เริ่มปรากฏใบจริงคู่แรกมีใบจริงสามใบบน ขอบใบแยกออกจากกัน เมื่อเชื้อเข้าระบาดทำให้ใบที่แตกออกมาใหม่มีอาการยอดย่นอย่างรุนแรง และต้นถั่วเหลืองมีการพัฒนาช้าทำให้ต้นมีขนาดเล็กและต้นเตี้ย ฝักที่เริ่มเข้าสู่ระ R3 – R4 จึงมีอาการหดอย่างเห็นได้ชัดเจน

จากการทดสอบสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 6 ชนิด โดยนำใบถั่วเหลืองที่ใต้ใบมีไข่แมลงหวี่ขาวเกาะติดอยู่ไปชุบสารเคมีกำจัดแมลงโดยใช้ความเข้มข้นตามที่บริษัทแนะนำพบว่าสารเคมีกำจัดแมลง cyhalothrin และ triazophos สามารถควบคุมแมลงหวี่ขาวได้ดีที่สุดโดยแมลงหวี่ขาวสามารถฟักออกมาจำนวน 1 และ 2 ตัว รองลงมาคือ buprofezin scetamiprid methamidaphos โดยแมลงหวี่ขาวสามารถฟักออกมาจำนวน 14, 24 และ 25 ตัวตามลำดับ ส่วนสารเคมีที่ควบคุมแมลงหวี่ขาวได้น้อยที่สุด คือ methomyl โดยแมลงหวี่ขาวสามารถฟักออกมาจำนวน 176 ตัวเมื่อเทียบกับชุดควบคุมคือน้ำเปล่า ซึ่งแมลงหวี่ขาวสามารถฟักออกมาจำนวน 189 ตัว ซึ่งผลของสารเคมีต่อการฝักเป็นตัวจากไข่ของแมลงหวี่ขาวสอดคล้องกับรายงานของ Sharaf and Allawi (1980) รายงานว่า parathion และ methyl–parathion มีผลทำให้แมลงทุกวัยมีอัตราการตาย 88–100% ส่วน triazophos มีฤทธิ์สูงต่อระยะไข่และระยะตัวอ่อนแต่ methamidophos axinphos– methyl pirimiphos–methyl และ methidathion ไม่มีฤทธิ์ต่อระยะไข่ แต่มีฤทธิ์ต่อแมลงในระยะใกล้จะเป็นตัวเต็มวัย (pre-adult stage) และ oxydemeton–methyl และ phosphamidon มีฤทธิ์เฉพาะระยะตัวอ่อนวัยแรกเท่านั้น และการทดลองในสภาพไร่ ปรากฏว่าสามารถลดประชากรแมลงหวี่ขาวลงได้

จากผลการทดลองพบว่า เชื้อไวรัส SCLV ทำให้เกิดโรคฝักหดในถั่วเหลืองฝักสดซึ่งไม่สามารถถ่ายทอดทางเมล็ด ส่วนเชื้อไวรัส CPMMV ไม่สามารถทำให้เกิดโรคฝักหดในถั่วเหลืองฝักสดแต่จะทำให้เกิดอาการใบด่างประและ ไม่สามารถถ่ายทอดทางเมล็ด ในการสำรวจวัชพืชพบว่าในแปลงถั่วเหลืองที่แสดงอาการฝักหดมีเพียงสาบแร้งสาบกาที่แสดงอาการใบด่างเกิดจากเชื้อไวรัส ในการตรวจหาระยะในการระบาดพบว่าต้นถั่วเหลืองที่อายุ 36 วันที่ติดเชื้อไวรัส SCLV จะแสดงอาการฝักหด 60 % แต่ในต้นถั่วเหลืองที่อายุน้อยกว่า 36 วันที่ได้รับเชื้อไวรัส จะแสดงอาการฝักหด 100 % โดยเฉพาะเมื่อเชื้อไวรัสเข้าระบาดในระยะต้นกล้าอายุ 6–18 วันจะแสดงอาการใบยอดย่นอย่างรุนแรง สารเคมีที่ป้องกันกำจัดการฟักของแมลงหวี่ขาวที่เป็นพาหะของเชื้อไวรัสสาเหตุที่ได้ผลดีคือ cyhalothrin และ triazophos